



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
DOUTORADO EM AGROECOLOGIA

TÁCILA RAYENE DOS SANTOS MARINHO

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E VARIABILIDADE GENÉTICA *in vitro* DE
BACURIZEIRO (*Platonia insignis* Mart.): UMA ESPÉCIE NATIVA DA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

São Luís, Maranhão
2022

TÁCILA RAYENE DOS SANTOS MARINHO
Engenheira Agrônoma
Mestra em agroecologia

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E VARIABILIDADE GENÉTICA *in vitro* DE
BACURIZEIRO (*Platonia insignis* Mart.): UMA ESPÉCIE NATIVA DA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutora.

D.Sc. Tiago Massi Ferraz - Orientador

D.Sc. Thais Roseli Corrêa – Coorientadora

São Luís, Maranhão
2022

TÁCILA RAYENE DOS SANTOS MARINHO
Engenheira Agrônoma
Mestra em agroecologia

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutora.

D.Sc. Tiago Massi Ferraz - Orientador
D.Sc. Thais Roseli Corrêa – Coorientadora

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Thais Roseli Corrêa
Universidade Estadual do Maranhão (Coorientadora)

Prof. Dra. Claudete Santa-Catarina
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof. Dr.º Diego Ismael Rocha
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr.º Marcos Vinícius Marques Pinheiro
Universidade Estadual do Maranhão

Dr.º Sérgio Heitor Sousa Felipe
Universidade Estadual do Maranhão

“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse
feito.”

(Martin Luther King)

Dedico aos meus pais, Valdilene e Luíz por todo esforço
a mim dedicado. Ao meu irmão João Victor e ao meu noivo Robson Dutra.

Agradecimentos

À Deus que pela sua infinita bondade permitiu que eu realizasse esse sonho, me fortaleceu e mesmo diante de tantos obstáculos em toda a jornada acadêmica, nunca me abandonou. Obrigada Senhor! Toda honra seja dada a Ti!

Aos meus pais Raimundo Luíz Rodrigues Marinho e Valdilene dos Santos Marinho por serem sempre tão zelosos e amorosos comigo e por fazerem tudo pela minha felicidade, por tantos sacrifícios em prol da minha formação! Amo vocês infinitamente! Ao meu noivo, amado e companheiro Robson Dutra de Souza, por sempre me incentivar a crescer, acreditar em mim, e nunca me deixar só, obrigada! Ao meu irmão João Victor dos Santos Marinho por me aconselhar, me apoiar e por suas valiosas contribuições.

Ao meu orientador Prof. Tiago Massi Ferraz por sua paciência, disponibilidade, dedicação e compromisso em me guiar na vida acadêmica. Obrigada por ser exemplo de profissional e ser humano. Serei eternamente grata!

À minha Co-orientadora Prof.^a Thais Roseli Corrêa, pelas valiosas contribuições e correções, por me orientar todos esses anos, compartilhando conhecimentos e experiências de vida, você é exemplo para mim! Muito obrigada por tudo!

Ao Professor e pesquisador Marcos Vinícius Marques Pinheiro por todo empenho em me orientar, ensinar novas técnicas e por estar sempre disposto a contribuir, suas orientações foram indispensáveis, muito obrigada!

A todo corpo docente dos Programas de Pós Graduação em Agroecologia (PPGA) e Agricultura e Ambiente (PPGAA), especialmente aos professores Fabrício de Oliveira Reis, Fábio Afonso Mazzei Moura de Assis Figueiredo, e José Ribamar Gusmão Araújo, por todo esforço e dedicação no crescimento profissional dos membros e alunos do LCT-UEMA.

Agradeço ao Prof. Diego Silva Batista dos Programas de Pós Graduação em Agronomia e Ciências Agrárias (Agroecologia) – UFPB e Agricultura e Ambiente – UEMA, por todo apoio e valiosas contribuições desde os primeiros planejamentos de pesquisa até a redação final do manuscrito, muito obrigada!

Agradeço a Prof^a. Claudete Santa-Catarina, do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia - UENF, por ter me acolhido em seu laboratório de trabalho, me orientado quanto aos primeiros passos e me incentivado na pesquisa.

Ao professor Diego Ismael Rocha - UFV pela parceria, disponibilidade em colaborar e valiosas contribuições ao trabalho.

À toda equipe do LCT-UEMA, pois juntos vivenciamos todas as dificuldades de estrutura, mas também as alegrias de cada pequena conquista, Maria Luara Aragão, Juliana de Paula Alves, Vitória Karla de Oliveira Silva, Lúcio Rafael Rocha de Moraes, Mariana Costa, Maria Cristina, Ildeane. Mas, especialmente Irislene Sousa Albuquerque e Karina Vieira da Silva, as quais dividi sonhos, trabalhos e conquistas com o bacuri, e a Givago Lopes Alves por compartilhar aprendizados, desafios e vitórias desde a graduação, obrigada por sua parceria.

A todos os funcionários do PPGA, especialmente às secretárias Rayanne Cristine e Denise Araújo, e às funcionárias Luzinete, Amélia e Neto.

A todos que ao longos destes anos de pesquisa nos ajudaram com as coletas de material vegetal.

À UEMA em nome do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia.

À FAPEMA pelos projetos de financiamento e pela concessão de bolsa nestes anos de estudo.

Enfim, a todos que contribuíram para a concretização desta pesquisa.

Sumário

Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	12
Lista de Siglas e Abreviações	13
Resumo	14
Abstract	15
Introdução geral	17
Hipóteses	19
Objetivos	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
Referências	21
Capítulo I	23
Bacurizeiro: da semi domesticação à micropropagação. Uma revisão	23
1. Introdução	24
2. O Bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart.)	26
2.1 Aspectos botânicos e morfoanatômicos	26
2.2 Centro de origem e distribuição	28
2.3 Importância socioeconômica e potencial industrial	30
2.4 Métodos de propagação	32
2.5 Conservação	33
3. Cultivo <i>in vitro</i>	34
3.1 Embriogênese somática de espécies arbóreas	34
3.2 Fatores indutores da embriogênese somática: Reguladores de crescimento	36
3.4 Variabilidade genética <i>in vitro</i>	39
Referências	41
Capítulo II	57
Calogênese <i>in vitro</i> : determinação do potencial morfogênico de embriões zigóticos imaturos de bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart.)	57
RESUMO	58
ABSTRACT	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 Coleta de material vegetal	60
2.3 Multiplicação de calos de <i>Platonia insignis</i>	
2.4 Preparo das amostras para análises histológicas e microscopia de luz	
2.4 Análises estatísticas	62

3. RESULTADOS	62
3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Platonia insignis</i> a partir de embriões zigóticos imaturos 62	
3.2 Competência calogênica e responsividade de calos de bacurizeiro em meios suplementados com diferentes PGR's	63
3.3 Análises morfoanatômicas	64
4. DISCUSSÃO	65
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS	67
LISTA DE TABELAS	70
LISTA DE FIGURAS	71
Capítulo III	75
Estabelecimento de calos embriogênicos de bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart.)	75
Resumo	76
Abstract	76
1. Introdução	77
Material e métodos	79
2.1 Experimento 1. Multiplicação e determinação de linhagens embriogênicas	79
2.2 Experimento 2. Eficiência da putrescina na regeneração de linhagens embriogênicas 79	
2.2.1 Análises estatísticas	80
2. Resultados	80
Experimento 1. Multiplicação e determinação de progênies embriogênicas	80
Experimento 2. Eficiência da putrescina na regeneração de linhagens embriogênicas.	82
4. Discussão	85
4.1 Aspectos morfoanatômicos podem definir calos de <i>P. insignis</i> com potencial embriogênico	85
4.2 Auxinas e poliaminas combinadas na regeneração de calos embriogênicos	86
Referências	88
Capítulo IV	91
Genetic variability during <i>in vitro</i> establishment of bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i> Mart.): an Amazon species	91
Abbreviations	93
Abstract	94
Introduction	95
Results	97
Bacuri accessions present high variability for <i>in vitro</i> responses	97
Selection of bacuri for <i>in vitro</i> establishment	98

Discussion.....	98
Materials and methods.....	101
Collection of plant material.....	101
Disinfestation and <i>in vitro</i> establishment of <i>Platonia insignis</i> explants	102
Characterization of <i>in vitro</i> responses and estimates of genetic parameters	102
Selection index	103
Statistical analysis	103
Conclusion.....	103
Acknowledgments	104
References	105
Tables	110
Considerações finais.....	117
Considerações finais.....	118
ANEXOS	119
Anexo 1. Normas de formatação da Revista <i>Árvore</i>.....	119
Anexo 2. Comprovante de submissão da Revista <i>Árvore</i>.....	123
Anexo 3. Normas de formatação da Revista <i>Australian Journal of Crop Science</i>.....	123
Anexo 5. Comprovante de tramitação de artigo na Revista <i>Australian Journal of Crop Science</i>.....	126

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Árvore de *Platonia insignis* (a); flor (b); fruto maduro (c); e rebrotação radicular (d) em vegetação primária, no município de Santa Rita, Maranhão - Brasil. . 27

Figura 2. Mapa de distribuição de *Platonia insignis* no Brasil e América Latina. 29

Capítulo II

Figura 1 - Etapas da desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) provenientes de frutos imaturos. 71

Figura 2 - Responsividade de explantes (a) e calos induzidos a partir de sementes de frutos imaturos de *Platonia insignis* Mart. mantidos em meio MS sem adição de PGR's (b). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barra: 1mm. 72

Figura 3 - Características de calos de *Platonia insignis* submetidos a diferentes concentrações de PGR's. Coloração de calos (a); formato de calos (b); capacidade de multiplicação de calos (c); Responsividade (%) (d). *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. 73

Figura 4 - Aspectos morfoanatômicos de calos de *Platonia insignis* com 60 DAI submetidos a diferentes PGR'S adicionados ao meio de cultura MS. (a-c) calos submetidos ao tratamento MS + BA [2,5 µM]; (d-f) calos submetidos ao meio MS + BA [1,0 µM] + GA3 [13,43 µM]; (g-i) calos mantidos em meio MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM]; e (j-l) calos mantidos em MS + GA₃ [13,43 µM] + NAA [23,40 µM]. Pontas de setas indicam cavidades secretoras esquizógenas. Linhas vermelhas tracejadas indicam volume celular. Setas indicam formação de parede periclinal externa. Barras: a-d-g-j 5mm; b-h-k 200µm; c-f-i-l 100µm; e 600µm. 74

Capítulo III

Figura 1. Calos de *Platonia insignis* multiplicados em meio MS suplementados com BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM] e analisados a partir de dupla coloração com Carmim acético e Azul de Evans aos 60 DAI. Calos em meio de multiplicação (A); calos friáveis (B); fração de calos friáveis pró-embrionários com reação à dupla coloração (C). Calos globulares (D); fração de calos globulares com reação à dupla coloração (E).

Abreviaturas: *Fc* – calo friável; *Ec* – calo esponjoso; *Em* – calo embriogênico; *Nem* – calos não embriogênicos. Barra: 1 mm. 81

Figura 2. Calos de *Platonia insignis* Mart. aos 75 DAI induzidos em meio MS com adição de diferentes PGR's para regeneração de linhagens embriogênicas. Calos globulares do tratamento R1 (2,4-D 0,1 µm + putrescina 50 µm) (A); calos globulares do tratamento R2 (2,4-D 0,1 µm + putrescina 100 µm) (B); calos friáveis do tratamento R3 (2,4-D 0,8 µm + putrescina 50 µm) (C); calos globulares do tratamento R4 (2,4-D 0,8 µm + putrescina 100 µm) (D). Barra: 1 mm. 83

Figura 3. Características de calos de *Platonia insignis* submetidos a diferentes concentrações de PGR's para regeneração de linhagens embriogênicas. Capacidade de multiplicação de calos (a); Coloração de calos (b); formato de calos (c)..... 84
 Figura 10 Distribution map of *Platonia insignis* accessions over the State of Maranhão, Brazil (A). *Platonia insignis* adult plant (B). Immature fruit of *Platonia insignis* (C). 114

Capítulo IV

Figura 1 *In vitro* establishment of *Platonia insignis* embryos. (A) Early-stage embryo - 0 DAI coated with cortical meristem at the time of inoculation in MS medium absent of growth regulators. (B) Oxidation (OXI) of the embryo at 60 DAI. (C) formation of pinkish- colored defense structures (PCDS) in the shoot initiation region (arrowheads). (D) Callogenesis responses with the formation of globular-like embryogenic callus (CAL) (arrowheads) at 60 DAI (E) Radicle formation at 60 DAI (Rd). (F) Shoot formation at 60 DAI (Ap) Abbreviations: Oxi – the percentage of oxidation; Df – pinkish-colored defense structures; Cal – callogenesis; Rd - radicle emission; Ap – shoot emission. Bar: 3.5 cm 115

Figura 2 Embryos from 10 accessions of *Platonia insignis* at 60 DAI. AC.1 showing intense callogenesis, containing friable globular callus in the opposite region to the radicle emission (A). AC.2 displaying shoot formation and white spongy-like callus absent of embryogenic potential (B). AC.3 presenting intense oxidation and a little formation of white spongy-like callus (C). B.C. 4 showing intense radicle emission and formation of a white spongy-like callus in opposite to the root axis (D). AC.5 demonstrating a suitable friable globular callus formation and undefined callus mass shape with less embryogenic potential, additionally to the formation of pinkish colored defense structure and radicle formation (E). AC.6 displaying root formation, and white spongy-like callus and undefined callus mass shape (F). AC.7 presenting pinkish-colored defense structures in the shoot-forming region, and undefined callus mass shape (G). AC.8 showing oxidized regions, besides callus and shoot formation (H). B.C. 9 displaying intense callogenesis (I). AC.10 presenting intense callogenesis and root initiation (H) Bar: 3.5 cm. 115

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1 Classificação qualitativa de calos de bacuri (<i>Platonia insignis</i> Mart.) provenientes de meristema fundamental cortical.	70
---	----

Capítulo III

Tabela 1 Classificação qualitativa de calos de <i>Platonia insignis</i> Mart.	80
---	----

Capítulo III

Tabela 1 Identification of <i>Platonia insignis</i> Mart. accessions selected over ten locations of the State of Maranhão, Brazil, and their respective geographic coordinates.	110
--	-----

Tabela 2 Classification of heritability magnitudes and selective accuracy to estimate <i>in vitro</i> genetic parameters of <i>Platonia insignis</i>	111
---	-----

Tabela 3 Estimates of genetic parameters based on the analysis of 10 accessions of <i>P. insignis in vitro</i> , at 60 DAI, for callogenesis (CAL), oxidation percentage (OXI), radicle emission (ROOT), shoot emission (SHOOT), and formation of pinkish-colored defense structures (PCDS).	112
---	-----

Tabela 4 Classification based on sum of ranks for ten genotypes of <i>P. insignis</i> for callogenesis (CAL), percentage of oxidation (OXI), radicle emission (ROOT), shoot emission (SHOOT), and formation of pinkish-colored defense structures (PCDS) at 60 DAI <i>in vitro</i>	113
---	-----

Lista de Siglas e Abreviações

(v/v) – porcentagem por volume;

AC – acessos.

Ap – emissão de parte aérea;

BLUP – Melhor Predição Linear Imparcial;

CAL- calogênese;

CVr: coeficiente de variância relativa;

DAI – dias após a inoculação;

h^2_g : herdabilidade de plantas individuais no sentido amplo;

Kpal – Kilopascal;

LCT UEMA – Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual do Maranhão

M: média geral do experimento

MS – Murashige e Skoog;

OXI – porcentagem de germinação;

PCDS – estrutura de defesa rosácea;

Rd- emissão de radícula;

REML – Máxima Verossimilhança Restrita;

ROOT – raíz;

SENEGEN- Sistema Estatístico e Seleção Genética Computadorizada por Modelos Lineares Mistos;

SHOOT – formação de raíz;

Ve: variância residual;

Vf: variância fenotípica individual ;

Vg: genotypic variance between individuals;

Resumo

Frutífera amazônica brasileira, o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) tem elevada importância para o desenvolvimento sustentável da região amazônica. Todavia, por estar em processo de domesticação, suas técnicas de propagação ainda são limitadas, assim, a cultura de tecidos pode ser uma ferramenta biotecnológica eficiente para alcançar a eficiência na produção de mudas desta espécie. Por ser uma planta alógama, com alta variabilidade genética, diferentes genótipos podem não responder de forma homogênea aos mesmos estímulos *in vitro*, por isso é fundamental o conhecimento do controle genético das características relacionadas aos processos de regeneração *in vitro* para a seleção de genótipos mais responsivos. Assim a presente tese teve como objetivo geral desenvolver estratégias para a reprodução *in vitro* de *Platonia insignis* a partir de embriões zigóticos, oriundos de frutos imaturos por meio da embriogênese somática, e avaliar a variabilidade genética de diferentes acessos do Estado do Maranhão. Os estudos realizados e os resultados obtidos estão apresentados na forma de cinco capítulos. O capítulo I, refere-se a um artigo de revisão de literatura acerca do bacurizeiro, seu processo de domesticação, suas técnicas de propagação atuais, até a prospecção de metodologias biotecnológicas. No capítulo III objetivou-se estabelecer um protocolo de indução e calogênese *in vitro* de *P. insignis* Mart. Os resultados de indução de calogênese em meios sem adição de PGR's demonstram o potencial de reguladores endógenos. As seções anatômicas revelam elevada calogênese, entretanto ainda não semelhantes a massas de calos embriogênicos, portanto mais investigações são necessárias para otimizar o desenvolvimento de calos embrionários de *P. insignis*. No capítulo III objetivou-se a multiplicação eficiente dos calos de *P. insignis* e o estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração de calos embriogênicos. Para a confirmação da presença de células embriogênicas os calos foram submetidos a técnica citológica de dupla coloração. Foram obtidos dois tipos de calos com distintos potenciais morfogênicos: calos friáveis com potencial embriogênico e calos esponjosos sem potencial embriogênico. Neste estudo a combinação de 2,4-D 0,8 μm + putrescina 50 μm induziu a maior formação de calos com potencial embriogênico. No capítulo IV estudou-se o controle genético de características relacionadas ao estabelecimento *in vitro* de acessos de *P. insignis* oriundos de diferentes regiões do estado do Maranhão, Brasil. As estimativas dos parâmetros genotípicos foram obtidas pela metodologia de modelos mistos, procedimento REML (Máxima Verossimilhança Restrita) /BLUP (Melhor Predição Linear Imparcial). Os resultados obtidos demonstraram elevada variabilidade genética na população estudada, além disso, os acessos AC.7, AC.2, AC.1, AC.6 e AC.8 foram mais eficientes quanto a sua resposta ao processo de regeneração *in vitro*, apresentando capacidade de calogênese superior, menor suscetibilidade à oxidação, maior capacidade de formação de raízes e parte aérea. Já no capítulo V com as considerações finais, enfatizamos que este é o primeiro trabalho a pesquisar técnicas para o cultivo *in vitro* de *P. insignis* por meio do estabelecimento de um protocolo de descontaminação e indução de calogênese *in vitro*, além de investigar a relação entre parâmetros genéticos e a seleção de acessos responsivos à regeneração *in vitro*. Esse conhecimento gerado subsidiará futuros estudos de micropropagação, conservação e domesticação de *P. insignis*.

Palavras-chave: bacuri, cultivo *in vitro*; embriogênese somática; fruteira amazônica; variabilidade genética.

Abstract

A Brazilian Amazonian fruit, the bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) is highly important for the sustainable development of the north and northeast regions. However, as it is in the process of domestication, its propagation techniques are still limited, so tissue culture can be an efficient biotechnological tool to achieve efficiency in the production of seedlings of this species. As it is an allogamous plant, with high genetic variability, different genotypes may not respond homogeneously to the same stimuli *in vitro*, so it is essential to know the genetic control of traits related to *in vitro* regeneration processes for the selection of more responsive genotypes. Thus, the present thesis had as general objective to develop strategies for the *in vitro* propagation of *Platonia insignis* through somatic embryogenesis from zygotic embryos, to characterize the induction process through anatomical and histochemical studies, and to study the genetic control of traits related to callogenesis, as well as the genetic variability of different accessions in the state of Maranhão. The studies carried out, and the results obtained are presented in the form of five chapters. Chapter I refer to a literature review article about the bacuri tree, its domestication process, its current propagation techniques, up to the prospection of biotechnological methodologies. In chapter III, the objective was to establish a protocol for *in vitro* induction and callogenesis of *P. insignis* Mart. The results of callogenesis induction in media without the addition of PGRs demonstrate the potential of endogenous regulators. Anatomical sections reveal high callogenesis, however not yet similar to embryogenic callus masses, therefore further investigation is needed to optimize the development of *P. insignis* embryonic callus. Chapter III aimed at the efficient multiplication of *P. insignis* callus and the establishment of an efficient protocol for embryogenic callus regeneration. To confirm the presence of embryogenic cells, the calluses were submitted to double staining cytology. Two types of callus with different morphogenic potential were obtained: friable callus with embryogenic potential and spongy callus without embryogenic potential. In this study, the combination of 2,4-D 0.8 µm + putrescine 50 µm induced greater callus formation with embryogenic potential. In chapter IV, the genetic control of traits related to the *in vitro* establishment of *P. insignis* accessions from different regions of the state of Maranhão, Brazil was studied. The estimates of the genotypic parameters were obtained by the mixed models methodology, REML (Restricted Maximum Likelihood) /BLUP (Best Unbiased Linear Prediction) procedure. The results obtained showed high genetic variability in the population studied, in addition, accessions AC.7, AC.2, AC.1, AC.6 and AC.8 were more efficient in terms of their response to the *in vitro* regeneration process, presenting superior callogenesis capacity, less susceptibility to oxidation, greater ability to form roots and shoots. In chapter V, with the final considerations, we emphasize that this is the first work to research techniques for the *in vitro* cultivation of *P. insignis* through the establishment of a decontamination protocol and *in vitro* callogenesis induction, in addition to investigating the relationship between genetic parameters and selection of accessions responsive to *in vitro* regeneration. This generated knowledge will support future studies of micropropagation, conservation, and domestication of *P. insignis*.

Keywords: bacuri, *in vitro* culture; somatic embryogenesis; Amazonian fruit tree; genetic variability.

Introdução Geral

Introdução geral

O bacurizeiro é uma das espécies nativas mais populares da região amazônica (CAVALCANTE, 1996; DANIEL, 2004), que apresenta múltiplos usos, desde o consumo do fruto (AGUIAR, 2006; SOUZA et al., 2013), medicina popular e indústria de cosméticos (SHANLEY et al., 2016) à extração madeireira (HOMMA et al., 2010; HOMMA et al., 2013), e que desafia esforços para seu processo de domesticação (SHANLEY et al., 2016).

Pertencente à família Clusiaceae, com centro de origem na Amazônia Oriental Brasileira, ocorrendo também nas áreas amazônicas dos países: Peru, Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa (NASCIMENTO et al., 2007) e Equador (CAVALCANTE, 1996). Possui elevado valor socioeconômico (AGUIAR, 2006; PONTES et al., 2017), apresentando características organolépticas, farmacológicas e alto valor nutricional que conferem aos frutos de *P. insignis* a classificação nobre, e justificam a sua ampla aceitação no mercado, tanto para consumo *in natura*, quanto para produtos industrializados com algum grau de processamento (SANTOS et al., 2019). Contudo, a oferta dos frutos ainda é pequena, com produção escalonada (ARAÚJO et al., 2007) e insuficiente para suprir a demanda do mercado consumidor (SILVA et al., 2010), pois grande parte da polpa de bacuri produzida é oriunda da coleta dos frutos de árvores de regeneração natural, que resistiram à expansão de comunidades, do avanço da agricultura, pecuária e da extração madeireira no litoral do Pará e do Maranhão (HOMMA et al., 2010).

Mas apesar da relevante importância da espécie, encontra-se em processo de domesticação, e seus frutos são em sua maioria oriundos do extrativismo vegetal, além de que os poucos plantios existentes são heterogêneos e com produção irregular, pois trata-se de uma espécie predominantemente alógama (SARAIVA et al., 2013). Dentre as técnicas utilizadas para propagação do bacurizeiro, a enxertia e outros métodos de propagação assexuada são de uso limitado, para atender a requisitos de alta produtividade e implantação de pomares da fruta.

O conhecimento científico sobre a biotecnologia da espécie *Platonia insignis* Mart. ainda é incipiente, principalmente quando se trata de genótipos da Amazônia Maranhense, necessitando de estudos que visem à domesticação, conservação e melhoramento dessa espécie. Nessa conjuntura, as técnicas de cultivo *in vitro*, em

especial, a embriogênese somática (ES), projetam-se como alternativas promissoras para a propagação *in vitro* dessa espécie, visando subsidiar programas futuros de melhoramento genético e conservação de germoplasmas. Além disso o conhecimento do controle genético das características relacionadas aos processos de regeneração *in vitro* é fundamental para a seleção de genótipos mais responsivos. A partir de estimativas de parâmetros genéticos *in vitro*, podemos identificar a natureza de ação de genes envolvidos no controle dos caracteres, e avaliar a eficiência de diferentes estratégias de melhoramento para obtenção de ganhos genéticos e manutenção de uma base genética adequada nas populações (CRUZ et al., 2006; OLIVEIRA et al, 2015)

Assim, o estabelecimento de forma inédita de um protocolo eficiente de micropropagação de bacurizeiro, contribuirá para superar os problemas de autoincompatibilidade e germinação das sementes, e viabilizará as pesquisas futuras sobre a propagação e o melhoramento genético da espécie. Com a tecnologia proposta, ocorrerá ainda a valorização da espécie nativa, o que em última análise, se traduzirá em retorno socioeconômico para os produtores locais.

Desta forma a presente tese teve como objetivo desenvolver estratégias para a reprodução *in vitro* de *Platonia insignis* por embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturos e avaliação da variabilidade genética de diferentes acessos coletados no Estado do Maranhão. Os estudos realizados e os resultados obtidos estão apresentados na forma de cinco capítulos. O capítulo I refere-se a uma revisão de literatura sobre a espécie em estudo, suas características, seu processo de domesticação até as técnicas biotecnológicas. Os capítulos II, III e IV referem-se aos protocolos de indução da calogênese e avaliação da variabilidade genética *in vitro* de acessos de bacurizeiro. No capítulo V apresentamos as considerações finais acerca do estudo.

Hipóteses

H₁: Os acessos de *Platonia insignis* podem ser estabelecidos *in vitro* utilizando embriões zigóticos de frutos imaturos como explantes;

H₂: As respostas de diferenciação *in vitro* de *P. insignis* serão aumentadas pela adição de putrescina no meio de cultura.

H₃: *Platonia insignis* pode ser propagado por meio da embriogênese somática.

H₄: Acessos de *P. insignis* de diferentes localidades do estado do Maranhão, apresentam variabilidade genética quanto a resposta das características relacionadas a propagação *in vitro*.

Objetivos

Objetivo geral

Desenvolver estratégias para a propagação *in vitro* de *Platonia insignis* por meio da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos, caracterizar o processo de indução através de estudos anatômicos e histoquímicos e estudar o controle genético de características relacionadas à calogênese, bem como a variabilidade genética entre diferentes acessos do estado do Maranhão.

Objetivos específicos

1. Desenvolver um protocolo de estabelecimento *in vitro* de *P. insignis* através de frutos imaturos.
2. Caracterizar diferentes acessos de *P. insignis* quanto à sua capacidade de resposta *in vitro*;
3. Estabelecer a combinação de reguladores de crescimento mais eficaz na indução de embriogênese somática do *P. insignis*;
4. Avaliar a eficiência da poliamina putrescina no protocolo de regeneração *in vitro* de *P. insignis*;

5. Determinar a melhor combinação de reguladores de crescimento na maturação/conversão de embriões somáticos de *P. insignis*;

Referências

- AGUIAR, L. P. **Qualidade potencial de utilização de bacuris (*Platonia insignis* Mart.) oriundos da Região Meio-Norte**. 2006. 122p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimento) - Universidade Federal do Ceará. [2006].
- ARAÚJO, J. R. G.; Carvalho, J. E. U. de.; Martins, M. R. **Porta-enxertos para o bacurizeiro: situação e perspectivas**. Bacuri: (*Platonia insignis* Mart.-Clusiaceae). Agrobiodiversidade / Maria da Cruz Lima (organizadora). – São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 210 p. 2007.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis na Amazônia**. 7 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 282p. 2010.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. (2004) **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v. 1. Viçosa: UFV, 480.
- DANIEL, J. **Tesouro descoberto no máximo rio Amazonas**. Rio de Janeiro: Contraponto, v.1, p.450. 2004.
- HOMMA, A.K.O.; MENEZES, A.J.E.A.; CARVALHO, J.E.U.; MATOS, G.B. Manejo de rebrotamento de bacurizeiros nativos no Estado do Pará: recuperação de áreas degradadas com geração de renda e emprego. **Inc. Soc.**, Brasília, v. 6 n. 2, p.77-83, 2013.
- HOMMA, A.K.O. et al. (Ed.). **Manual de manejo de bacurizeiros**. 2 ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 37p. 2010.
- OLIVEIRA, A. S.; REIS, E. F.; MIRANDA FILHO, J. B.; MENDES, U. C.; RODRIGUES, L. O. Genetic variability, and yield potential of three semiexotic maize (*Zea mays* L.) Populations variabilidade genética e potencial produtivo em três populações semiexóticas de milho (*Zea mays* L.). **Bioscience Journal**. v.31 n6 p.1609–1617. 2015.
- SANTOS, R. F.; ARAUJO, J. R. G.; NEVES JÚNIOR, A. C. V.; MELO, P. A. F. R.; SILVA, L. P. V. S.; SANTOS, W. F. S.; MENDES, B. M. M.; ROCHA, A. E.; FURTADO, M. B.; MESQUITA, M. L. R. Biometric and Chemical Characterization of Fruits From Selections of *Platonia insignis* Mart., Native of the State of Maranhão, Brazil. **Journal of Agricultural Science**.v 11 p376-384. 2019.

SHANLEY, P. CLEMENTE, C. R.; CARVALHO J. E. U.; HOMMA, A. K. O. MENEZES, A. J. E. A. **Amazonian fruits: How farmers nurture nutritional diversity on farm and in the forest.** In: STHAPIT, B. et al. (Ed.). *Tropical Fruit Tree Diversity: Good Practices for in situ and onFarm Conservation.* New York: Routledg., p.147-160. 2016.

SILVA, V. K. L.; FIGUEIREDO, R. W.; BRITO, E. S.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, E. A. T. Estabilidade da polpa do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) congelada por 12 meses. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1293-1300, 2010.

SOUZA, V.A.B. de; VALE, E. de M.; GOMES, S.O.; COSTA, M. do P.S.D.; GUIMARÃES, A.R.C. Efeito da concentração de sacarose na germinação *in vitro* do pólen de cinco acessos de bacurizeiro (*Platonia insignis* MART.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.677-684,2013.

Capítulo I

Bacurizeiro: da semi domesticação à micropropagação. Uma revisão
Artigo que será submetido à Revista Trees

1. Introdução

O Brasil é um dos principais centros de diversidade de espécies frutíferas nativas do mundo, abrangendo mais de 56.000 espécies vegetais já catalogadas, que compreendem cerca de 19% da flora mundial (SOUZA et al., 2015). Grande parte dessa diversidade ecológica está localizada na região Amazônica, com flora rica e variada, além de muitos endemismos, o que evidencia a existência de considerável potencial genético de espécies nativas produtoras de frutos, necessitando de domesticação e melhoramento (PINTO, 1993). Essas espécies frutíferas nativas da Amazônia brasileira, são consideradas alternativas viáveis para o manejo e uso sustentável como fonte de renda das populações, pois movimentam parte da agroindústria local, através do extrativismo vegetal (ALVAREZ e POTIGUARA, 2013).

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma fruteira arbórea, nativa da Amazônia oriental brasileira (SOUZA et al., 2013), que apresenta elevado valor socioeconômico (PONTES et al., 2017). O Maranhão é um dos centros de dispersão da espécie, que também é encontrada no Pará, Mato Grosso, Piauí e Goiás. As demandas do mercado para a polpa do bacuri são semelhantes às do açaí e do cupuaçu, em que se verifica um evidente conflito entre a oferta natural e a crescente pressão da demanda dessas fruteiras devido sua sazonalidade (MENEZES et al., 2012), assim a produção de bacuri não têm sido suficiente para atender à crescente procura do mercado consumidor (SILVA et al., 2010).

Apesar da relevante importância econômica da espécie, o bacurizeiro encontra-se em ameaça de erosão genética devido ao uso da terra pela agricultura e escassez de técnicas adequadas de propagação clonal. Por se tratar de uma espécie predominantemente alógama, os poucos plantios de bacurizeiro existentes são heterogêneos, e com produção irregular (SARAIVA et al., 2013). Além disso, apresenta germinação lenta, com cerca de 500 a 700 dias para que o processo germinativo se complete (SARAIVA et al., 2013). Dentre as técnicas utilizadas para propagação do bacurizeiro, a enxertia e outros métodos de propagação assexuada são de uso limitado, em decorrência de problemas de autoincompatibilidade genética, fenômeno comum em espécies da flora amazônica. No caso da propagação sexuada, o principal fator limitante é o tempo requerido para que as sementes completem o processo de germinação.

Nos últimos anos, tem-se despertado o interesse para a importância da domesticação do bacurizeiro (AGUIAR, 2006; CARVALHO et al., 2003; FERREIRA et

al., 2004; SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2013), com intuito de adequar técnicas de manejo e propagação, como estudos sobre a propagação através de sementes e mudas e enxertia (CARVALHO e MULLER, 2007). Cabe destacar também o estudo de Araújo et al., (2007) sobre a compatibilidade de diferentes porta-enxertos da mesma família botânica de *P. insignis*. SILVA et al., (2020), por sua vez, estudaram técnicas de manejo de rebrotações de *P. insignis* em vegetação secundária. Todas essas técnicas contribuem para o aumento do potencial produtivo do bacurizeiro, mas ainda apresentam gargalos para uma propagação eficiente. Como uma alternativa viável e ainda inédita para a espécie, o cultivo *in vitro* demonstra grande potencial, pois através de técnicas da micropropagação, é possível utilizar pequenos segmentos de tecidos com alta capacidade de multiplicação, e assim, propagar milhares de mudas com elevado potencial produtivo. No bacurizeiro, essa ferramenta biotecnológica pode contribuir para aumentar a eficiência da produção de mudas de *P. insignis*, além de contribuir para a domesticação e melhoramento genético da espécie, com a propagação de genótipos superiores, e futuramente, instalação de bancos de germoplasma e jardins clonais.

O cultivo *in vitro* permite a obtenção de milhares de mudas a partir de uma única planta matriz selecionada, além da possibilidade de produção o ano todo, uma vez que esta técnica independe de mudanças sazonais (BORGES et al., 2009). A embriogênese somática é um dos exemplos das técnicas do cultivo *in vitro*, sendo muito indicada para espécies arbóreas que demoram para atingir a maturidade, possuem um ciclo longo e irregular de produção de sementes (ROCHA et al., 2011; PAIS, 2019). Contudo, o sucesso da produção *in vitro* depende do ajuste de um protocolo adequado para cada espécie ou variedade a ser micropropagada (ULISSES et al., 2011). A adequação de um protocolo para o cultivo *in vitro*, a partir da embriogênese somática, envolve a definição de doses e combinações de reguladores de crescimento, além do tipo de explante (GUERRA et al., 1999).

Apesar da eficiência muitas vezes alcançada pelo uso da embriogênese somática como técnica da propagação de espécies arbóreas, frequentemente diferentes genótipos não respondem de forma homogênea aos mesmos estímulos, o que chamamos de genótipo-especificidade da planta ou plantas genótipo-dependente. Portanto, além de um protocolo de cultivo *in vitro*, é imprescindível o conhecimento do controle genético das características relacionadas aos processos de regeneração *in vitro*, fundamental para a seleção de genótipos mais responsivos, conferindo mais garantias no estabelecimento de

um protocolo de micropropagação. Para os estudos de controle genético, estimativas de parâmetros genéticos podem nortear a natureza de ação de genes envolvidos no controle dos caracteres, e avaliar a eficiência de diferentes estratégias de melhoramento para obtenção de ganhos genéticos, e manutenção de uma base genética adequada nas populações (CRUZ et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2015).

Até o momento, não há estudos de protocolos de cultivo *in vitro* do *P. insignis*, tão pouco relatos de avaliação da sua variabilidade genética *in vitro*, técnicas estas que podem ajudar na superação de problemas de propagação característicos da espécie. Além de fornecer subsídios para estabelecimento de metodologias mais avançadas, favorecendo a implementação de sistemas de produção mais sustentáveis e a valorização da biodiversidade amazônica. Esta revisão traz os principais aspectos relacionados ao processo de domesticação do bacurizeiro, suas características morfológicas e produtivas, seus atuais métodos de propagação e entraves produtivos, e algumas técnicas biotecnológicas para sua propagação eficiente e sustentável.

2. O Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)

2.1 Aspectos botânicos e morfoanatômicos

A espécie *Platonia insignis* é conhecida popularmente como “bacurizeiro” ou “bacuri”, e pertence à família Clusiaceae, subfamília Clusioideae. Apesar da família botânica Clusiaceae abranger cerca de 800 espécies a 15 gêneros alocados em três tribos: Clusieae, Garcinieae e Symphonieae (STEVENS, 2001) dispersos em regiões tropicais e subtropicais do mundo, o gênero *Platonia*, ao qual pertence o bacurizeiro é um táxon único para essa espécie (CAVALCANTE, 1996; CLEMENT e VENTURIERI, 1990; LIMA et al., 2007; Silva et al., 2019).

As flores do bacurizeiro são grandes, actinomorfas e hermafroditas (Figura 1b) (LORENZI, 1992; SARAIVA et al., 2013), com colorações que podem variar entre branco, amarelo-claro e rosa-intenso (MENEZES, 2010; SARAIVA, 2012), distribuídas nas extremidades dos ramos, isoladas ou em grupos de 2 até 12, e dispostas em pedúnculos, o cálice é formado por cinco sépalas de cor verde e a corola por cinco pétalas (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018). Os estames são agrupados em cinco feixes, distribuídos de forma uniforme, unidos a base, cada um contendo numerosos estames, e a deiscência da antera é longitudinal, com demasiada quantidade de grão de pólen

(MAUÉS e VENTURIERI, 1996; CARVALHO e NASCIMENTO, 2018). Possuem ovário súpero, volumoso, com diâmetro em torno de 1,5 cm e comprimento 1,7 cm, com estigma situado, em alguns genótipos, em nível superior ao dos estames e em outros no mesmo nível ou um pouco abaixo, sendo constituído por cinco lóbulos (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018). Nos Estados do Piauí e Maranhão, a floração ocorre de julho a outubro, no entanto, ela pode variar nas demais regiões (SOUZA et al., 2000).

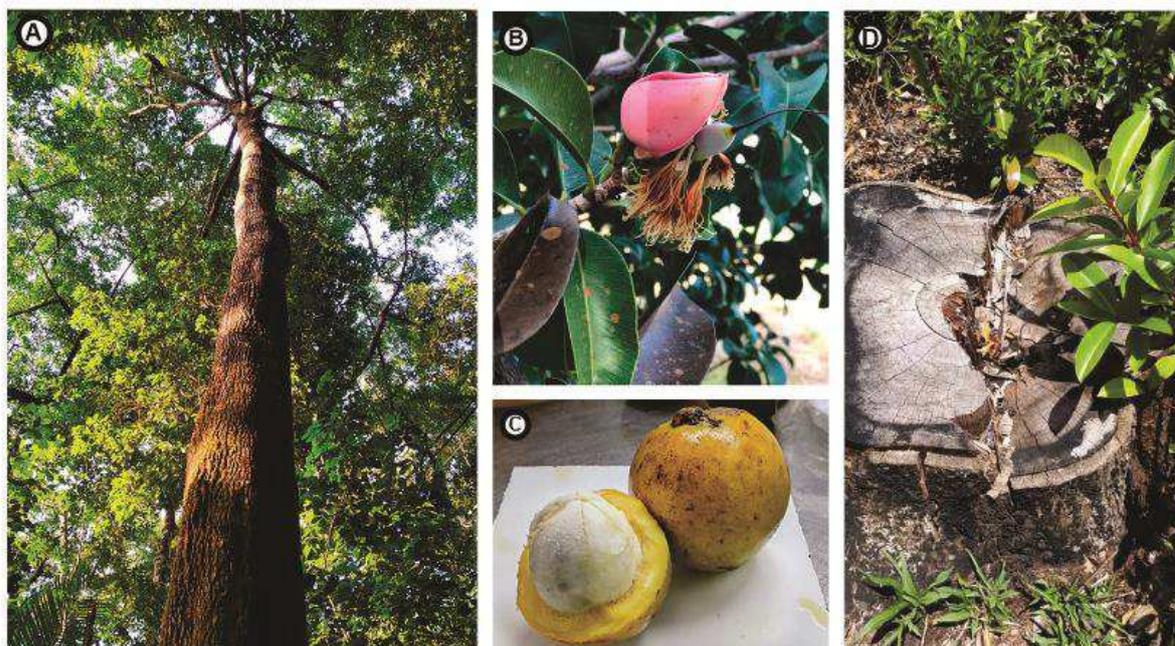


Figura 1. Árvore de *Platonia insignis* (a); flor (b); fruto maduro (c); e rebrotação radicular (d) em vegetação primária, no município de Santa Rita, Maranhão - Brasil.

O fruto do bacurizeiro é uma baga uniloculada, com formato arredondado, ovalado ou achatado (Figura 1c)(CAVALCANTE, 1996, GUIMARÃES et al., 1992; SINIMBÚ NETO, 2010), que contém em seu interior de uma a cinco sementes envolvidas pelo endocarpo, que se constitui na parte comestível do fruto (CARVALHO et al. 1998, MOURÃO e BELTRATI, 1995). O epicarpo é delgado e indivisível do mesocarpo. O mesocarpo é espesso e de consistência coriácea, repleto de vasos que, exsudam substância resinosa de cor amarela, quando cortado ou ferido. O conjunto formado pelo epicarpo e mesocarpo, popularmente denominado de casca, representa 70% do peso do fruto, com endocarpo de cor branca, aroma forte, sabor agridoce e desprovido de vasos lactíferos (SOUZA et al., 2000; SINIMBÚ NETO, 2010).

As sementes do bacurizeiro são oblongas-angulosas, grandes, ricas em óleo, apresentam formato elipsoidal (CARVALHO, 2007). A intensidade das angulosidades,

depende do número de sementes que se formam no fruto. A face onde se situa a linha da rafe é, em geral, ligeiramente côncava e o lado oposto convexo. No caso de sementes, oriundas um mesmo lóculo do ovário, o formato é bastante irregular e dependente do número de sementes que se formam no lóculo (MOURÃO e BELTRATI, 1995; CARVALHO, 2007). O tegumento apresenta coloração amarronzada, com vários feixes vasculares fáceis de serem visualizados devido a sua coloração mais clara, principalmente o que acompanha a linha da rafe, devido a sua robustez (CARVALHO, 2007). O hilo é de coloração mais escura que o tegumento, com pequena porção central mais clara e formato arredondado. A micrópila está situada próxima ao hilo sobre uma pequena protuberância triangular (CARVALHO, 2007).

O embrião do bacurizeiro é constituído unicamente pelo eixo hipocótilo-radícula, sendo os cotilédones vestigiais. Os tecidos de reserva estão armazenados no longo e espesso eixo hipocótilo-radícula (MOURÃO e BELTRATI, 1995; CARVALHO e NASCIMENTO, 2018). As sementes se enquadram no grupo das recalcitrantes e apresentam processo germinativo bem peculiar, com emergência rápida da raiz primária e lenta e desuniforme do epicótilo. A emergência da primeira estrutura ocorre entre 15 e 35 dias após a sementeira e, a da segunda, aos 180 dias e estabiliza-se por volta de 900 dias. Por ocasião da emergência do epicótilo, a raiz primária apresenta comprimento de 175 cm (CARVALHO e MULLER, 2011; CARVALHO e NASCIMENTO, 2018).

A espécie *P. insignis* é predominantemente arbórea, caducifólia, alógama, com autoincompatibilidade esporofítica, pode atingir mais de 30 metros de altura, e 2 metros de diâmetro de tronco em indivíduos adultos (Figura 1C) (HOMMA et al., 2010). Seu tronco é retilíneo, de forma circular e com ramificações somente no seu terço terminal; com folhas simples, elípticas e com disposição oposta cruzada, nervuras secundárias copiosas e próximas, terminando em uma nervura que acompanha toda a periferia da folha, e pecíolos curtos com comprimento variando entre 1 e 2 cm (SINIMBÚ NETO, 2010).

2.2 Centro de origem e distribuição

O bacurizeiro é uma espécie de origem amazônica (HUBER, 1904) nativa do Brasil, com distribuição abundante nas regiões Norte e Nordeste. Para além das fronteiras brasileiras, a espécie é encontrada, ainda que de forma escassa, nas áreas amazônicas dos

países: Peru, Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa (NASCIMENTO et al., 2007), Paraguai e Equador (CAVALCANTE, 1996) (Figura 2).

Do Estado do Pará, o bacurizeiro se dispersou em direção ao Nordeste do Brasil, alcançando os cerrados e os chapadões dos estados do Maranhão e do Piauí, onde forma povoamentos densos em áreas de vegetação secundária. Na direção sul, a dispersão atingiu os estados do Tocantins e do Mato Grosso, chegando a romper as fronteiras do Brasil, pois trata-se de uma espécie nativa, porém não endêmica do Brasil, com registro de ocorrência no Paraguai e no Equador.

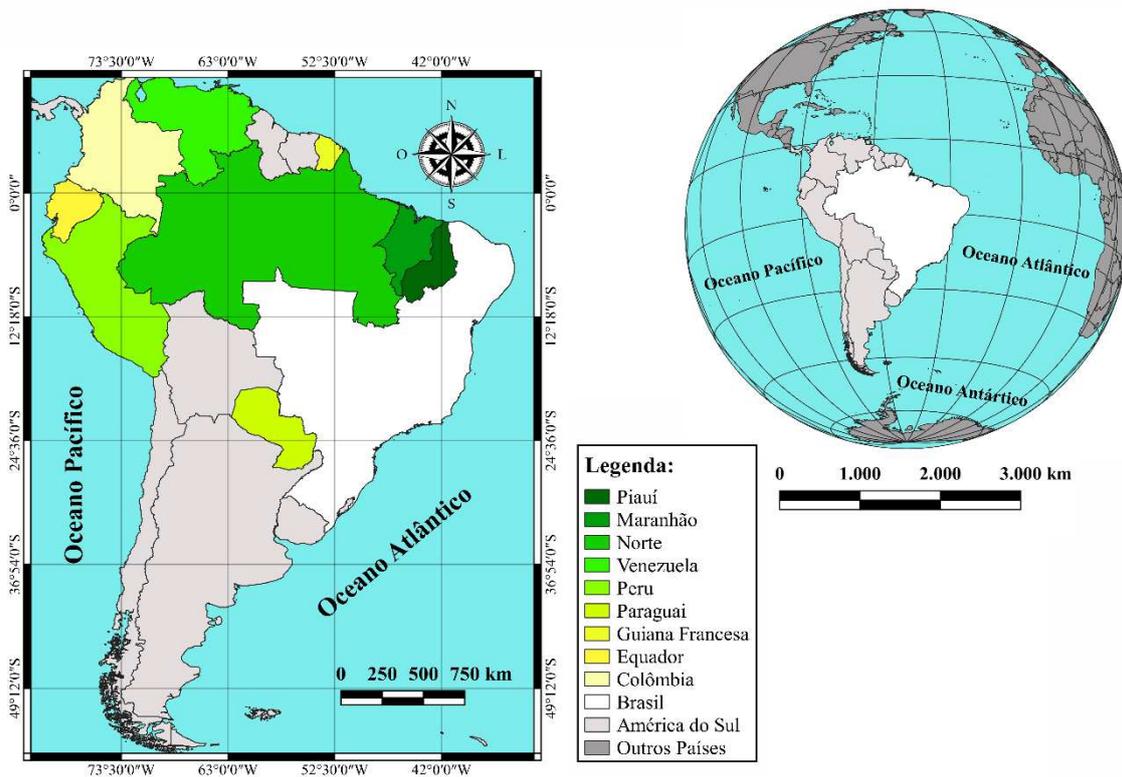


Figura 2. Mapa de distribuição de *Platonía insignis* no Brasil e América Latina.

A frutífera têm seu centro de dispersão no estado do Pará, mas, também é encontrada espontaneamente nos estados de Mato Grosso, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Piauí (CAVALCANTE, 1996; COSTA JUNIOR, 2011; MORAES e GUTJAHR, 2011) (Figura x). Dentre esses estados, ocorre de forma mais abundante no estado do Pará, com maiores concentrações nas regiões Salgado, Bragantina e Ilha de Marajó. Além do estado do Pará, o bacuri também assume grande importância econômica no Maranhão e Piauí, onde concentram-se expressivas populações naturais da espécie em áreas de vegetação secundária (MATOS, et al., 2009; SHANLEY et al., 2010).

No Maranhão, o bacurizeiro ocorre em maiores populações, nas áreas limítrofes aos estados do Tocantins e o Pará, entre os municípios de Carolina e Imperatriz, acompanhando o curso dos rios Tocantins e Gurupi. É abundante no município de Carutapera, onde, em algumas áreas, é possível encontrar número superior a 200 indivíduos adultos por hectare. Também é encontrada no município de São Luís, e na região mais ao leste do estado, sobretudo nos municípios de Mirador, Matões, Timom, Caxias, Aldeias Altas e Coelho Neto dentre outros (NASCIMENTO et al., 2007).

Conforme mapa de tipos climáticos da Amazônia, o bacurizeiro concentra-se em regiões com climas do tipo Ami (clima de transição entre Afi e Awi, caracterizado com estação seca de dois a três meses, mas com precipitações pluviométricas superiores a 2000 mm anuais) e clima Awi (com estação seca definida de cinco a seis meses e precipitação pluviométrica inferior a 2000 mm anuais), segundo a classificação de Koeppen (NASCIMENTO et al., 2007).

2.3 Importância socioeconômica e potencial industrial

O bacurizeiro apresenta elevado valor socioeconômico para as populações locais da região amazônica oriental brasileira, que incrementam seus rendimentos através do extrativismo da sua madeira e de seus frutos, sendo a polpa o seu principal subproduto (AGUIAR, 2006; SOUZA et al., 2013). A produção de polpa de bacuri têm origem basicamente na coleta dos frutos de árvores oriundas de regeneração natural, que escaparam da expansão de povoados, do avanço da agricultura e da pecuária e da extração madeireira (HOMMA et al., 2010).

O fruto do bacurizeiro é um pouco maior que uma laranja (Figura 1c), contém polpa agridoce, rica em potássio, fósforo e cálcio, que é consumida diretamente ou utilizada na produção de doces, sorvetes, sucos, geleias, licores e outros produtos. A produção de polpa de bacuri tem origem em sua maioria na coleta dos frutos de árvores oriundas de regeneração natural, que resistiram à expansão de comunidades, do avanço da agricultura e da pecuária e da extração madeireira no litoral do Pará e do Maranhão (HOMMA et al., 2010).

A polpa do bacurizeiro é rica em propriedades antioxidantes, e sua semente possui altos teores de ácidos graxos (LUSTOSA et al., 2018) caracterizando-o como excelente emoliente e umectante (COSTA JUNIOR, 2011; MORAIS, 2012) utilizado em

tratamentos dérmicos na medicina popular e como matéria prima na indústria de cosméticos e fármacos (CARVALHO, 2008; SOUZA et al., 2007; RUFINO et al., 2010; VIANA et al., 2013; YAMAGUCHI et al., 2014; SANTOS et al., 2019; DIEL et al., 2021). Sua casca também pode ser utilizada para a fabricação de cremes, sorvetes e doces, aumentando significativamente o aproveitamento do fruto, porém, este processo só deve ocorrer após a retirada da resina presente em sua casca (AGUIAR, 2008). Essas características organolépticas, farmacológicas e alto valor nutricional, conferem aos frutos de *P. insignis* a classificação como fruto nobre, e justificam a sua ampla aceitação no mercado tanto para consumo *in natura* quanto para produtos industrializados ou com algum grau de processamento (SANTOS et al., 2019). Portanto, a médio ou a longo prazos, essa espécie pode estabelecer-se como uma nova e excelente alternativa para os mercados interno e externo de frutas (SILVA et al., 2010).

A madeira das árvores de bacuri, é considerada nobre, com coloração bege-rosada, pertence ao grupo de madeiras pesadas, com densidade entre $0,85\text{g/cm}^3$ e $0,90\text{g/cm}^3$, também apresenta variadas aplicações nas construções civis e navais das comunidades locais de ocorrência da espécie (HOMMA et al., 2010; HOMMA et al., 2013).

Segundo Araújo (2007), ainda são escassos os cultivos comerciais dessa espécie, o que se deve às dificuldades da produção de mudas e das técnicas de manejo. Como resultado, a maior parte da produção é oriunda da atividade extrativista, o que não tem sido suficiente para suprir à demanda do mercado consumidor (SILVA et al., 2010), principalmente com a crescente valorização dos seus subprodutos, como cosméticos e fármacos.

Para as indústrias alimentícias e cosméticas, em particular, há grande interesse no perfil químico dos bioprodutos do fruto do bacurizeiro, com ênfase para os terpenos e compostos fenólicos como principais bioativos (UEKANE et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2020), que são de grande interesse industrial devido ao seu potencial antioxidante, utilizando-os como conservantes de alimentos e formulações de cremes e produtos antienvelhecimento da pele (CLERICE e CARVALHO-SILVA, 2011).

Ainda que com produção incipiente, a valorização socioeconômica do fruto do bacurizeiro se deve ao incremento de renda para a agricultura familiar, sendo a base econômica desses agricultores nos períodos de safra produtiva da espécie, importância esta que vai além de atributos econômicos, mas também compreende fonte de segurança alimentar para os pequenos agricultores locais.

2.4 Métodos de propagação

Dentre os fatores que limitam a utilização e os avanços na domesticação do bacurizeiro, a propagação é o mais importante (SILVA, 2018). O *P. insignis* é um atípico caso de espécie arbórea amazônica, que possui tanto reprodução sexuada, via sementes, quanto assexuada por meio de enxertia e brotações radiculares (HOMMA et al., 2010).

A propagação via sementes é característica de populações de bacurizeiros em áreas de vegetação primária, tendo baixas densidades populacionais da planta, ou de raros plantios de pomares da espécie. Embora seja o mais utilizado, esse método de propagação apresenta inúmeros problemas, pois a espécie apresenta um longa fase de juvenildade, podendo durar de 10 a 12 anos, a partir do qual iniciam-se floração e frutificação. Cabe ressaltar ainda, que o processo germinativo é lento e desuniforme (CARVALHO et al., 1998a, 1998b; MORAES et al., 1994), pois o tempo para a emergência da radícula de 50% de um lote é de 17 dias, enquanto que para a emergência do caulículo, é de até 600 dias (VILLACHICA, 1996). A demora na germinação é decorrente do fato de que a plúmula das sementes apresentam um tipo particular de dormência, sendo o sítio ativo dessa característica que tem forte influência genética, existindo genótipos cujas sementes apresentam porcentagem de germinação superior a 30% (CARVALHO et al., 1998).

Outro fator que limita à implantação de pomares com mudas oriundas de sementes, é o fato de *P. insignis* ser uma espécie alógama, que condiciona grandes variações entre plantas de um pomar, devido à segregação e à recombinação gênica, mesmo quando as sementes são provenientes de um só indivíduo (MAUÉS e VENTURIERI, 1996).

Na produção de sementes de bacurizeiro, o aspecto mais importante é a utilização de sementes novas, pois ela apresenta comportamento recalcitrante, perdendo completamente o seu poder germinativo quando o teor de umidade cai abaixo de 16% (CARVALHO et al., 1998a). O teor de umidade das sementes de bacuri geralmente varia de 35% a 42%, portanto, para a obtenção de altos índices de germinação, é recomendado que as sementes sejam utilizadas logo após serem extraídas dos frutos. Na impossibilidade de uso imediato, pode-se conservá-las por período de 10 a 12 dias em recipientes contendo serragem umedecida ou vermiculita (MENEZES et al., 2012).

Já em áreas de vegetação secundária, as brotações de raízes (Figura 1d) compreendem a principal forma de reprodução, chegando a ocuparem completamente a superfície do solo. São plantas regeneradas a partir da derrubada da planta-mãe ou após

a derrubada de outras árvores no entorno, abrindo clareiras na mata, o que possibilita encontrar altas densidades populacionais de bacurizeiro (SHANLEY e MEDINA, 2005; NASCIMENTO et al., 2007), chegando a atingir valores superiores a 20 plantas/m² (ARAUJO et al., 2010).

Outro método de propagação atual, é o uso de plantas enxertadas de *P. insignis*, que começam a produzir entre 3 e 5 anos de idade (CALZAVARA, 1970; CARVALHO et al., 1999), e ainda apresentam porte reduzido, o que facilita o processo de colheita e manejo cultural (NETO, 2010). O processo de propagação assexuada mais utilizado é a enxertia por garfagem no topo em fenda cheia, em que envolve primeiramente a formação do porta-enxerto, que é o próprio bacurizeiro obtido por semente ou por regeneração da raiz primária, sendo considerado método de fácil execução e maior rendimento de mão-de-obra, proporciona maior percentagem de sucesso (CARVALHO e MÜLLER, 2007). A brotação dos enxertos inicia-se 20 dias após a enxertia, podendo, prolongar-se por até 80 dias, ocasião em que a porcentagem de enxertos brotados atinge valor em torno de 80%. (CARVALHO et al., 2002). Recentemente, têm se verificado que o uso de frutíferas enxertadas, de porte mais baixo e cultivo adensado, apresentam maior tolerância a patógenos de solo e maior adaptação à variação de altas temperaturas no solo e a mudanças climáticas nos trópicos (MNG'OMBA e BEEDY, 2013) e possibilita que as plantas entrem em fase reprodutiva cinco a seis anos após o plantio (PERES et al., 1997).

2.5 Conservação

Embora a preservação de uma espécie arbórea seja normalmente alcançada protegendo-se seu habitat natural (REED et al., 2011), as dificuldades na propagação do bacurizeiro, associado às estratégias reprodutivas da espécie; apelam a uma abordagem biotecnológica para promover eficazmente sua conservação (SILVA et al., 2012; STRASSBURG et al., 2017). Entretanto as pesquisas referentes à clonagem e multiplicação em larga escala de espécies arbóreas nativas ainda contemplam um reduzido número de espécies (SANTOS et al., 2011), e geralmente destinam-se a genótipos de difícil propagação pelos métodos convencionais (FICK, 2007; PELEGRINI et al., 2011), e a aqueles que produzem compostos metabólitos secundários (FUMAGALI et al., 2008), mas principalmente à conservação de germoplasmas *in vitro* de espécies ameaçadas de extinção (NUNES et al., 2003; NOLETO e SILVEIRA, 2004; SOUZA e PEREIRA, 2007; MALOSSO et al., 2012).

No caso do *Platonia insignis*, muitas pesquisas foram desenvolvidas pelas EMBRAPAS Meio Norte e Amazônia Oriental com vistas ao desenvolvimento de tecnologias de propagação e manejo de bacurizeiros; a fim de garantirem a preservação de parte de sua variabilidade genética (SOUZA et al., 2000), podemos citar: o manejo de rebrotamento de bacurizeiros nativos para recuperação de áreas degradadas (HOMMA et al., 2013), caracterização de sistemas de manejos de bacurizeiro desenvolvidos por agricultores familiares no estado do Pará (MENEZES et al., 2010). Além de sistemáticos experimentos em seleção e hibridização de germoplasma na estação experimental em Belém (CARVALHO e MULLER, 2007), promovendo a conservação de germoplasma de bacurizeiro predominantemente na forma “*ex situ*”. O maior Banco de germoplasma dessa espécie está localizado na Embrapa Amazônia Oriental, com acessos oriundos do Estado do Pará e da Pré-Amazônia Maranhense. Os acessos estão estabelecidos nos Campos Experimentais dessa instituição nos municípios de Tomé-Açu e Belém, no Pará. Outro Banco de Germoplasma de bacurizeiro, sob a responsabilidade da Embrapa Meio-Norte, está localizado no nordeste do Brasil, mais precisamente na cidade de Teresina, Piauí (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018).

Embora haja avanços nos últimos anos no intuito de conservação *ex situ* de bacurizeiro, não há registros na literatura sobre a manutenção e estudo de técnicas da micropropagação do germoplasma da espécie, destacando a importância de estudos que visem manter genótipos preservados e que acelerem as metodologias de propagação contribuindo também para sua domesticação e uso sustentável.

A micropropagação de espécies florestais nativas apresenta-se com potencial para a conservação de germoplasma *in vitro*, limpeza clonal, produção massiva de mudas de espécies, recuperação de áreas, aceleração de programas de melhoramento pela multiplicação de clones, além de atuar como base para outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética (OLIVEIRA et al., 2013).

3. Cultivo *in vitro*

3.1 Embriogênese somática de espécies arbóreas

O cultivo *in vitro* é uma técnica biotecnológica que compreende um conjunto de metodologias, que irão permitir o crescimento e a multiplicação de células, tecidos e órgãos de uma planta a partir de um fragmento da planta chamado de “explante”,

associado a um meio de cultivo nutritivo e sob condições assépticas (CARVALHO e VIDAL, 2003), baseado na totipotência das células vegetais (TAUTOROS et al., 1991; PALMA et al., 2011).

A propagação de plantas por cultivo *in vitro* geralmente é alcançada através das técnicas de organogênese e embriogênese somática (Somatic Embryogenesis - SE), sendo a última, um processo mais complexo de diferenciação, pois é um evento morfogênético onde uma célula somática tem a capacidade de produzir uma planta inteira sem a fusão de gametas (FEHÉR et al., 2003). Assim, a SE é um importante método de regeneração especialmente importante para plantas arbóreas lenhosas, que apresentam dificuldade de propagação por outros métodos (MERKLE e DEAN, 2000; VERDEIL et al., 2007; CHIANCONE e GERMANÀ, 2013; Pais, 2019).

A SE reproduzida por condições *in vitro* é um processo semelhante à embriogênese zigótica, onde uma única célula ou mesmo um grupo de células podem ser precursoras de embriões (AMIRATO, 1983; DODERMAN et al., 1997), com estruturas bipolares contendo os meristemas apicais da raiz e do caule em polos opostos (KARAMI et al., 2009; ROCHA e DORNELAS, 2013).

As metodologias para obtenção de SE consiste quase sempre em meios de cultura suplementados com combinações de reguladores de crescimento de plantas (PGR's) (GARCIA et al., 2019).

Além disso, para o sucesso do protocolo de SE, é essencial definir o tipo de explante a ser utilizado, bem como a época de coleta, uma vez que vários tecidos de uma mesma planta podem resultar em diferentes respostas quanto à indução (VENDRAME et al., 1994). Vários têm sido os tecidos utilizados como fonte de explantes para obtenção de embriões somáticos, tais como folhas e inflorescências imaturas, e embriões zigóticos ou imaturos. De forma geral os embriões imaturos como explante, têm apresentado melhores respostas embriogênicas (PAIVA NETO et al., 2003), em variadas espécies arbóreas (WATT et al., 1999; GUERRA et al., 2000; SANTA-CATARINA et al., 2001; SHARMA et al., 2005; CORREDOIRA et al., 2006). Além disso a cultura *in vitro* de embrião zigótico é uma ferramenta experimental para estudar muitos aspectos dos eventos fundamentais no desenvolvimento embrionário (HASLAM e YEUNG, 2011).

A técnica da SE compreende um protocolo com várias etapas: indução, multiplicação, desenvolvimento, maturação, germinação e conversão de plantas. Todas essas etapas são caracterizadas por eventos fisiológicos, morfológicos e moleculares distintos (ZAVATTIERI et al., 2010). Sabe-se ainda que para cada etapa de diferenciação

da SE, há a atuação de PGR's específicos, como por exemplo as auxinas, que são requeridas principalmente nas fases de indução de SE e multiplicação de embriões (LLOYD et al., 1980; PASTERNAK, 2002; VON DRÁKOVÁ et al., 2011).

Como aspectos práticos, a embriogênese somática tem sido reconhecida como uma abordagem ideal para propagação em massa clonal, melhoramento genético, especialmente de espécies lenhosas que apresentam um ciclo de vida muito longo. Além de ser uma ferramenta muito útil para a criopreservação de germoplasma (PAIS, 2019). Além disso, ela pode ser utilizada como estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião, e modelo para estudar sistemas subjacentes à embriogênese, como os eventos moleculares, citológicos, fisiológicos e de desenvolvimento (DODEMAN et al., 1997; IKEUCHI et al., 2015; OZUDOGRU e LAMBARDI, 2016). As culturas embriogênicas obtidas pela técnica da SE, representam um sistema bastante eficiente para a aplicação de técnicas de biotecnologia, como transformação genética, indução e seleção de mutações e regeneração de plantas haploides (RAEMARKERS et al., 1995).

Inúmeras espécies lenhosas têm sido alvo de estudos quanto à embriogênese somática, como por exemplo: *Citrus* sp. (KOCHBA et al., 1977); *Pinus taeda* (BECWAR et al., 1990); coníferas (BONGA, 1995), *Coffea* sp. (NAKAMURA et al., 1994), *Bertholletia excelsa* (CORREDOIRA et al., 2006, 2006a); *Theobroma cacao* (ALEMANNO et al., 2008); *Quercus robur* (CORREDOIRA et al., 2006); e plantas lenhosas em geral (YUAN et al., 2016).

Por tais atributos biotecnológicos citados acima, a embriogênese somática é o método mais utilizado para a propagação *in vitro* de plantas lenhosas (Guan et al., 2016), com alto grau de propagação (GRUPTA et al., 1993; JAIN e ISHII, 1998) mostrando-se uma alternativa promissora para *P. insignis*.

3.2 Fatores indutores da embriogênese somática: Reguladores de crescimento

Um dos aspectos mais característico da SE é a diversidade de fatores físicos e químicos que podem induzir os processos, dentre eles os reguladores de crescimento são notadamente os mais explorados (FEHÉR, 2006; ZAVATTIERI et al., 2010; FEHÉR, 2015; NIC-CAN et al., 2016). Os reguladores de crescimento (Plant Growth Regulators - PGR's) desempenham um papel central na coordenação da morfogênese e desenvolvimento dos órgãos reprodutivos das plantas, particularmente na cascata de

transdução de sinal que leva à reprogramação gênica (DUDITS et al., 1991; WU et al., 2017).

Assim, a SE *in vitro* é dependente dessa série de interações entre diferentes PGR's principalmente auxinas isoladas ou combinadas com citocininas. Sabe-se que essas duas classes de reguladores são centrais nos processos de divisão, diferenciação e rediferenciação celular, estando envolvidas na aquisição da competência embriogênica (ZENG et al., 2007; FÉHER, 2015).

As citocininas exógenas têm papel na indução da divisão e controle celular, atuando na morfogênese *in vitro* (GEORGE et al., 2008). Já as auxinas se destacam como os PGR's mais comumente utilizados na indução da embriogênese somática, bem como na indução de calos e no controle da regeneração de órgãos (NIC-CAN e LOYOLA-VARGAS, 2016). Isso resulta em uma série de divisões celulares que induzem o crescimento polarizado ou crescimento desorganizado de células que originarão os calos, levando à embriogênese somática direta ou indireta, respectivamente (Sharp et al., 1980; DUDITS et al., 1991). Os efeitos das auxinas na embriogênese envolvem a aquisição de competência e regulação da metilação do DNA, com efeitos estimuladores na divisão celular e diferenciação (VON ADERKAS e BONGA, 2000).

O PGR mais amplamente utilizado é um herbicida auxínico, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que apresenta atividade semelhante a auxina endógena muito forte (OVERBEEK et al., 1951). A característica única do 2,4-D é que é ao mesmo tempo um regulador de crescimento de plantas e um herbicida indutor de estresse e essas propriedades contrastantes podem contribuir para sua eficiência embriogênica (FÉHER et al., 2005; SONG, 2013). Isso porque um dos fatores de iniciação das respostas embriogênicas é a indução estressante às células vegetais (GLIWICKA et al., 2013). Outras classes de PGR's como o etileno, o ácido abscísico e o ácido giberélico, também estão envolvidas nos processos de maturação e germinação de embriões somáticos em espécies lenhosas (DE-LA-PENÃ et al., 2015; KUMAR et al., 2017).

As giberelinas são consideradas promotores da germinação, estas atuam no crescimento vegetativo do embrião, mobilizando reservas para o enfraquecimento do endosperma que cobre o embrião e bloqueia seu crescimento, são encontradas em várias partes das plantas, como, raízes, folhas jovens, sementes em fase de germinação e nos frutos (LAVAGNINI et al., 2014). Sua ação está relacionada à síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos, sendo expansivas e de enzimas hidrolíticas de reserva nutritiva contida no endosperma, como a amilase (PAIXÃO, 2019).

As poliaminas (PA's) são pequenas moléculas alifáticas policatiônicas contendo grupos aminos que são capazes de interagir eletrostaticamente com macromoléculas, tais como ácidos nucleicos, fosfolipídios, componentes da parede celular e proteínas (BARON e STASOLLA, 2008; TIBURCIO et al., 2014). Putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) são as principais poliaminas, e estão envolvidas em uma variedade de processos cruciais no crescimento e desenvolvimento de plantas (EVANS e MALMBERG 1989), sendo associados à regulação de processos fisiológicos, como organogênese, embriogênese, desenvolvimento de flores, senescência, metabolismo secundário, maturação e desenvolvimento de frutos, bem como respostas a estresses bióticos e abióticos (BAIS et al., 2002; AHMAD et al., 2012). Além disso as PA's também regulam o programa de morte celular e apoptose (KUEHN e PHILLIP, 2005).

As PA's podem ser considerados reguladores de crescimento vegetal ou mensageiros hormonais secundários, apesar de serem detectados em quantidades significativamente maiores nas células vegetais quando comparados aos hormônios vegetais propriamente ditos (SILVEIRA et al., 2006).

Dentre as poliaminas, a putrescina (composto de diamina), tem grande relevância, pois atua como precursora para as outras poliaminas (EVANS e MALMBERG 1989; EVANS e MALMBERG 1989; SMITH, 1990) sendo sintetizada diretamente da ornitina descarboxilase (inibida por a-DL-diflurometilornitina DFMO) ou indiretamente da arginina descarboxilase (inibida por a-DL-diflurometilarginina DFMA) (KALLIO e MCCANN 1981).

Nas plantas, as poliaminas podem ocorrer na forma solúvel, como bases livres ou conjugadas, associadas com moléculas pequenas, tais como ácidos fenólicos e, na forma insolúvel, ligada a macromoléculas, como as proteínas (PAPADAKIS et al., 2005). O papel das poliaminas e seu envolvimento em processos morfogenéticos tem sido estudado, principalmente pela aplicação de poliaminas exógenas e por correlação temporal e espacial da variação nos conteúdos destas substâncias associada com as diferentes fases da morfogênese (Rivero, 2006). As poliaminas foram sugeridas como moléculas cruciais que aumentam a proliferação e regeneração celular em plantas (Arun et al., 2016).

Recentemente aumentou-se o interesse e pesquisa sobre as PA's aplicadas na melhoria dos processos de desenvolvimento de plantas *in vitro*, principalmente na SE, para as espécies *Citrus clementina* Hort. ex Tan (CHIANCONE et al., 2006) e *Momordica charantia* L. (PAUL et al., 2009); cultura de suspensão de *Araucaria angustifolia* (Bert.)

O. Ktze. (SILVEIRA et al., 2006); e desenvolvimento embrionário somático de cana-de-açúcar (REIS et al., 2016). De acordo com Pedroso et al. (1997), a putrescina conjugada solúvel e insolúvel e a espermidina conjugada solúvel podem estar relacionadas à formação e desenvolvimento de embriões globulares. Considerando seus resultados na embriogênese somática do arroz, Shoeb et al. (2001) sugeriram que as poliaminas podem ser utilizadas como biomarcadores da embriogênese somática do arroz. Wu et al. (2009) relataram o envolvimento de poliaminas na embriogênese somática de *Camellia sinensis*, após indução por estresse osmótico.

Desta forma, o estudo das PA's vem sendo utilizado para otimizar os processos de desenvolvimento das plantas, principalmente associados às técnicas de cultura de tecidos vegetais em espécies de importância agrônômica, e para esclarecer os eventos regulatórios da morfogênese *in vitro* (KAKKAR et al., 2000; SHOEB et al., 2001).

3.4 Variabilidade genética *in vitro*

Atualmente tem-se conhecimento que os parâmetros genéticos exercem grandes influências sobre o processo de SE (MERKLE et al., 1995; PINTO et al., 2008), e a compreensão do controle genético é fundamental para otimizar os protocolos de SE (PARK et al., 1998a). Assim, a depender do tipo e da magnitude da variação genética a indução da SE pode ser aplicada a genótipos recalcitrantes (PARK et al., 1998b; PARK, 2002), característica inerente a maiorias da espécies arbóreas.

Vários estudos têm relatado a influência do genótipo nas etapas de regeneração da SE de lenhosas dicotiledôneas, como por exemplo, Hernández et al., (2003) que encontraram uma influência genética significativa em todas as etapas do processo de regeneração de SE de *Quercus suber*, indicando que o melhoramento genético é possível. Cuenca et al., (1999) que sugeriram um efeito genotípico sobre o indução de embriogênese em folhas de *Quercus robur*. E Pinto et al., 2008 mostraram que a indução da SE em *Eucalyptus globulus* está sob o controle aditivo de efeitos genéticos.

O fator genético é de grande relevância na SE, uma vez que diferentes genótipos podem apresentar requerimentos diferentes de cultura para a indução de estruturas embriogênicas (TAUTORUS et al., 1991). A variabilidade genética entre espécies e dentro da mesma espécie pressupõe o ajuste de metodologias de propagação para

cada material genético, o que torna o processo ainda mais complexo (WENDLING et al., 2006).

A estimativa da herdabilidade *in vitro* por exemplo, é utilizada para determinar as características *in vitro* geneticamente dependentes, e a viabilidade da seleção precoce de progênies responsivas para aumentar a produção final (BERGMANN e STOMP, 1994). Para isso, pode-se utilizar a metodologia dos procedimentos ótimos de estimação/predição REML/BLUP (máxima verossimilhança restrita/melhor predição linear não viesada).

Outro parâmetro genético de elevada importância nos estudos de pré-melhoramento e melhoramento de plantas, é o coeficiente de variação relativa (CVr). O coeficiente de variação genética possibilita fazer inferências sobre a variabilidade genética entre os diferentes caracteres, auxilia na seleção de genótipos superiores e permite comparar os níveis de variabilidade genética presente em diferentes genótipos, ambientes e caracteres (FERRÃO et al., 2008).

A maior fonte de variabilidade genética de bacurizeiro encontra-se nas populações naturais, especialmente nas localizadas nos Estados do Pará e do Maranhão. Não obstante, a grande capacidade da espécie de reproduzir-se por brotações oriundas de raízes de plantas adultas, expressivas variações fenotípicas são encontradas nessas populações. Em um hectare de bacurizeiros nativos não é raro encontrar-se mais de 15 tipos fenotipicamente diferentes entre si, seja pela coloração das flores, massa, formato e cor dos frutos, tamanho das sementes e rendimentos percentuais de casca, polpa e tempo requerido para maturação dos entre outras características (CARVALHO e NASCIMENTO, 2018).

Vale ressaltar que frutas de espécies nativas não apresentam uniformidade nos aspectos vegetativos e reprodutivos, e precisam ser estudadas para que sejam estabelecidos critérios de seleção (BORGES et al., 2010). Assim é essencial estudar os parâmetros genéticos envolvidos na calogênese e na produção de linhas gênicas embrionárias para selecionar genótipos que adicionam para o estabelecimento de jardins clonais, por exemplo (CORRÊA et al., 2015).

Referências

- AGUIAR, L. P. **Qualidade potencial de utilização de bacuris (*Platonia insignis* Mart.) oriundos da Região Meio-Norte**. 2006. 122p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimento) - Universidade Federal do Ceará. [2006].
- AHMAD, P.; KUMAR, A.; GUPTA, A.; HU, X.; HAKEEM, K.R.; AZOOZ, M.; Polyamines: role in plants under abiotic stress, in: M. Ashraf, M. Öztürk, A. MSA, A. Aksoy (Eds.) **Crop Production for Agricultural Improvement**, Springer, p. 491–512. 2012.
- ALEMANNI, L., DEVIC, M., NIEMENAK, N., SANIER, C., GUILLEMINOT, J., RIO, M., VERDEIL, J. C.; MONTORO, P. Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Planta** v.227, p.853–866, 2008.
- ALVAREZ, A. S.; POTIGUARA, R. C. V. Caracterização anatômica foliar de espécimes de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) em diferentes períodos sazonais. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 562- 569, 2013.
- AMMIRATO, P. V. **The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.)**. Bot. Gaz v.135, p.328–337, 1974.
- AMMIRATO, P.V. **Embryogenesis**. In **Handbook of plant cell culture** (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds.). Macmillan Publisher Co., New York, p.82-123. 1983.
- ANDRADE, P. F. S. **Fruticultura, Secretaria da agricultura e do abastecimento departamento de economia rural análise da conjuntura agropecuária safra 2017**, Estado do Paraná. 2017.
- ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, Embrapa, 2002.
- ANJANEYULU, C.; SHYAMKUMAR, B.; GIRI, C.C.; Somatic embryogenesis from callus cultures of *Terminalia chebula* Retz.: an important medicinal tree, **Trees** v.18, p.547–552. 2004.
- ARAGÓN, C.E., ESCALONA, M., RODRIGUEZ, R., CAÑAL, M.J., CAPOTE, I., PINA, D., GONZÁLEZ-OLMEDO, J. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v.46, p.89–94. (2010)

ARAUJO, F. M. M. C.; MACHADO, A. V.; LIMA, H. C. de; CHITARRA, A. B.; Alterações físicas e químicas do fruto da jaboticabeira (*Myrciaria jaboticaba* Berg cv. Sabará) durante seu desenvolvimento. **Revista Verde**. Mossoró, v.5, n.2, p. 109 -116, 2010.

ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R.S.; Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.166-173. 2002.

ARUN, M.; CHINNATHAMBI, A.; SUBRAMANYAM, K.; KARTHIK, S.; SIVANANDHA, G.; TEBORAL, J.; ALHARBI, S. A.; KIM, C. K., GANAPATHI e A. Involvement of exogenous polyamines enhances regeneration and Agrobacterium-mediated genetic transformation in halfseeds of soybean. **Biotechnology**. v.6, p.148. 2016.

BARON, K.; STASOLLA, C.; The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development, **In vitro Cellular Development Biology Plant**. v.44, p.384–395. 2008.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, v. 1. 2. n. 309 p. 2002.

BECWAR, M. R., NAGAMANI, R., AND WANN, S. R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in Loblolly pine (*Pinus taeda*). Can. **Journal Forest Research**. v.20, p. 810–817. 1990.

BONGA, J. M. A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers. Can. **Journal Forest Research**. v.45, p.379–383. 1995.

BORGES, A.L.; SILVA, A.L.; BATISTA, D.C.; MOREIRA, F.R.B.; FLORI, J.E.; OLIVEIRA, J.E.M.; ARAÚJO, J.L.P.; PINTO, J.M.; CASTRO, J.M.C.; MOURA, M.S.B.; AZOUBEL, P.M.; CUNHA, T.J.F.; SILVA, S.O.; CORDEIRO, Z.J.M. **Sistema de Produção da Bananeira Irrigada, Sistemas de Produção** – Embrapa, 115. 2009 .Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/662460/1/SistemadeProducaodaBananeiraIrrigada.pdf>. Acessado em: 31 de março de 2018.

BORGES, K. C. F.; SANTANA, D. G. DE ; MELO, B. DE; SANTOS, C. M. DOS. Rendimento de polpa e morfometria de frutos e sementes de pitangueira-do-cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 471- 478, 2010.

BRUMMIT, R. K. **Vascular plant families and genera**. Kew: Royal Botanic Gardens., p.804. 1992.

CALZAVARA, B. B. G. **Fruteiras: abieiro, abricozeiro, bacurizeiro, biribazeiro, cupuaçuzeiro**. Série Culturas da Amazônia. Belém: Ipean, v. 1, n. 2, p. 63-68, 1970.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. **Aclimatização de plantas: abordagens recentes**. *Boletim da ABCTP - CNPH/EMBRAPA*. v.25, p.2-12. 1996.

CARVALHO, J. E. U. de.; NASCIMENTO, W. M. O. do. **BACURI (*Platonia insignis*)**. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). p. 30. 2018.

CARVALHO, J. E. U. de.; NASCIMENTO, W. M. O. do. **Técnicas para a propagação do bacurizeiro por semeadura direta no campo**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. p.08 (Comunicado técnico, 298). 2018.

CARVALHO, J. E. U. de; MULLER, C. H.; LEÃO, N. Cronologia dos eventos morfológicos associados à germinação e sensibilidade ao dessecamento em sementes de bacuri (*Platonia insignis* Mart. – Clusiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v.20, n.2, p. 475- 479, 1998a.

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

CARVALHO, J. E. U. de; NASCIMENTO, W. M. O. do; MULLER C. H. **Sistemas alternativos para formação de mudas de bacurizeiro**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 18p. (Comunicado Técnico, 11). 1999.

CARVALHO, J. E. U. de; NAZARÉ, R. F. R. de; NASCIMENTO, W. M. O. do. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) com rendimento industrial superior. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.2, p. 326-328, 2003.

CARVALHO, J. M. F. C; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Embrapa. Campina Grande, 2003.

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

CARVALHO, J. E. U. de; MULLER, C. H. Propagação do bacurizeiro. In: LIMA, Maria da Cruz (Org.) **Bacuri: agrobiodiversidade**. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, cap. 2, p. 29-46. 2007.

CARVALHO, M. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas *in vitro* de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 86p. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa [2008].

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6. ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 279 p. (Coleção Adolfo Ducke). 1996.

CORREDOIRA, E., BALLESTER, A., VIEITEZ, F. J., AND VIEITEZ, A. M. “Somatic embryogenesis in chestnut” in Plant cell monographs. eds. A. Mujib and J. Samaj (Berlin/Heidelberg: Springer), p. 177–199. 2006a.

CORREDOIRA, E., VALLADARES, S., AND VIEITEZ, A. M. Morpho-histological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. ***In vitro Cellular Development Biology Plant***. v.42, p. 525. (2006b).

CRONQUIST, A. **A integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia Un. Press, 520 p. 1981.

DANIEL, J. **Tesouro descoberto no máximo rio Amazonas**. Rio de Janeiro: Contraponto, v.1, p.450. 2004.

DIEL, K. A. P.; MARINHO, L.C.; VON POSER, G.L. The ethnobotanical relevance of the tribe Symphonieae (Clusiaceae) around the world. ***Journal Ethnopharmacol.*** v.14, n.284, p.114. 2021.

DO NASCIMENTO CAVALCANTE, A.; LIMA, L.K.F.; ARAÚJO, C.M.; DA SILVA SANTOS, F.P.; DO NASCIMENTO, M. O.; DE CASTRO E SOUSA, J. M.; RAI, M.; FEITOSA, C. M. Toxicity, cytotoxicity, mutagenicity and *in vitro* antioxidant models of 2-oleyl-1,3-dipalmitoyl-glycerol isolated from the hexane extract of *Platonia insignis* MART seeds. ***Toxicology Reports***. v.7, p. 209–216. 2020.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. ***Journal of Experimental Botany***. v.48, n.313, p.1493-1509. 1997.
DUDITS, D.; BOGRE, L.; GYORGYEY, J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. ***Journal of Cell Science***, v. 99, p. 475-484, 1991.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D.; Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v.74, p. 201–228. 2003.

FEHÉR, A. **Why somatic plant cells start to form embryos?** in: A. Mujib, J. Samaj (Eds.), Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monographs, vol. 2, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 85–101. 2005.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, S.; SAMAJ, J. (Eds.). Somatic embryogenesis. Heidelberg: **Plant Cell Monographs**, Springer, p. 85-101. 2006.

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

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul Ocidental. In: **ScientiaForestalis**, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, M. S. G.; MEDINA, G. **Bacuri: Gold in the market, delicious in the mouth.** In: ALEXIADES, M. N.; SHANLEY, Patrícia. (Orgs.). Productos forestales, médios de subsistencia y conservación: Estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables. Bogor, p. 5-8. 2004.

FICK, T. A.; BISOGNIN, D. A.; QUADROS, K. M.; HORBACH, M.; REINIGER, L. R. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo (*Cordia trichotoma*). **Ciência Florestal**, v. 17, n. 4, p. 343-349, 2007.

FRANZON, R.C.; RASEIRA, M. do C.B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.18-20, 2006.

FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Physical microenvironment and its effects. Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers. v.319–369. 1995.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GARCIA, C.; CORRÊA, F.; FINDLEY, S. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. **African Journal Biotechnology**. v.15, p.1936–1951. 2016.

GEORGE, E. F.; HAAL, M. A.; KLERK, G.J. de. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Ed. 3. v. 1. p. 501. 2008.

GLIWICKA, M.; NOWAK, K.; BALAZADEH, S.; MUELLER-ROEBER, B.; GAJ, M.D.; Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*, **PLoS ONE** 8 e69261. 2013.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V; DOS SANTOS, A. L. W. ASTARITA, L. V; NODARI, R. O. **Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*** In: JAIN, S.M.; GUPTA,P.K.; NEWTON,R.J. (Ed). Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v.6, p. 457-478. 2000.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, EMBRAPA. p.533-568. 1999.

GUIMARÃES, A. D. G.; MOTA, M. G. da C.; NAZARÉ, R. F. R. de. **Coleta de germoplasma de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) na Amazônia**. I. Microrregião Campos do Marajó (Soure/Salvaterra). Belém: Embrapa-CPATU, 23p. (Boletim de Pesquisa, 132). 1992.

GUPTA, P. K.; PULLMAN, G.; TIMMIS, R.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.C.; GROB, J.; WELTY, E. Forestry in the 21st Century. **Bio/Technology**. v.11, p.454-459. 1993.

BAIS, H.P.; RAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications, **Plant Cell Tissue Org. Cult.** v.69, p.1–34. 2002.

HOMMA, A. K. O.; CARVALHO, J. E. U.; MENEZES, A. J. E. A. **Bacuri: fruta amazônica em ascensão**. Ciência Hoje, Rio de Janeiro, v.46, n.271, 40-45, 2010.

HOMMA, A.K.O.; MENEZES, A.J.E.A.; CARVALHO, J.E.U.; MATOS, G.B. Manejo de rebrotamento de bacurizeiros nativos no Estado do Pará: recuperação de áreas degradadas com geração de renda e emprego. **Inc. Soc.**, Brasília, v. 6 n. 2, p.77-83, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017) Censo agropecuário 2017. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6617#resultado> Acessado em: 01 de novembro de 2018.

JAIN, S.M.; ISHII, K. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In Recent advances in biotechnology for conservation and management. (S.H. Mantell, S. Bruns, 1998.

KAKKAR, R.K.; SAWHNEY, V.K. Polyamine research in plants – a changing perspective. **Physiologia Plantarum**, v.116, p.281-292, 2002.

KOCHBA, J., LAVEE, S., AND SPIEGEL-ROY, P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic ‘Shamouti’ orange ovular callus lines. **Plant Cell Physiology**. v.18, p.463–467. 1977.

KOSKY, R. G.; SILVA, M. DE F.; PÉREZ, L. P.; GILLIARD, T.; MARTINEZ, F.B.; VEGA, M.R.; MILIAN, M.C.; MENDOZA, E.Q. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, p. 21-26. 2002.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.27, p.47–51. 1991.

KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v.35, n.4, p.296-298. 1999.

KUEHN, G.D.; PHILLIPS, G.C.; Role of polyamines in apoptosis and other recent advances in plant polyamines, **Crit. Rev. Plant Science**. v.24, p.123– 130. 2005

KUMAR, R.; ANUNANTHINI, P.; SATHISHKUMAR, R. Epigenetic silencing in transgenic plants. **Front Plant Science**. v.6, p.693. 2015b.

KUMAR, V.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Somatic embryogenesis of *Pelargonium sidoides* DC. **Plant Cell Tissue Organ Culture** v.12, p. 571–577. 2015a.

KUMAR, V.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Enhancing plant regeneration of *Lachenalia viridiflora*, a critically endangered ornamental geophyte with high floricultural potential. **Sci Horticulture**. v.211, p.263–268. 2016

KUMAR, V.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Somatic embryogenesis in *Hypoxis hemerocallidea*: an important African medicinal plant. **South African Journal Botanic**. v.108, p.331–336. 2017.

LIMA, M. C.; **Bacuri: agrobiodiversidade**, 1a ed., Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura: São Luís. Nascimento, W. M. O.; Carvalho, J. E. U.; Muller, C. H.; 2007.

LLOYD, C. W.; LOWE, S. B.; PEACE, G.W. The mode of action of 2,4-D in counter-acting the elongation of carrot cells grown in culture. **J Cell Sci**. v.45, p.257–268. 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Ed. Plantarum. Nova Odessa:, p.78.1992.

LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BARROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p.197-200. 1998.

LUSTOSA, A. K. M. F.; BEZERRA, É. A.; RODRIGUES, K. A. F.; AMORIM, L. V.; LIMANETO, J. S.; ARAÚJO, B. Q.; COSTA JUNIOR, J. S.; MENDES, A. N.; CARVALHO, F. A. A.; ARCANJO, D. D. R.; CITÓ, A. M. D. G. L. Efeito antileishmania de sementes de frutos de *Platonia insignis* contra formas amastigotas internalizadas por macrófagos de *Leishmania amazonensis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2018.

MALOSSO, M. G.; BERTONI, B. W.; COPPEDE, J. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 6, n. 7, p. 1147-1154, 2012.

MAUÉS, M. M.; VENTURIERI, G. C.; **Ecologia da polinização do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) Clusiaceae**. Belém: Embrapa-CPA TU,. 24p. (Embrapa-CPA TU. Boletim de Pesquisa, 170). 1996.

MENEZES, A. J. E. A. de; HOMMA, A. K. O.; SCHOFFEL, E. R. **Do Extrativismo à Domesticação: o Caso do Bacurizeiro no Nordeste Paraense na Ilha de Marajó**. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. (Embrapa Amazônia Oriental, Boletim de Pesquisa, 379). 66 p. 2012.

MENEZES, A. J. E. A.; SCHOFFEL, E. R.; HOMMA, A. K. O. **Caracterização de sistemas de manejo de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) nas mesorregiões do**

nordeste paraense e do Marajó, estado do Pará. Amazônia: Ciência & Desenvolvimento, Belém, v. 6, n. 11, p. 49-62, 2010.

MNG'OMBA, S. A.; BEEDY, T. Positioning fruit trees into climate change / variability scenarios: opportunities and constraints in the placement of fruit tree species in payment for environmental services. **Scientific Research and Essays**, v.8, n.28, p.1343-1348, 2013.

MORAES, L. R. B.; GUTJAHR, Ekkehard. **Química de Oleogenosas - Valorização da Biodiversidade Amazônica.** Editora GIZ, v. 2, 83 p. 2011.

MORAES, V. H. de F.; MULLER, C. H.; NASCIMENTO, W. M. O. do. **Native fruit species of economic potential from the Brazilian Amazon.** Angewandte Botanik. Goettingen, v. 68, p. 47-52, 1994.

MORAIS, L. R. B. **Química de oleaginosas: valorização da biodiversidade amazônica.** Tradução: Ekkehard Gutjahr. Câmara Brasileira do Livro. p.31.2012.

MOSALEEYANON, K.; CHA-UMA, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO² enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v.103, p.51-63. 2004.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica.** TESE (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Minas gerais. [2007].

MOURÃO, K. S. M.; BELTRATI, C. M. Morfologia dos frutos, sementes e plântulas de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). I. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento. Manaus: **Acta Amazônica**, Manaus, v.25, n.1/2, p.11-31, 1995.

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

NAGAO, E.O. PASQUAL, M. RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação "*in vitro*" de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, 1994.

NASCIMENTO, W. M. O ; CARVALHO, J. E. U. de; MULLER, C. H.; **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 657-660, 2007.

NASCIMENTO, W. M. O. do; CARVALHO, J. E. U. de; MULLER, C. H. Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 657-660, 2007.

NETO, F. A. S. **Germinação “in vitro” de grãos de pólen de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) – Clusiaceae**. 2010. 77 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. [2010].

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

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

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**, v.27, p.667-676. 2008.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de Copaíba. **Revista Biotecnologia**, Ciência e Desenvolvimento, Brasília, DF, v. 33, p. 109-120, 2004.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 13, n. 2, p. 18-27, 2003.

OVERBEEK, J.V.; BLONDEAU, R.; HORNE, V.; Difference in activity between 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other auxins, and its significance in herbicidal action, **Plant Physiol**. v.26, p.687–696. 1951.

PAIVA NETO, V. B.; BOTELHO, M.N.; AGUIAR, R.; SILVA, E.A.M.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from imature Zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.) *In vitro* cellular e development Biology plant, v.39, p.629-634, 2003.

PALMA, D., et. al. **Aspectos Morfofisiológicos E Controle Da Hiperhidricidade Na Cultura De Tecidos Vegetais**. Bras. Agrociência, Pelotas, v.17, n.2-4, p.174-184, 2011.

PAPADAKIS, A.K.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death syndrome induced by the polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. **Planta**, v.220, p.826-837, 2005.

PASTERNAK, T.P. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiol.** 129:1807–1819. 2002.

PEDROSO, M. C., PRIMIKRIOS, N., ROUBELAKS-ANGELAKIS, K. A.; PAIS, M. S. Free and conjugated polyamines in embryogenic and non-embryogenic leaf regions of *Camellia* leaves before and during direct somatic embryogenesis. **Physiol. Plant.** v.101, p. 213–219. 1997.

PELEGRINI, L. L.; RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KOEHLER, H. S. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p. 1527-1523, 2011.

PENCHEL, R.M., OTONI, W.C., XAVIER, A. Technologic de biorreatores e população fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (ed.) *Biotecnologia Florestal*. Viçosa: UFV, 75-92. 2007.

PINTO, G; PARK, Y -S; NEVES, L; ARAÚJO, C; SANTOS, C Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill. . **Plant Cell Reports; Berlin** Vol. 27, Ed. 6, 2008.

PONTES, L. C. G.; MOURA, E. F.; MOURA, M. F.; RODRIGUES, S. M.; OLIVEIRA M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; THERRIER, J. Molecular characterization of progenies of bacurizeiro (*Platonia insignis*) from Marajó Island, northeastern Amazon. **Acta Amazon.** v.47, p.293-300. 2017.

RAEMARKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F.; Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica** v.81, p.93-107, 1995.

REED, B.M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In vitro Cell Dev Biol Plant.** v.47, n.1, p.1–4. 2011.

RIVERO, P.V. **Poliaminas e morfogênese em tecidos de Solanum melongena L. cv Embú cultivados in vitro**. Instituto Butantã, 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). São Paulo-SP. [2006].

ROCHA, D. I; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C.; Somatic embryogenesis of wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**. 2011.

ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M.P.; SILVA, A. L.; Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. Micropropagadas. **Revista Brasileira de fruticultura**, v.25, n.2, p.417-423. 2003.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.D.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, C. DA S.; PEDROTTI, E L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Octoea odorífera* Mez.) **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.4, p.501-510, 2001.

SANTOS RF, ARAUJO JRG, NEVES JÚNIOR ACV, MELO PAFR, SILVA LPVS, SANTOS WFS, MENDES BMM, ROCHA AE, FURTADO MB, MESQUITA MLR Biometric and Chemical Characterization of Fruits From Selections of *Platonia insignis* Mart., Native of the State of Maranhão, Brazil. **Journal of Agricultural Science**. v. 11, p. 376-384. 2019.

SANTOS, J. P.; DAVIDE A. C.; TEIXEIRA, L. A. F.; MELO, A. J. S.; MELO, L. A. Enraizamento de estacas lenhosas de espécies florestais. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 293-301. 2011.

SARAIVA, R. V. C.; ALBUQUERQUE, P. M. C. de; GIRNOS, E. C. Floral and vegetative morphometrics of three *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) populations, a native tree from the Brazilian Amazon. **Plant Biosystems**, v.148, p.1-9, 2013.

SARAIVA, Raysa Valéria Carvalho. **Caracterização de três populações de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) no estado do Maranhão, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, [2012].

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Bacuri** (*Platonia insignis* Mart.). In: Shanley P, Medina G (eds) Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Cifor, Imazon, Belém, p. 51-60. 2005.

SHARMA, P.; KOCHE, V. QURAIISHI, A.; MISHRA, S. K. Somatic embryogenesis in *Buchanania lazan* Spreng. *In vitro cellular e Desenvolpente Biology Plant*, v.41, p.645-647, 2005.

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

SHOEB, F.; YADAV, J. S.; BAJAJ, S.; AND RAJAM, M. V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in diferent genotypes of indica rice. *Plant Science*. v.160, p.1229–1235. 2001.

SILVA, V. D. F.; SALES, J. D. F.; SILVA, F.G.; CAMPOS, R.C.; BRANQUINHO, A. D. C.; SILVA, V.A. Cryopreservation of quina seeds (*Strychnos pseudoquina* A. St. Hil.). *Int Res J Biotechnol* v. 3, n.4, p.55–60. 2012.

SILVA, A. L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne *in vitro*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, Bordeaux*, v. 29, n. 1, p. 1-9. 1995.

SILVA, R. G. et al. Repetibilidade e correlações fenotípicas de caracteres do fruto de bacuri no Estado do Maranhão. *Acta Scientiarum Agronomy, Maringá*, v. 31, n.4, p. 587-591, 2009.

SILVA, V. K. L.; FIGUEIREDO, R. W.; BRITO, E. S.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; FIGUEIREDO, E. A. T. Estabilidade da polpa do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) congelada por 12 meses. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, n. 5, p. 1293-1300, 2010.

SINIMBÚ NETO, F. de A. Germinação “*in vitro*” de grãos de pólen de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) – Clusiaceae. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Jaboticabal. São Paulo -SP. p. 65.

SINIMBÚ NETO, F. de A.; MARTINS, A.B.G.; BARBOSA, J.C. Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de bacurizeiro - Clusiaceae. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.3, p.593-600, 2011. DOI: 10.1590/S0100-29452011005000062.

SONG, Y.; Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide, *J. Integr. Plant Biol.* v.56 p.106–113. 2013

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, v. 9, n. 4, p. 103-117. 2007

SOUZA, V.A.B. de; VALE, E. de M.; GOMES, S.O.; COSTA, M. do P.S.D.; GUIMARÃES, A.R.C. Efeito da concentração de sacarose na germinação *in vitro* do pólen de cinco acessos de bacurizeiro (*Platonia insignis* MART.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.35, p.677-684, 2013. DOI: 10.1590/S0100-29452013000300003.

SOUZA, V.A.B. de; VALE, E. de M.; GOMES, S.O.; COSTA, M. do P.S.D.; GUIMARÃES, A.R.C. Efeito da concentração de sacarose na germinação *in vitro* do pólen de cinco acessos de bacurizeiro (*Platonia insignis* MART.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.35, p.677-684, 2013. DOI: 10.1590/S0100-29452013000300003.

SOUZA, V.A.B. de; VASCONCELOS, L.F.L.; ARAÚJO, E.C.E.; ALVES, R.E. Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). Jaboticabal: Funep, 2000. 72p

SOUZA, V.A.B. de; VASCONCELOS, L.F.L.; ARAÚJO, E.C.E.; ALVES, R.E. Bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). Jaboticabal: Funep, 2000. 72p.

STEVENS, P.F., 2007. **Clusiaceae-Guttiferae**. In: Kubitzki, K. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants: Flowering Plants. Vol 9. Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales Pp, Geraniales, Gunnerales, Myrtales Pp, Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Passifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae*. Springer, BerlinStrassburg BB, Brooks T, Feltran-Barbieri R, Iribarrem A, Crouzeilles R, Loyola R, Soares-Filho B Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nat Ecol Evol* v.1 n.4 p.1–3. 2017.

TAKAYAMA, S., AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: Gupta, S.D., Ibaraki, Y. **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, p.83-100. 2005.

TAUTORUS, T. E.; FOWEK, L. C.; DUNSTAN, D. J.; Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.1873-1899,1991.

TEIXEIRA, J.B. **Biorreatores**. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento, Brasília*, v.4, p.36-41. 2002.

TIBURCIO, A.; ALTABELLA, T.; BITRIÁN, M.; ALCÁZAR, R. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress, **Planta**. v..240 p.1–18. 2014.

UEKANE, T.M.; NICOLOTTI, L.; GRIGLIONE, A.; BIZZO, H.R.; RUBIOLO, P.; BICCHI, C.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; REZENDE, C.M. Studies on the volatile fraction composition of three native Amazonian-Brazilian fruits: Murici (*Byrsonima crassifolia* L., Malpighiaceae), bacuri (*Platonia insignis* M., Clusiaceae), and sapodilla (*Manilkara sapota* L., Sapotaceae). **Food Chem.** v.219, p.13–22. 2017.

ULISSES, C.; ALBUQUERQUE, C. C.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 58, n.5, p. 537-541, 2011.

VERDRAME, W. A. **Embriogênese somática em *Pinus taeda* L.** Piracicaba, SP: ESALQ/USP., 104P. (Dissertação Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. 1994.

VIANA, A. F. S. C.; REIS FILHO, A. C.; LIMA, G. S.; DINIZ, J. A.; SANTOS M. O.; OLIVEIRA, R. C. M. Avaliação da atividade gastroprotetora das casca do caule da *Platonia insignis* Mart. em ensaios experimentais de lesão gastrica em roedores. **Anais do I Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas**, v.4, n. 2, p. 129- 130, 2013.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U. de; MÜLLER, C. H.; DIAZ, C. S.; ALMANZA, M. *Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia*. Lima: **Tratado de Cooperacion Amazonica**. Secretaria Pro-tempore, 367 p. (TCA –SPT, 044). 1996.

VONDRÁKOVÁ, Z.; ELIÁŠOVÁ, K.; FISCHEROVÁ, L.; VÁGNER, M. The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. **Open Life Science** v.6 p.587–596. 2011.

VORA, N.C., JASRAI, Y.T. Effect of various carbon sources on *in vitro* shoot multiplication of banana. **Phytomorphology**, v.61 p.111–116. 2011

WATT, M.P.; BLAKEWAY, F.C.; TERMIGNORI, R.; JAIN, S.M. **Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii***. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (Ed). *Somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v. 5, p.63-78. 1999.

WU, X. B., WANG, J., LIU, J. H., AND DENG, X. X. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. **J. Plant Physiology**. v.166, p.52–62. 2009.

XIAO, Y., NIU, G., KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.149-158. 2011.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, C. V. L.; LIMA, E. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 2, p. 39-46, 2014.

YANG, S.H.; YEH, D.M. *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.93 p.201–207. 2008.

YUAN, G., SHUI-GEN, L., XIAO-FEN, F., AND ZHEN-HONG, S. Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Front Plant Science**. v.24 p. 938. 2016.

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

ZENG, F.; ZHANG, X.; JIN, S.; CHENG, L.; LIANG, S.; HU, L.; GUO, X.; NIE, Y.; CAO, J. Chromatin reorganization and endogenous auxin/cytokinin dynamic activity during somatic embryogenesis of cultured cotton cell. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 63-70, 2007.

C. Tragardh & A.M. Viana, eds.). International Foundation for Science, Stockholm, p.214-231

Capítulo II

Calogênese *in vitro*: determinação do potencial morfogênico de embriões zigóticos imaturos de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)

Artigo submetido à Revista *Árvore* (Brazilian Journal of Forest Science)

RESUMO

O bacurizeiro é uma espécie amazônica com elevado valor socioeconômico e grande potencial madeireiro. Contudo, as técnicas e sistemas de propagação vegetativa estabelecidas para essa espécie são incipientes para atender a demanda produtiva. Dessa forma, a manipulação *in vitro* torna-se uma alternativa interessante para a multiplicação de bacurizeiro. O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial morfogênico de calos de *Platonia insignis* Mart., obtidos a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos dessa espécie. Embriões zigóticos provenientes de frutos imaturos de bacuri foram inoculados meio de cultura constituído por sais MS sem adição de reguladores de crescimento. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, os explantes foram transferidos para diferentes tratamentos de multiplicação: MS + BA [2,5 µM]; MS + BA [1,0 µM] + GA₃ [13,43 µM]; MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM]; MS +GA₃ [13,43 µM] + NAA [23,40 µM]. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições. Aos 60 dias após inoculação, 90% dos explantes induziram a formação de calos. Esses calos apresentaram aspecto friável, com regiões globulares e coloração amarelo clara. No meio de multiplicação, os calos de bacuri apresentaram diferentes aspectos morfoanatômicos. No meio MS suplementado com BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM], os calos foram mais responsivos e apresentaram aspecto friável de coloração amarelada e células isodiamétricas características geralmente observadas em calos com potencial morfogênico. No entanto, novas investigações são necessárias para otimizar os processos de maturação e conversão de embriões somáticos de *P. insignis*, a fim de potencializar o processo de domesticação da espécie com técnicas de propagação mais eficientes.

Palavras- chave: Bacuri; Morfogênese; Micropropagação

ABSTRACT

The bacuri tree is an Amazonian species with high socioeconomic value and great timber potential. However, the techniques and systems of vegetative propagation established for this species are incipient to meet the productive demand. Thus, *in vitro* manipulation becomes an interesting alternative for bacuri tree multiplication. The objective of this work was to determine the morphogenic potential of calli of *Platonia insignis* Mart., obtained from the *in vitro* culture of immature zygotic embryos of this species. Zygotic embryos from immature bacuri fruits were inoculated into a culture medium consisting of MS salts without addition of growth regulators. After 60 days of *in vitro* culture, the explants were transferred to different multiplication treatments: MS + BA [2.5 µM]; MS + BA [1.0 µM] + GA₃ [13.43 µM]; MS + BA [2.5 µM] + 2,4-D [0.1 µM]; MS +GA₃ [13.43 µM] + NAA [23.40 µM]. The experiment was carried out in a completely randomized design, with four treatments, five replications. At 60 days after inoculation, 90% of the explants induced callus formation. These calluses had a friable appearance, with globular regions and a light yellow color. In the multiplication medium, the bacuri callus showed different morphoanatomical aspects. In MS medium supplemented with

BA [2.5 μM] + 2.4-D [0.1 μM], the calluses were more responsive and presented a friable yellowish appearance and characteristic isodiametric cells usually seen in callus with morphogenic potential. However, further investigations are needed to optimize the processes of maturation and conversion of *P. insignis* somatic embryos, in order to enhance the domestication process of the species with more efficient propagation techniques.

Keywords: Bacuri; Morphogenesis; micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Nativa da Amazônia oriental brasileira, o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma arbórea com alto valor socioeconômico (Souza et al., 2013) principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde há maior abundância e ocorrência da espécie (Pontes et al., 2017). Possui múltiplos usos incluindo o consumo do fruto (Aguilar, 2006; Souza et al., 2013) e a extração madeireira (Homma et al., 2010; Homma et al., 2013).

A espécie *P. insignis* é predominantemente arbórea, caducifólia, alógama, com autoincompatibilidade esporofítica (Saraiva et al., 2013). Em decorrência dessas características, os poucos plantios existentes são heterogêneos e com produção irregular. Além disso, a germinação das sementes é lenta, levando cerca de 500 a 700 dias para que o processo germinativo se complete (Nascimento et al., 2007). Por ainda desafiar esforços para seu processo de domesticação (SHANLEY et al., 2016) sofre risco de erosão genética, devido a expansão das áreas com agricultura associada à escassez de técnicas adequadas de propagação (Nascimento et al., 2007).

Uma alternativa viável para estes entraves produtivos é o cultivo *in vitro*, capaz de permitir a obtenção de milhares de plantas saudáveis, possibilitando a produção durante todo o ano, uma vez que esta técnica não é afetada por mudanças sazonais (Borges et al., 2009). No entanto, o sucesso dessa produção depende, dentre outros fatores, do ajuste de um protocolo adequado de propagação *in vitro* para cada espécie (Ulisses et al., 2011), que pode ser induzido a partir de uma das principais rotas morfogenéticas *in vitro*, a embriogênese somática (SE). SE é baseada no conceito da totipotência celular de plantas, pois células já diferenciadas sofrem desdiferenciação e adquirem competência embriogênica quando submetidas a reguladores de crescimento de plantas e outras condições de estresse (Xu e Huang, 2014; Mendez-Hernandez et al., 2019; Gulzar et al., 2020). A principal fase da SE envolve a re-determinação de células diferenciadas, seguida de divisão e proliferação levando ao desenvolvimento de uma massa celular chamada calo (Rezende et al., 2012). Esses calos são as estruturas precursoras da regeneração de plantas

em larga escala, constituindo-se em fonte ideal para o estudo das diferenciações e expressão da totipotência celular (Zeng et al., 2007; Yang e Zhang, 2010; Santa-Catarina et al., 2012; Steiner et al., 2016).

No entanto, na literatura não foram encontrados protocolos de estabelecimento ou propagação *in vitro* de *P. insignis*, o que ressalta a importância de se aperfeiçoar e compreender processos de regeneração *in vitro* para esta espécie. Os estudos estruturais tem contribuído para compreensão das respostas morfogênicas obtidas *in vitro* e para a identificação de células e/ou tecidos com potencial morfogenético (Da Silva et., 2015), favorecendo a possibilidade de intervenção nas respostas gênicas embrionárias envolvendo as rotas de regeneração *in vitro* (Pinto et al., 2010; Rocha et al., 2012; Otoni et al., 2013).

O desenvolvimento de novas tecnologias para a propagação de *P. insignis*, como o cultivo *in vitro*, constituem-se em atividades essenciais para manutenção do material genético e subsidiar programas de melhoramento que visem a completa domesticação desta espécie. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar o potencial morfogênico de embriões zigóticos imaturos de *Platonia insignis* cultivados *in vitro* e caracterizar o padrão morfoanatômico dos calos obtidos, a fim de fornecer subsídios para técnicas de propagação *in vitro* e conservação da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de material vegetal

Frutos imaturos de *Platonia insignis* foram coletados de matrizes do município de Bacabeira, Maranhão, Brazil (latitude 2° 58' 14" S e longitude 44° 18' 32" O). Os frutos foram acondicionados em embalagens plásticas no interior de caixas de poliestireno, em seguida, passaram por pré-limpeza, com lavagem em água corrente e detergente neutro (Figura 1). Inserir Figura 1 aqui.

2.2 Estabelecimento *in vitro* e indução da calogênese de *Platonia insignis*

Em câmara de fluxo laminar, frutos imaturos de *P. insignis* foram submersos em álcool 70% (v/v) por cinco minutos, e em seguida em solução de hipoclorito de sódio P.A. (Isofar Ltda[®]) (com 2% de cloro ativo), adicionado de uma gota de Tween[®] (Isofar Ltda[®], Duque de Caxias - RJ) a cada 100 mL de solução, mantendo-os em imersão por 20 minutos. Posteriormente, foram enxaguados três vezes em água destilada autoclavada,

por dois minutos cada. Com auxílio de faca, a casca e polpa dos frutos foram retiradas até a obtenção das sementes, no qual foram desinfestadas com imersão em álcool 70% por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio (com 2% de cloro ativo) adicionado de uma gota de Tween[®] a cada 100 mL de solução, por dois minutos em constante agitação. Em seguida, as sementes foram enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada por dois minutos cada (Figura 1).

As sementes foram excisadas até a obtenção do meristema fundamental cortical, seguindo a definição de Mourão e Beltrati (1995), sendo estes utilizados como explantes iniciais, no qual foram inoculados em frascos de vidro (200 mL) contendo 30 mL meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) (PhytoTech Lab[®], KS, USA), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Isofar[®] Ltda, Duque de Caxias, Brasil), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MO, USA), 2,0 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MO, USA) e 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MO, USA). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes de autoclavagem a 121°C e 108 kPa durante 15 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro, por 60 dias, a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura.

2.3 Multiplicação de calos de *Platonia insignis*

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, foi observado estruturas semelhantes a calos a partir do meristema fundamental cortical. Como explantes, foram utilizados calos sendo inoculados em placas de Petri (90 x 15 mm) (ProLab Ltda) contendo 30 mL de MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,0 g L⁻¹ de Phytigel[®] e 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado, com adição de diferentes reguladores de crescimento (PGR's) ácido giberélico (GA₃), benziladenina (BA), ácido naftalenoacético (NAA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), totalizando quatro tratamentos, sendo: MS + BA [2,5 µM]; MS + BA [1,0 µM] + GA₃ [13,43 µM]; MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM]; MS +GA₃ [13,43 µM]+ NAA [23,40 µM] e cinco repetições cada. Cada placa correspondeu a uma repetição contendo seis aglomerados de calos. Após a inoculação, as placas foram mantidas na ausência de luz em condições de sala de crescimento a $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aos 60 dias, os calos foram avaliadas quanto a porcentagem de explantes responsivos (%) e classificados qualitativamente quanto ao formato (calos friáveis, globulares e massa de calos indefinida), coloração (calos amarelo translúcido, amarelo

claro, amarelo e amarelo esbranquiçado) e capacidade de multiplicação dos calos (elevada, moderada, baixa e nula). Para estas variáveis, foi adotado o critério de notas atribuída às escalas numéricas decrescentes (adaptado de Corrêa, 2014) (Tabela 1). Além disso, os calos foram avaliados quanto à porcentagem de explantes responsivos (%), considerando-se como explante responsivo aquele que apresentou formação de calos. Inserir aqui Tabela 1.

2.4 Preparo das amostras para análises histológicas e microscopia de luz

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, como amostras (n=5), calos de cada tratamento foram coletados e mantidos em fixador FAA 70% (Johansen, 1940) por 72 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (30% a 100%) e, posteriormente incorporados em resina de metacrilato (Historesin[®], Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Os blocos foram seccionados transversalmente à uma espessura de 5 µm, utilizando micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL). Os cortes foram corados com azul de toluidina (pH 4,8) (O'Brien e McCully, 1981), e as imagens capturadas utilizando o microscópio Zeiss Axioskope equipado com sistema de câmera U-Photo (AxioCam HRc).

2.4 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições (n=20). Os dados de percentual de explantes responsivos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativos, comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). Os dados não-paramétricos das variáveis formato de calos, coloração de calos e capacidade de multiplicação, foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando o *software* SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS

3.1 Estabelecimento *in vitro* de *Platonia insignis* a partir de embriões zigóticos imaturos

Não houve contaminação dos explantes nas fases de estabelecimento *in vitro* e indução de calos, demonstrando eficiência do protocolo de descontaminação adotado.

Ainda, nós observamos que a indução de calos ocorreu a partir dos 30 dias após a inoculação (DAI) em meio MS sem reguladores de crescimento, com responsividade de 90% dos explantes mantidos neste meio (Figura 2a), evidenciando calos de aspecto friável, com regiões globulares e coloração amarelo clara (Figura 2b). Inserir Figura 2 aqui.

3.2 Competência calogênica e responsividade de calos de bacurizeiro em meios suplementados com diferentes PGR's

A escala de notas atribuídas aos calos foi eficiente na estratificação dos tratamentos, e a análise qualitativa pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre os tratamentos para toda as variáveis qualitativas testadas, coloração dos calos, formato de calos e capacidade de multiplicação ($p \leq 0,005$) (Fig. 3a-c). A partir da análise de variância, a variável responsividade (%) apresentou diferença significativa entre os tratamentos avaliados ($p \leq 0,005$), no qual os explantes mantidos no tratamento MS + BA [2, μM] + 2,4-D [0,1 μM] foram superiores quanto a responsividade (100%) quando comparado aos tratamentos MS + BA [1,0 μM] + GA₃ [13,43 μM] (76,67%) e MS + GA₃ [13,43 μM] + NAA [23,40 μM] (76,67%) (Fig. 3d). Inserir Figura 3 aqui.

Os calos acondicionados em MS + BA [2,5 μM] (KW-H = 17,2949; $p \leq 0,0006$) apresentaram coloração entre as notas 3 e 4, que correspondem às colorações amarelo claro e amarelo translúcido, respectivamente. Os calos mantidos em MS + BA [1,0 μM] + GA₃ [13,43 μM] apresentaram coloração amarelo translúcido (nota 4), em MS + BA [2,5 μM] + 2,4-D [0,1 μM] houve diferenciação de calos em amarelo claro (nota 3) e quando os calos foram mantidos em MS + GA₃ [13,43 μM] + NAA [23,40 μM] apresentaram coloração amarelo esbranquiçado e amarelo-claro (notas 1 e 3, respectivamente) (Fig. 3a).

A análise qualitativa pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre os tratamento para a variável formato de calos (KW-H = 10,9499; $p \leq 0,0120$). Os calos mantidos em MS + BA [2,5 μM] apresentaram formato entre massa de calos indefinida (nota 1) e calos globulares (nota 2), os mantidos em MS + BA [1,0 μM] + GA₃ [13,43 μM] apresentaram formatos globulares (nota 2) e friáveis (nota 3). O tratamento MS + BA [2,5 μM] + 2,4-D [0,1 μM] apresentou calos com formato friável (nota 3), e os calos mantidos em MS + GA₃ [13,43 μM] + NAA [23,40 μM] apresentaram característica globular (nota 2) e friáveis (nota 3) (Fig. 3b).

A análise qualitativa pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre os tratamentos para a variável capacidade de multiplicação ($KW-H = 10,8933$; $p \leq 0,0123$) (Fig. 3c). Os calos do tratamento MS + BA [2,5 μM] apresentaram moderada capacidade de multiplicação (nota 3). Os calos mantidos em MS + BA [1,0 μM] + GA₃ [13,43 μM] e MS + BA [2,5 μM] + 2,4-D [0,1 μM] apresentaram capacidade de multiplicação de moderadas e elevadas (notas 3 e 4) com medianas 3 e 4, respectivamente. O tratamento MS + GA₃ [13,43 μM] + NAA [23,40 μM] apresentou calos com moderada capacidade de multiplicação (nota 3) (Fig. 3b).

Quanto a responsividade dos calos, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre os tratamentos, e o maior percentual foi obtido no tratamento MS + BA [2,5 μM] + 2,4-D [0,1 μM] (100%) diferindo apenas de MS + BA [1,0 μM] + GA₃ [13,43 μM] (76,67%) e MS + GA₃ [13,43 μM] + NAA [23,40 μM] (76,67%) (Figura 3d).

3.3 Análises morfoanatômicas

Por meio das análises morfoanatômicas, nós observamos que os calos mantidos no tratamento MS + BA [2,5 μM] (Fig. 4a-c) apresentaram estruturas globulares com epiderme bem definida (Fig. 4a, b) compostas por numerosas células isodiamétricas com poucos espaços intercelulares (Fig. 4c). Quando calos foram mantidos em MS + BA [1,0 μM] + GA₃ [13,43 μM] (Fig. 4d-f), foi possível observar protuberâncias com superfícies irregulares (Fig 4e), além de divisões celulares de células periféricas, levando a um espessamento nas paredes periclinais (Fig. 4e). Esses calos também eram compostos por células isodiamétricas, porém, com volume celular maior que no tratamento suplementado apenas com BA (Fig. 4f).

O tratamento MS + BA [2,5 μM] + 2,4-D [0,1 μM], apresentou calos com epidermes bem definidas, superfícies regulares, células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, com altas proporções citoplasmáticas (Fig. 4h). Ainda neste tratamento, foi possível observar calos com células mais intensamente coradas de azul, denotando células em intensa divisão celular, e também células mais intensamente coradas de roxo, com formação de grandes espaços intercelulares, levando a um isolamento celular por mecanismo esquizógeno (Fig. 4h, I - asteriscos), o que sugere uma produção de mucilagem. Além disso, há outra porção de células azuladas com vacúolos

maiores e núcleo e nucléolo bem definidos. Nesse tratamento também foi observado estruturas secretoras (Fig. 4h-i – pontas de setas), que também foram encontrados por análises morfoanatômicas, na porção cortical de sementes de *P. insignis* de frutos em maturação (Mourão e Beltrati, 1995).

Calos mantidos em MS + GA₃ [13,43 µM] + NAA [23,40 µM] apresentaram protuberâncias com superfícies irregulares (Fig 4k-l), além de espessamento nas paredes periclinais externas das células periféricas (Fig. 4j). Ainda, neste mesmo tratamento também foi observada a formação de grandes espaços intercelulares, aparentemente por um mecanismo esquizógeno, levando a um isolamento (separação das células) (Fig. 4l – linhas vermelhas tracejadas), além de estruturas secretoras. Inserir Figura 4 aqui.

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo sobre indução de calogênese *in vitro* de *P. insignis*, e nossos resultados podem ser utilizado como ponto de partida para o estabelecimento de um protocolo completo de regeneração *in vitro* por técnicas como a embriogênese somática. Os resultados iniciais de estabelecimento em meios sem adição de PGR's, demonstram que a capacidade regenerativa de calos deve-se principalmente à capacidade das células somáticas de sofrerem desdiferenciação, que pode ser induzida pela razão de reguladores de crescimento de plantas, como auxina e citocinina (Skoog e Miller, 1957), mas também pode ser provocado por indução de estresse, como uma lesão (Stappenbeck e Miyoshi, 2009; Iwase et al., 2011), fato que pode ter ocorrido na excisão do tegumento para a remoção do embrião zigótico de *P. insignis*. O mecanismo de desdiferenciação induzida por lesões pode estar presente também em outras plantas superiores, havendo relatos de formação de calos sem adição de PGR's exógenos ao meio de cultivo em *Strychnos pseudoquina* (Ikeuchi et al., 2013) e *Arabidopsis thaliana* (Zhou et al., 2012). Além disso, a expressão de genes de transcrição podem ser responsáveis pela indução de calos e embriões somáticos (Harding et al., 2003; Marsch-Martinez et al., 2006; Iwase et al., 2011), o que evidencia que a desdiferenciação celular em plantas é um processo controlado por um conjunto específico de genes.

Com relação a responsividade e competência calogênica, os resultados dos tratamentos com diferentes PGR's demonstram diferenças nas respostas quanto aos aspectos qualitativos e morfoanatômicos dos calos de *P. insignis*. Uma maior responsividade dos calos foi obtida no tratamento MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM] apresentando calos friáveis (nota 3) e com coloração amarelo claro (nota 3). A coloração

é uma importante variável para a identificação de calos embriogênicos. Aspectos translúcido-brancos ou amarelados dos calos são considerados friáveis e com potencial para formarem embriões somáticos (Guerra et al., 1999; Arunyanart e Chaitrayagun, 2005; Singh et al., 2015). Calos que não apresentam coesão celular, com ausência de constituição organogênica (estruturas que originarão órgãos), são denominados como friáveis (Ikeuchi et al., 2013).

Ainda, os calos mantidos em meio MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM] apresentaram elevada capacidade de multiplicação, e as análises morfoanatômicas mostraram que esse tratamento foi capaz de proporcionar calos potencialmente embriogênicos. Estudos mostram que a combinação de auxinas e citocininas sob aplicação exógena favorecem a formação de calos (Ikeuchi et al., 2013; Trueman et al., 2018). O 2,4-D é a auxina sintética mais comumente utilizada na indução de calos, podendo substituir a auxina natural ácido indolacético (IAA) (Navroski et al., 2012), e as citocininas exógenas tem papel na indução da divisão e controle celular, atuando na morfogênese *in vitro* (George et al., 2008).

Neste estudo, as análises histológicas demonstraram diferentes respostas morfoanatômicas dos calos para cada tratamento avaliado. Essas análises compreendem uma das diversas maneiras de investigação da progressão das fases calogênicas (Jalil et al., 2008).

O sucesso dos resultados obtidos neste estudo, podem estar ligados ao tipo de explante utilizado. O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos é uma ferramenta propícia para o estudo dos eventos envolvidos na calogênese e posterior desenvolvimento embrionário de calos (Haslam e Yeung, 2011). Assim, embriões zigóticos imaturos de várias espécies arbóreas nativas da Amazônia têm sido alvo de estudos *in vitro* (Pilatti et al., 2011), como por exemplo *Swietenia macrophylla* (Couto, 2002) e *Hypericum brasiliense* (Veloso et al., 2009).

Este foi o primeiro trabalho com indução de calogênese de *Platonia insignis* utilizando como fonte de explantes frutos imaturos. Acreditamos que nossos resultados denotam a possibilidade de utilização dos calos estabelecidos em meio MS e induzidos em MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM] para a regeneração da espécie, podendo contribuir para a otimização de sistemas de regeneração *in vitro* desta importante espécie frutífera da Amazônia, bem como o uso em programas de melhoramento para a espécie ensejando-se a continuidade das pesquisas.

5. CONCLUSÕES

A combinação de MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM] apresentou as respostas superiores quanto à capacidade de multiplicação, coloração e formato de calos. Ainda, as análises morfoanatômicas corroboram com esses resultados, uma vez que foi possível a obtenção de células com elevado conteúdo celular, isodiamétricas, núcleo e nucléolo bem definidos e com intensa atividade nas paredes periclinais.

As secções anatômicas revelam elevado potencial de calogênese, e calos potencialmente embriogênicos, portanto mais investigações são necessárias para otimizar o desenvolvimento embrionário de calos de *P. insignis*.

6. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. P. Qualidade potencial de utilização de bacuris (*Platonia insignis* Mart.) oriundos da Região Meio-Norte. 2006. 122p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimento) - Universidade Federal do Ceará. [2006].
- Arunyanart S, Chaitrayagun M, (2005) Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.) *Scientia Horticulturae* 105(3): 411-420.
- Borges AL, Silva AL, Batista DC, Moreira FRB, Flori JE, Oliveira JEM, Araújo JLP, Pinto JM, Castro JMC, Moura MSB, Azoubel, PM, Cunha TJF, Silva SO, Cordeiro ZJM. (2009) Sistema de Produção da Bananeira Irrigada, Sistemas de Produção – Embrapa, 115.
- Corner E JH. (1976) The seeds of dicotyledons Vol. 1. Cambridge University Press, Cambridge 311.
- Corrêa TR. (2014) Clonagem e controle genético da embriogênese somática em palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) 58 f. Tese (Doutorado em genética e melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa.
- Couto JMF. (2002) Germination and morphogenesis *in vitro* of mahogany (*Swietenia macrophylla* King). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Lavras, MG, Brasil.
- Da Silva GM, da Cruz ACF, Otoni WC, Pereira NST, Rocha DI, Silva ML da. (2015) Avaliação histoquímica da indução da embriogênese somática em *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). *In vitro Cell Development Biology Plant* 51:539–545.
- Ferreira DF. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)* 35 (6): 1039-1042.

Grattapaglia D, Machado MA, (1998) Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa -SNPH. 1:183-260.

George EF, Haal MA, Klerk GJ de. (2008) Plant Propagation by Tissue Culture 3(1): 501.

Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa/CBAB 2: 537-548.

Gulzar B, Mujib A, Malik MQ, Sayeed R, Mamgain J, Ejaz B (2020) Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. J Genet Eng Biotechnol 18:1–15.

Harding WE, Weining T, Nichols KW, Fernandez DE, Perry SE. (2003) Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-like 15. Plant Physiology 133:653–663

Haslam TM, Yeung EC. (2011) Zygotic embryo culture: an overview. In: Thorpe TA, Yeung EC (eds) Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 710.

Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. (2013) Plant callus: mechanisms of induction and repression. Plant Cell 25(9):3159–3173

Ipekci Z, Gozukirmizi N. (2005) Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79(3): 341-345.

Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H, Sugimoto K, Ohme-Takagi M. (2011) The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. Curr Biol 21:508–514

Jalil M, Chee WW, Othman RY, Khalid N (2008) Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) Scientia Horticulturae 117:335-340.

Johansen DA (1940) Plant microtechnique. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York.

Marsch-Martinez N, Greco R, Becker JD, Dixit S, Bergervoet JH, Karaba A, de Folter S, Pereira A. (2006) BOLITA, an Arabidopsis AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. Plant Mol Biol 62(6):825–843

Mendez-Hernandez HA, Ledezma-Rodriguez M, Avilez-Montalvo RN, Juárez-Gómez YL, Skeete A (2019) Signaling overview of plant somatic embryogenesis. Front Plant Sci 10:77.

Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiological Plant, 15: 473-497.

- Nascimento WMO do, Carvalho JEU de, Müller CH. (2007) Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29 (3): 657-660.
- Navroski MC, Waldow DAG, Pereira MDEO, Pereira ADEO. (2012) Calogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares e internodais em segurelha (*Satureja hortensis* L.). *Revista Agroambiente On-line*. 6: 228-234.
- O'Brien TP, McCully ME. (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne.
- Otoni WC, Paim Pinto DL, Rocha DI, Vieira LM, Dias LLC, Silva ML, Silva CV, Lani ERG, Silva LC, Tanaka FAO. (2013) Organogenesis and somatic embryogenesis in passionfruit (*Passiflora* spp.). In: Aslam J, Srivastava OS, Sharma MP (eds) Somatic embryogenesis and gene expression. Narosa Publishing House 1–17.
- Pilatti FK, Aguiar T, Sim T, Benson EE, Viana AM. (2011) *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In vitro Cell Development Biology Plant* 47(1):82–98.
- Pinto G, Silva S, Neves L, Araújo C, Santos C. (2010) Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Trees Struct Funct* 24:763–769.
- Pontes LCG, Moura EF, Moura MF, Rodrigues SM, Oliveira MSP, Carvalho JEU, Therrier J. (2017) Molecular characterization of progenies of bacurizeiro (*Platonia insignis*) from Marajó Island, northeastern Amazon. *Acta Amazonica* 47: 293-300.
- Rezende JC, Carvalho CHS, Santos ACR, Pasqual M, Teixeira JB. (2012) Indução e multiplicação de calos embriogênicos de *Coffea arabica* L. *Acta Scientiarum Agronomy* 34:1.
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FA, Silva LC, Otoni WC (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249:747–758.
- Santa-Catarina C, Silveira V, Guerra MP, Steiner N, Macedo AF, Floh EI (2012) The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. *New For* 43(4):429–440.
- Saraiva RVC, Albuquerque PMC de, Girnos EC (2013) Floral and vegetative morphometrics of three *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) populations, a native tree from the Brazilian Amazon. *Plant Biosystems* 148:1-9.
- Shanley P, Medina G. (2005) Bacuri (*Platonia insignis* Mart.). In: Shanley P, Medina G (eds) Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Cifor, Imazon, Belém, pp. 51-60.
- Singh BB (2015) Avaliação *in vitro* de dietas de feno de capim *Dichanthium annulatum* (capim-*marvel*) suplementadas com folhagem de broto. *Industrial Journal Animal Science* 85 (12): 1348-1353

Sinimbú Neto F de A. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) – Clusiaceae. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Jaboticabal. São Paulo -SP. p. 65. [2010].

Skoog F, Miller CO. (1967) Chemical regulation of growth and organ formation plant tissues culture *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology 11:118-140.

Souza VAB de, VALE E de M, Gomes SO, Costa Mdo PSD, Guimarães ARC. (2013) Efeito da concentração de sacarose na germinação *in vitro* do pólen de cinco acessos de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). Revista Brasileira de Fruticultura 35: 677-684.

Stappenbeck TS, Miyoshi H. (2009) The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. Science 324:1666–1669.

Steiner N, Farias-Soares FL, Éder C, Schmidt Pereira MLT, Scheid B, Rogge-Renner GD (2016) Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *araucaria angustifolia*, (bert.) o. kuntze. Protoplasma 253(2):487–501.

Trueman SJ, Cao DH, Ivar W. (2018) Tissue Culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. Forests 9 (84): 1–42, 2018.

Ulisses C, Albuquerque CC, Willadino L, Camara TR. (2011) Indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. Revista Ceres 58(5): 537-541.

Velloso MAL, Abreu IN, Mazzafera P. (2009) Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo *in vitro*. Acta Amazônica 39(2): 267– 272.

Zeng FC, Zhang XL, Cheng L, Hu LS, Zhu LF, Cao JL, Guo XP (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. Genomics 90(5):620–628

Zhou C, Guo J, Feng Z, Cui X, Zhu J. (2012) Molecular characterization of a novel AP2 transcription factor ThWIND1-L from *Thellungiella halophila*. Plant Cell Tissue Organ Culture 110(3):423–433.

Yang X, Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Critical Reviews in Plant Science 29:36–57.

Xu L, Huang H (2014) Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. Curr Top Dev Biol 108:1–33.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação qualitativa de calos de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) provenientes de meristema fundamental cortical.

	Formato	Coloração	Capacidade de multiplicação
4	-	Amarelo translúcido	Elevada
3	Calos friáveis	Amarelo claro	Moderada
2	Calos globulares	Amarelo	Baixa
1	Massa de calos indefinida	Amarelo esbranquiçado	Nula

LISTA DE FIGURAS

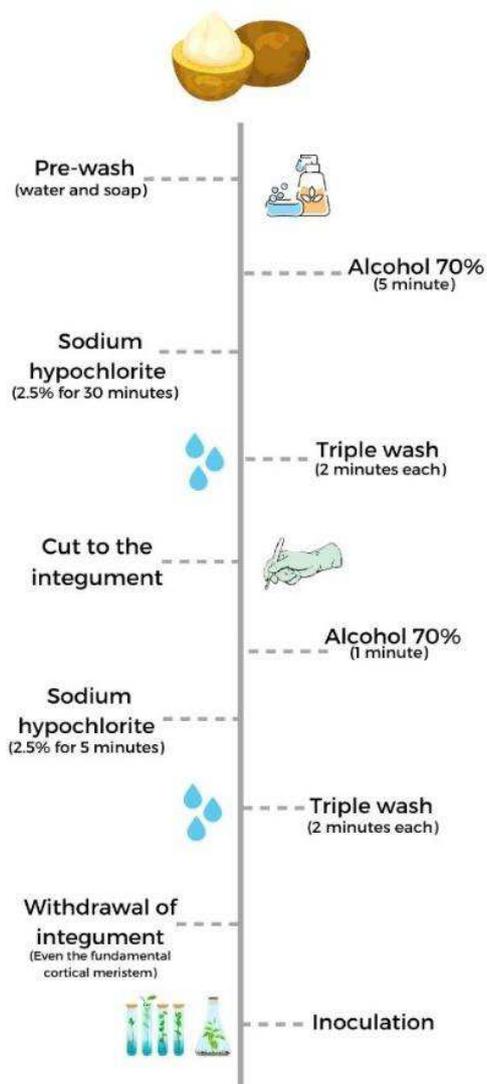


Figura 1 - Etapas da desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) provenientes de frutos imaturos.

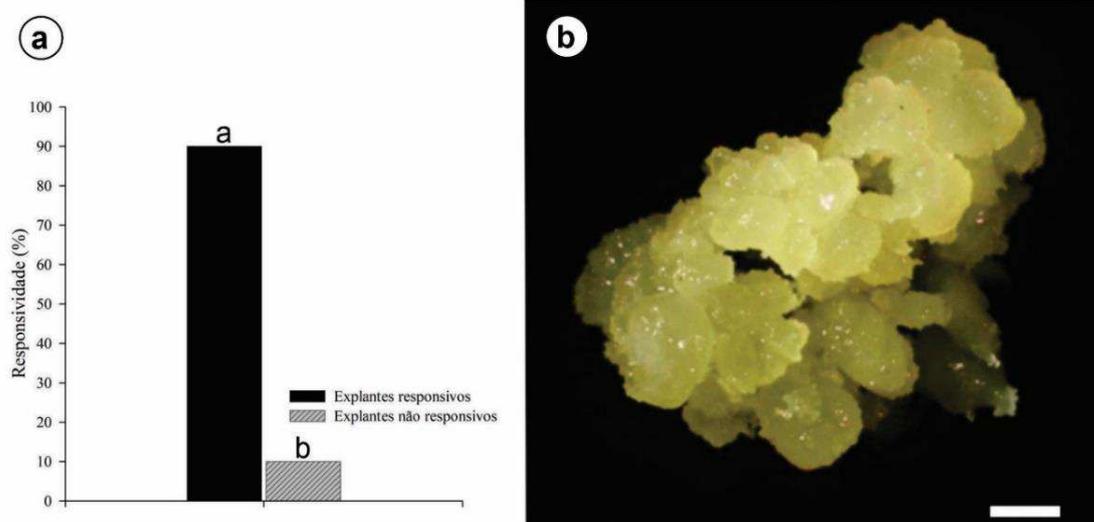


Figura 2 - Responsividade de explantes (a) e calos induzidos a partir de sementes de frutos imaturos de *Platonia insignis* Mart. mantidos em meio MS sem adição de PGR's (b). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Barra: 1mm.

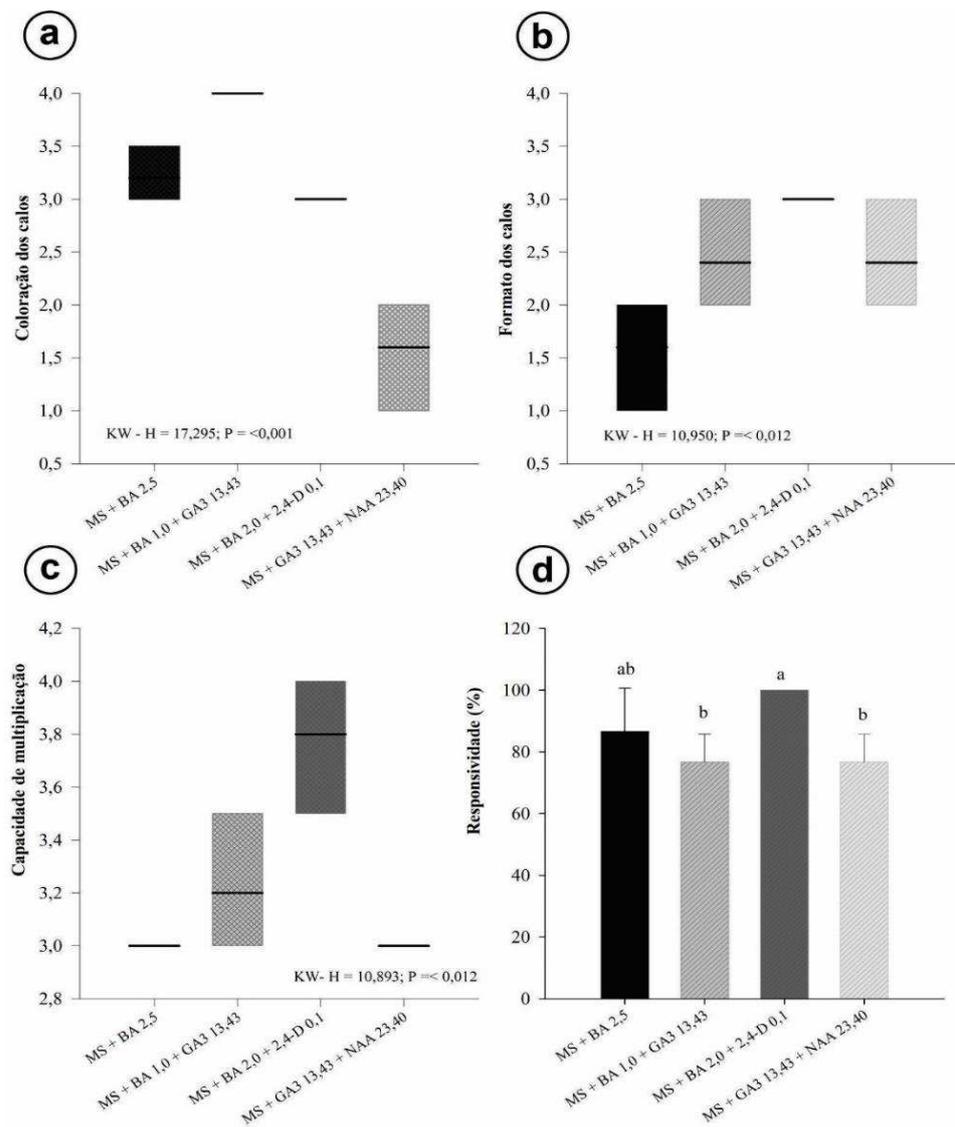


Figura 3 -Características de calos de *Platanon insignis* submetidos a diferentes concentrações de PGR's. Coloração de calos (a); formato de calos (b); capacidade de multiplicação de calos (c); Responsividade (%) (d). *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

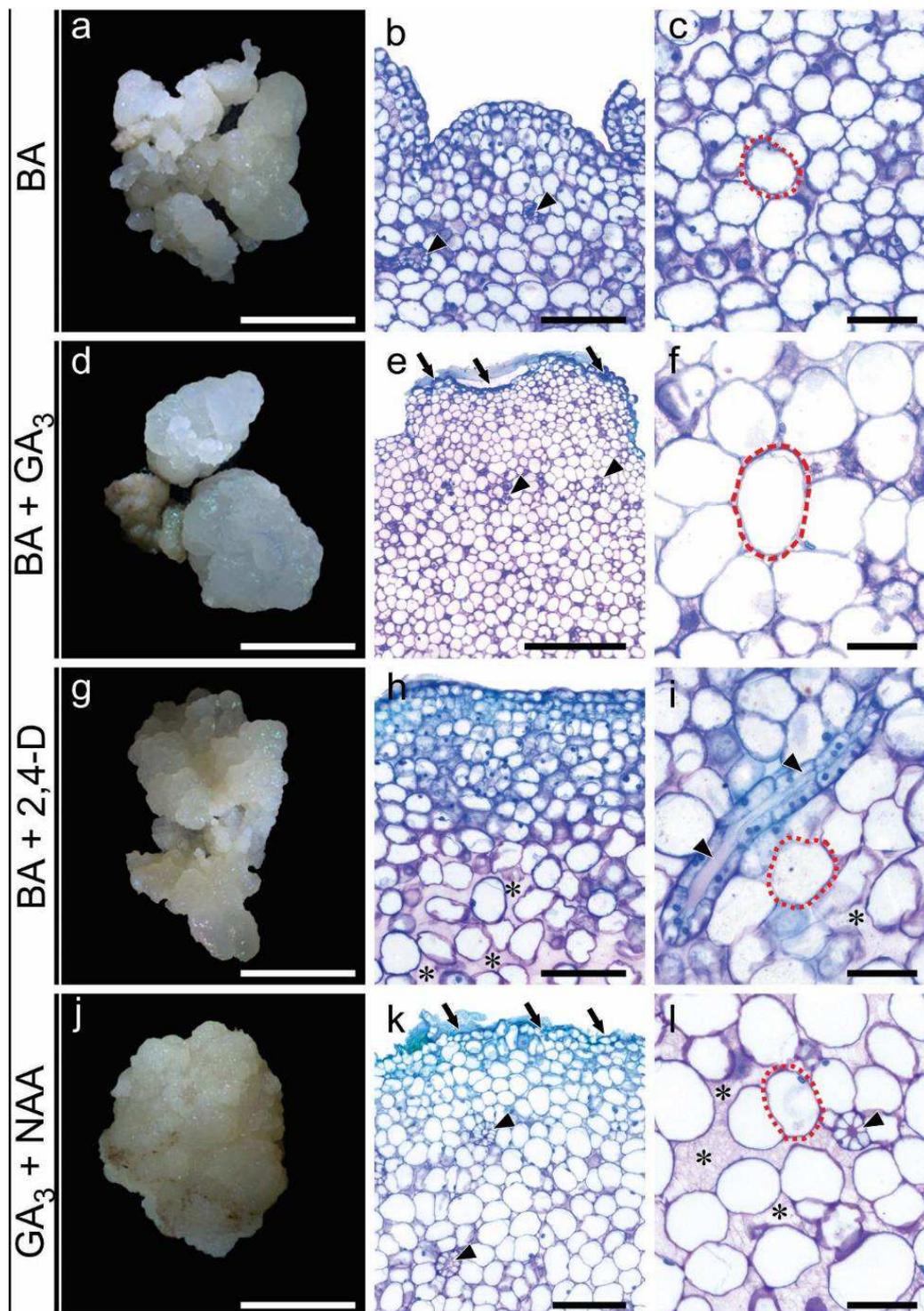


Figura 4 - Aspectos morfoanatômicos de calos de *Platania insignis* com 60 DAI submetidos a diferentes PGR'S adicionados ao meio de cultura MS. (a-c) calos submetidos ao tratamento MS + BA [2,5 µM]; (d-f) calos submetidos ao meio MS + BA [1,0 µM] + GA₃ [13,43 µM]; (g-i) calos mantidos em meio MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM]; e (j-l) calos mantidos em MS + GA₃ [13,43 µM] + NAA [23,40 µM]. Pontas de setas indicam cavidades secretoras esquizógenas. Linhas vermelhas tracejadas indicam volume celular. Setas indicam formação de parede periclinal externa. Barras: a-d-g-j 5mm; b-h-k 200µm; c-f-i-l 100µm; e 600µm.

Capítulo III

Estabelecimento de calos embriogênicos de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.)

Resumo

A técnica de embriogênese somática, demonstra grande potencial para melhorar o processo produtivo do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.), contribuindo para aumentar a eficiência da produção de *P. insignis*, acelerando o processo de domesticação, melhoramento e conservação do material genético da espécie. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi definir as concentrações e combinações de diferentes reguladores crescimento para multiplicar e regenerar calos embriogênicos de *Platonia insignis* Mart. Este estudo foi dividido em duas etapas, Experimento 1. Multiplicação e determinação de linhagens embriogênicas, no qual foram utilizados calos estabelecidos *in vitro* oriundos de frutos imaturos, e induzidos em meio MS suplementados com BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM]; Experimento 2. Eficiência da putrescina na regeneração de linhagens embriogênicas, no qual foram testados meios de cultura MS adicionado de 2,4-D e putrescina em quatro combinações: R1: 0,1 [µM] de 2,4-D + 50 [µM] de Put; R2: 0,1 [µM] de 2,4-D + 100 [µM] de Put; R3: 0,8 [µM] de 2,4-D + 50 [µM] de Put e R4: 0,1 [µM] de 2,4-D + 100 [µM] de Put. O experimento 2 foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. A análises de coloração revelaram calos sem potencial embriogênico, com aspecto esponjoso, macio e esbranquiçado. calos com potencial embriogênico, semi-compactos com coloração amarelada, denominados “Linhagem 1”. Neste estudo a combinação de 2,4-D 0,8 µm + putrescina 50 µm induziu a maior formação de calos com potencial embriogênico. A partir das informações encontradas aqui protocolos de embriogênese somática poderão ser desenvolvidos visando a propagação rápida e eficiente de *P. insignis*.

Palavras- chave: calos; frutos imaturos de bacurizeiro; frutífera amazônica.

Abstract

The technique of somatic embryogenesis shows great potential to improve the productive process of the bacuri tree (*Platonia insignis* Mart.), contributing to increase the efficiency of the production of *P. insignis*, accelerating the process of domestication, improvement and conservation of the genetic material of the species. In this context, the aim of this study was to define the concentrations and combinations of different growth regulators to multiply and regenerate embryogenic callus of *Platonia insignis* Mart. This study was divided into two stages, Experiment 1. Multiplication and determination of embryogenic lines, in which callus established *in vitro* from immature fruits were used and induced in MS medium supplemented with BA [2.5 µM] + 2.4- D [0.1 µM]; Experiment 2. Efficiency of putrescine in the regeneration of embryogenic lines, in which MS culture media added with 2,4-D and putrescine in four combinations were tested: R1: 0.1 [µM] of 2,4-D + 50 [µM] of Put; R2: 0.1 [µM] 2,4-D + 100 [µM] Put; R3: 0.8 [µM] 2,4-D + 50 [µM] Put and R4: 0.1 [µM] 2,4-D + 100 [µM] Put. Experiment 2 was carried out in a completely randomized design with four treatments and five replications. Color analysis revealed calluses without embryogenic potential, with a spongy, soft and whitish appearance. callus with embryogenic potential, semi-compact with yellowish color, called “Line 1”. In this study, the combination of 2,4-D 0.8 µm + putrescine 50 µm

induced greater callus formation with embryogenic potential. From the information found here, somatic embryogenesis protocols can be developed aiming at the rapid and efficient propagation of *P. insignis*

Keywords: calluses; immature bacuri fruit; Amazonian fruit tree.

1. Introdução

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) é uma fruteira arbórea, nativa da Amazônia oriental brasileira (Souza et al., 2013) ocorrendo também nas áreas amazônicas dos países: Peru, Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa (Nascimento et al., 2007) e Equador (Cavalcante, 1996). Possui elevado valor socioeconômico (Aguiar, 2006; Pontes et al., 2017), apresentando características organolépticas, farmacológicas e alto valor nutricional que conferem aos frutos de *P. insignis* a classificação nobre, e justificam a sua ampla aceitação no mercado, tanto para consumo *in natura*, quanto para produtos industrializados com algum grau de processamento (Santos et al., 2019).

Mas apesar da relevante importância da espécie, encontra-se em processo de domesticação, e seus frutos são em sua maioria oriundos do extrativismo vegetal, além de que os poucos plantios existentes são heterogêneos e com produção irregular, pois trata-se de uma espécie predominantemente alógama (Saraiva et al., 2013). Dentre as técnicas utilizadas para propagação do bacurizeiro, a enxertia e outros métodos de propagação assexuada são de uso limitado.

Como uma alternativa inédita para a espécie, o cultivo *in vitro* demonstra grandes vantagens e aplicações, pois a partir de técnicas como a embriogênese somática (SE), pode-se produzir grande quantidade de embriões e assim, propagar milhares de mudas com elevado potencial produtivo, contribuindo para aumentar a eficiência da produção de *P. insignis*, além de acelerar o processo de domesticação, melhoramento e conservação do material genético da espécie.

A embriogênese somática, que compreende a dediferenciação de uma célula somática em uma célula-tronco embrionária totipotente que pode originar um embrião *in vitro* (Verdeil et al., 2007; Ikeuchi et al., 2015), é uma alternativa viável para superar problemas de espécies arbóreas que demoram para atingir a maturidade e possuem um ciclo longo e irregular de produção de sementes (Rocha et al., 2011; Pais, 2019); como é o caso do bacurizeiro; tornando-se o principal modo de reprodução *in vitro*, visto que os

embriões somáticos desenvolvem simultaneamente meristema apical do caule e da raiz (Lelu-Walter et al., 2018).

Mas a obtenção de um suprimento suficiente de calos de alta qualidade embriogênica é uma etapa decisiva para o sucesso da SE. O calo embriogênico é a base da regeneração de plantas em grande escala e serve como importante material de transformação genética, sendo também um sistema ideal para estudar a totalidade da diferenciação de uma única célula e a expressão da totipotência (Zeng et al., 2007; Yang e Zhang 2010; Santa-Catarina et al., 2012; Steiner et al., 2016).

Esses calos podem ser induzidos a partir de um explante da planta, sob certas condições de cultivo, sendo igualmente mediadas por reguladores de crescimento (PGR's), geralmente combinações de auxinas e citocininas (Zuzana et al., 2011; Klimaszewska et al., 2016; Nunes et al., 2018). Em muitas plantas lenhosas, a redução da concentração de auxina ou citocinina estimula a indução de calos embriogênicos, devido a mudança na expressão de genes que regulam o ciclo celular, formação de parede e biossíntese de hormônios endógenos (Carron et al., 1995; Chalupa, 1995; Féher, 2008).

Além desses PGR's as poliaminas (PA's) podem ser aplicadas na melhoria dos processos de desenvolvimento de plantas *in vitro*, a exemplo dos trabalhos com *Citrus clementina* Hort. ex Tan (Chiancone et al., 2006), cultura de suspensão de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Silveira et al., 2006); e desenvolvimento embrionário somático de cana-de-açúcar (Reis et al., 2016). Ressaltando a necessidade de estudos testando esses reguladores também no processo embriogênico de *Platonia insignis*.

Além disso, a determinação do potencial embriogênico dos calos através de técnicas citoquímicas durante o cultivo *in vitro*, pode ser decisivo para a continuidade dos trabalhos visando a embriogênese somática (Silva, 2009). Para isso alguns corantes podem ser utilizados para identificação e viabilidade das células pró embriogênicas, dentre eles o carmim-acético e azul de Evans destacam-se na identificação dessas estruturas (Steiner et al., 2005).

Assim o objetivo deste estudo foi definir as concentrações e combinações de diferentes reguladores crescimento para multiplicar e regenerar calos embriogênicos de *Platonia insignis*, a fim de estabelecer um protocolo eficiente de embriogênese somática para propagação da espécie.

Material e métodos

2.1 Experimento 1. Multiplicação e determinação de linhagens embriogênicas

Calos de *Platonia insignis* oriundos de frutos imaturos, e induzidos em meio MS suplementados com [2,0 μM] de BAP + [0,8 μM] de 2,4-D foram utilizados como fonte de explante para a realização do experimento de multiplicação. Para a multiplicação, os calos foram repicados e transferidos para placas de Petri descartáveis de 90 x 15 mm (ProLab Ltda) contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) (PhytoTech Lab[®], KS, USA), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Isofar[®] Ltda, Duque de Caxias - RJ), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MO, USA), 2,0 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MO, USA) e 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MO, USA), com adição de reguladores de crescimento (PGR's): BA [2,5 μM] + 2,4-D [0,1 μM]. Após a inoculação, as placas foram seladas com filme de PVC (Rolopac[®]).

Após 60 dias em condições de sala de crescimento a 24 \pm 2°C de temperatura e no escuro, os calos foram avaliados e classificados quanto ao formato dos calos em: globular e friável. Para a confirmação da presença de células pró-embriogênicas, foram coletados frações de 5 mg de calos, macerando-os sobre uma lâmina de microscopia, com auxílio de bisturi e lâmina. A essa fração de calos macerada adicionou-se corante Azul de Evans a 0,1% por três minutos, retirando-se posteriormente o excesso da solução com auxílio de papel absorvente. Depois adicionou-se à fração de calos, três gotas de corante Carmim acético a 2,0% por três minutos (Valente, 2007). Em seguida, as lâminas foram fotografadas em esteriomicroscópio, com aumento de 10x a 40x.

2.2 Experimento 2. Eficiência da putrescina na regeneração de linhagens embriogênicas

Calos de *Platonia insignis* oriundos de frutos imaturos e multiplicados em meio MS suplementados com BA [2,5 μM] + 2,4-D [0,1 μM], foram utilizados como fonte de explantes para a realização do experimento de regeneração. Os calos foram repicados e transferidos para placas de Petri descartáveis de 90 x 15 mm (ProLab Ltda) contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) (PhytoTech Lab[®] KS, USA),

suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Isofar[®] Ltda, Duque de Caxias - RJ), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MS - USA), 2,0 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MS - USA) e 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (Sigma-Aldrich[®], St.Louis, MS - USA), com adição de reguladores de crescimento (PGR's) nas seguintes combinações: **R1**: 0,1 [µM] de 2,4-D + 50 [µM] de Put; **R2**: 0,1 [µM] de 2,4-D + 100 [µM] de Put; **R3**: 0,8 [µM] de 2,4-D + 50 [µM] de Put e **R4**: 0,1 [µM] de 2,4-D + 100 [µM] de Put.

Após 60 dias em condições de sala de crescimento a 24 ± 2°C no escuro, os calos foram classificados qualitativamente quanto ao formato (calos friáveis, globulares e massa de calos indefinida), coloração (calos amarelo translúcido, amarelo claro, amarelo e amarelo esbranquiçado) e capacidade de multiplicação dos calos (elevada, moderada, baixa e nula). Para isso, adotou-se um critério de notas atribuída às escalas numéricas decrescentes (adaptado de Corrêa, 2014) (Tabela 1). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições.

Tabela 1 Classificação qualitativa de calos de *Platonia insignis* Mart.

Notas em escala numérica	Formato	Coloração	Capacidade de multiplicação
4	-	amarelo translúcido	elevada
3	friáveis	amarelo claro	moderada
2	globulares	amarelo	baixa
1	massa de calos indefinida	amarelo esbranquiçado	Nula

2.2.1 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições (n=20). Os dados não-paramétricos das variáveis capacidade de multiplicação, coloração e formato de calos e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando o *software* SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2. Resultados

Experimento 1. Multiplicação e determinação de progênies embriogênicas

Não houve contaminação dos explantes nessa fase de multiplicação (Fig 1A). De acordo com a classificação dos calos adotada neste estudo, identificou-se a existência de dois formatos de calos: calos friáveis e massa de calos esponjosos. A análise de dupla coloração em ambas as células dos calos friáveis e esponjosos, demonstrou resultados diferentes quanto ao potencial embriogênico (Fig. 1). Os calos classificados como friáveis apresentaram células pequenas, redondas, com citoplasma denso, com reação positiva ao corante carmim acético (Fig. 1B-C), demonstrando características de células com potencial embriogênico. Já os calos classificados como esponjosos, apresentaram núcleos pequenos, citoplasma menos denso, formato alongado, e reação positiva ao corante azul de Evans, características de calos não-embriogênicos.

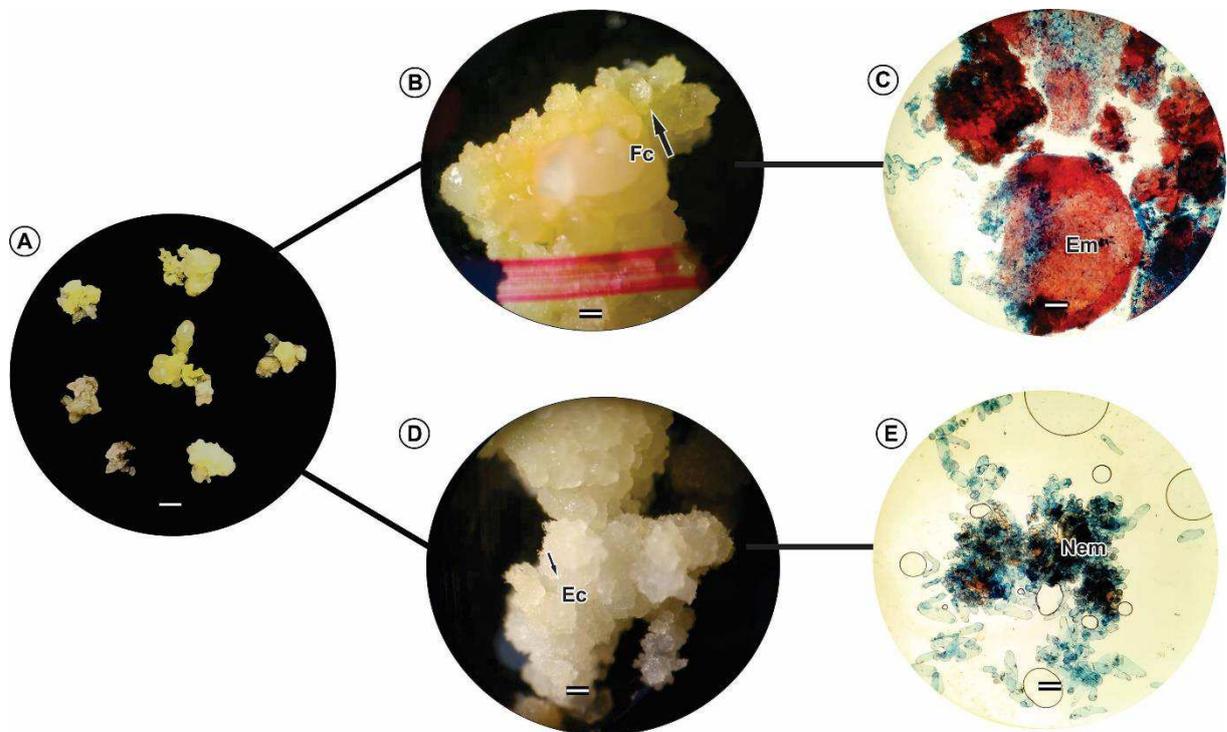


Figura 1. Calos de *Platonía insignis* multiplicados em meio MS suplementados com BA [2,5 μM] + 2,4-D [0,1 μM] e analisados a partir de dupla coloração com Carmim acético e Azul de Evans aos 60 DAI. Calos em meio de multiplicação (A); calos friáveis (B); fração de calos friáveis pró-embrionários com reação à dupla coloração (C). Calos globulares (D); fração de calos globulares com reação à dupla coloração (E). Abreviaturas: *Fc* – calo friável; *Ec* – calo esponjoso; *Em* – calo embriogênico; *Nem* – calos não embriogênicos. Barra: 1 mm.

Experimento 2. Eficiência da putrescina na regeneração de linhagens embriogênicas

Os resultados quanto às características calogênicas demonstram efeito dos PGR's nos caracteres qualitativos dos calos. A escala de notas atribuídas aos calos foi eficiente na estratificação dos tratamentos, e a análise qualitativa pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre os tratamentos para todas as variáveis qualitativas analisadas, capacidade de multiplicação, coloração e formato de calos (Fig.3A-C).

Os calos mantidos no meio com 2,4-D 0,1 μm + putrescina 50 μm (R1) e 2,4-D 0,1 μm + putrescina 100 μm (R2) apresentaram elevada capacidade de multiplicação. Uma moderada capacidade de multiplicação foi obtida nos calos mantidos no meio 2,4-D 0,8 μm + putrescina 50 μm (R3), já o tratamento com 2,4-D 0,8 μm + putrescina 100 μm (R4) apresentou calos com baixa capacidade de multiplicação (KW-H = 8,923; $p \leq 0,030$) (Figura 3A).

A análise qualitativa pelo teste de Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa entre os tratamentos para a variável coloração (KW-H = 14,558; $p \leq 0,0002$) (Figura 3C). Cada tratamento apresentou calos com predominância em uma coloração específica. Os calos mantidos no meio 2,4-D 0,1 μm + putrescina 50 μm (R1) apresentaram coloração amarelo, no meio 2,4-D 0,1 μm + putrescina 100 μm (R2) calos amarelo claro, e nos meios 2,4-D 0,8 μm + putrescina 50 μm (R3) e 2,4-D 0,8 μm + putrescina 100 μm (R4), amarelo translúcido e amarelo esbranquiçado, respectivamente (Figura 2A-C).

Quanto ao formato dos calos ambos os meios 2,4-D 0,1 μm + putrescina 50 μm (R1) e 2,4-D 0,1 μm + putrescina 100 μm (R2) apresentaram calos com formato globular (Figura 3B). O meio 2,4-D 0,8 μm + putrescina 100 μm (R4), proporcionou calos tanto em formato globular, quanto massa de calos não definida. Já o meio 2,4-D 0,8 μm + putrescina 50 μm (R3) apresentou calos com formato friável (Figura 2A-C).

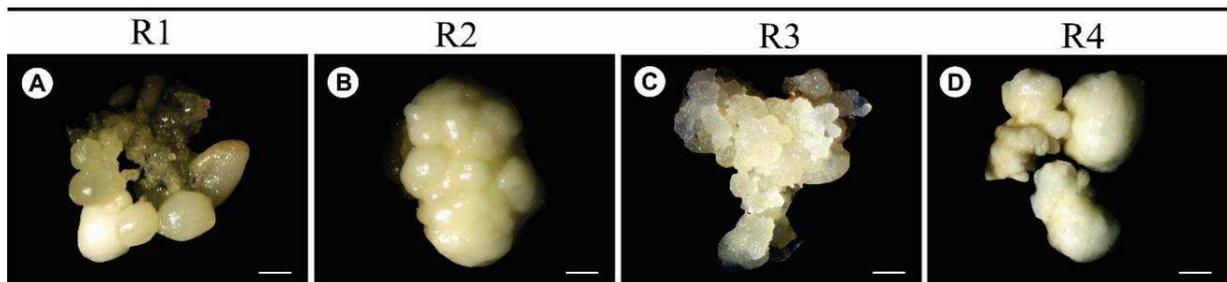


Figura 2. Calos de *Platanon insignis* Mart. aos 75 DAI induzidos em meio MS com adição de diferentes PGR's para regeneração de linhagens embriogênicas. Calos globulares do tratamento R1 (2,4-D 0,1 μm + putrescina 50 μm) (A); calos globulares do tratamento R2 (2,4- D 0,1 μm + putrescina 100 μm) (B); calos friáveis do tratamento R3(2,4-D 0,8 μm + putrescina 50 μm) (C); calos globulares do tratamento R4 (2,4-D 0,8 μm + putrescina 100 μm) (D). Barra: 1 mm.

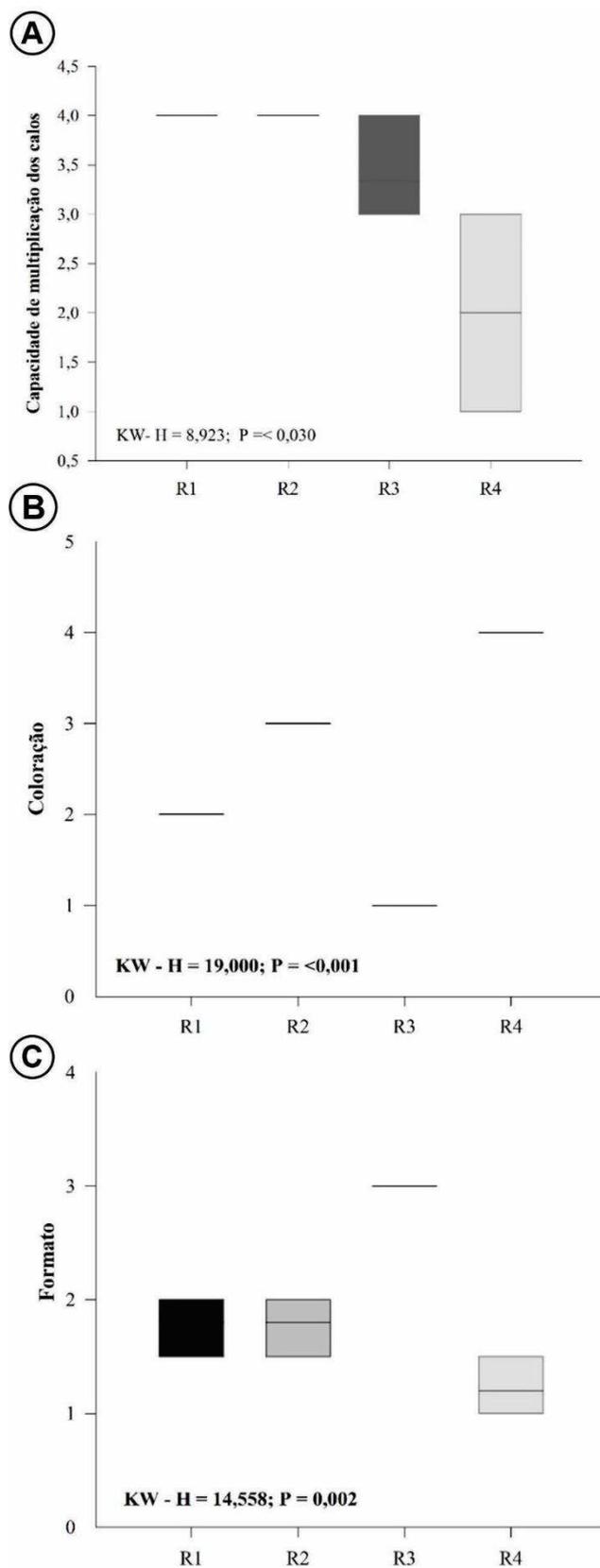


Figura 3. Características de calos de *Platonía insignis* submetidos a diferentes concentrações de PGR's para regeneração de linhagens embriogênicas. Capacidade de multiplicação de calos (a); Coloração de calos (b); formato de calos (c).

4. Discussão

4.1 Aspectos morfoanatômicos podem definir calos de *P. insignis* com potencial embriogênico

A partir das análises de coloração e avaliação quanto ao formato dos calos, foram obtidos dois tipos de calos com distintos potenciais morfogênicos: calos com potencial embriogênico, semi-compactos com coloração amarelada e facilmente destacáveis da estrutura original e que foram facilmente corados com carmim acético; e calos sem potencial embriogênico, com aspecto esponjoso, macio e esbranquiçado, corados com Azul de Evans. A reação positiva ao carmim acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular e posteriores diferenciações, características de células embrionárias (Durzan, 1988; Filonova et al., 2000; Steiner et al., 2005). Já o azul de Evan é um corante que penetra através de rupturas da membrana, colorindo o interior dessas células em azul (Bhargava et al., 2007), que geralmente são vacuoladas e alongadas, características de células já diferenciadas (Filonova et al., 2000).

Observou-se ainda que em uma mesma porção havia tanto calos friáveis quanto calos esponjosos. Essa variação na formação de calos embriogênicos numa mesma porção de calos com sem essas mesmas competências, pode ser em decorrência dos gradientes hormonais presentes na planta, e demonstra o que nem todas as células têm competência embriogênica.

Os calos embriogênicos identificados neste estudo apresentam as mesmas características já encontradas em outros trabalhos, onde as células apresentam um núcleo volumoso, centralmente posicionado, com um único nucléolo grande e uma alta relação núcleo: citoplasma, citoplasma denso com reservas de amido localizadas ao redor do núcleo. A parede contém poucos ou não possui plasmodesmos e um depósito de calosidades é encontrado com frequência, o que contribui para espessamento da parede (Ling You et al., 2006; Sané et al., 2006; Verdeil et al., 2007).

Já as células não embriogênicas se apresentam, na maioria dos casos, como células grandes, alongadas, vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado (Nogueira et al., 2007), assim como observado para células de calos de *P.*

insignis. Células não embriogênicas originam-se de células pouco diferenciadas dividindo-se em uma única direção e se diferenciam em células parenquimáticas com vacúolos visíveis e não apresentam amido e proteínas como substâncias de reserva. Já as células embriogênicas apresentam diversos planos de divisão e dão origem a células menores com pequenos grãos de amido (Guerra et al., 1999).

Ainda, de acordo com a diferenciação feita por Bartos et al., (2018), os calos podem ser classificados em dois tipos: tipo 1 (calos primários com competência embriogênica) e tipo 2 (calos primários sem competência embriogênica), o segundo tipo, ou calos não embriogênicos, sendo menos compactos, aquosos e esbranquiçado; crescendo desordenadamente, e composto predominantemente por células parenquimatosas alongadas com grandes espaços intercelulares.

Os resultados positivos quanto à calos com potencial embriogênico encontrados neste estudo, estão fortemente ligados à composição do meio de cultura nesta fase de multiplicação; pois o 2,4-D adicionado ao meio de cultura mantém estável a taxa de multiplicação celular (Macedo, 2010) isso pois as auxinas são as principais indutoras de multiplicação celular (Silveira et al., 2004).

Além disso esses resultados nos permitiram a classificação de uma progênie embriogênica, denominada de “linhagem 1”, que foi utilizada nos experimentos seguintes.

4.2 Auxinas e poliaminas combinadas na regeneração de calos embriogênicos

Neste estudo a obtenção de calos friáveis com coloração amarelo translúcido e consequentemente com melhor capacidade embriogênica foi encontrada no tratamento com maior concentração de 2,4-D combinado com a menor concentração de putrescina testada (0,8 μm + putrescina 50 μm) (R3). De maneira geral, porções translúcidas brancas ou amareladas dos calos são consideradas friáveis e com potencial para formarem embriões somáticos (Guerra et al., 1999; Ipekci e Gozukirmizi, 2005).

O 2,4-D é responsável pelo início do processo de divisão e diferenciação celular, bem como age na indução de células embriogênicas (Pasternak et al., 2002). Esta capacidade do 2,4-D em desencadear as rotas embriogênicas pode estar relacionada com a sua capacidade de induzir os genes do estresse, os quais contribuem para a

reprogramação celular de células somáticas em direção a embriogênese (Schwertner et al., 2008).

Além disso nossos resultados também denotam efeitos positivos da poliamina putrescina; molécula sugerida como crucial e com grande influência no crescimento, proliferação e regeneração celular em plantas (Arun et al., 2016). Várias PA's têm se mostrado importantes para a diferenciação celular e otimização de processos da embriogênese somática (Wu et al., 2009; Viu et al., 2009; Paul et al., 2009; Kumar et al., 2008; Silveira et al., 2006).

A partir das informações encontradas aqui protocolos de embriogênese somática poderão ser desenvolvidos visando a propagação rápida e eficiente de *P. insignis*. Neste estudo a combinação de 2,4-D 0,8 μm + putrescina 50 μm induziu a maior formação de calos com potencial embriogênico.

Referências

- Bhargava A, Osusky M, Forward, BS, Hancock RE, Kay WW, Misra, S. (2007). Expression of a polyphenol variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. *Plant cell, tissue, and organ culture*, 88, 301-312. <http://doi.org/10.1007/s11240-007-9204-9>.
- Durzan DJ. (1988) Process control in somatic polyembryogenesis. In: SYMPOSIUM DEPARTMENT OF FOREST GENETICS AND PLANT PHYSIOLOGY, 1988, Swedish. Proceeding Swedish: University of Agricultural Sciences.; 8:147–186.
- Ferrari IF, Marques GA, Junior WLS (2021). A ontogênese comparativa de embriões somáticos de *Coffea arabica* L. revela a eficiência da regeneração modulada pela fonte do explante e pela via de embriogênese. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 57, 769-810.
- Filonova LH, Bozhkov PV, von Arnold S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot*. 2000 51(343):249-64. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.249>. PMID: 10938831.
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. (Org.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CBAB,. 354 p.
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CBAB, 2: 537-548.
- Guimarães MS, Cruz GS, Montezuma-De-Carvalho JM. (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 15, 161-167.
- Ikeuchi M, Iwase A, Rymen B, Harashima H, Shibata M, Ohnuma M. (2015) PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 1, 1–7.
- Ipekci Z, Gozukirmizi N. (2005) Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79(3):341-345.
- Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter MA, Trontin JF. (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. *In vitro embryogenesis in higher plants*. Springer, New York, 131–161.
- Lelu-Walter MA, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques LE (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet Genomes* 9(4):883–899.
- Ling You X, Seon Yi J, Eui Choi Y (2006) Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. *Protoplasma* 227:105–112. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0149-3>.
- Macedo, AF. (2010) Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar. 91p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo.

- Munhoz M, Luz CFP, Meissner Filho PE, Barth OM, Reinert F. (2008) Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 31 (02): 209-214.
- Nogueira RC. (2007) Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de muricipequeno *Byrsonima intermedia* A. Juss. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5(2): 48-50.
- Nunes S, Marum L, Farinha N, Pereira VT, Almeida T, Sousa D (2018) Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 132(1):71–84.
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H. (2002) The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. *Plant Physiology*. 129:1807–1819.
- Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm 34 (*Phoenix dactylifera*). *Ann Bot* 98:301–308. doi: [https://doi.org/ 10.1093/aob/mcl104](https://doi.org/10.1093/aob/mcl104)
- Santa-Catarina C, Silveira V, Guerra MP, Steiner N, Macedo AF, Floh EI (2012) The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. *New For* 43(4):429–440.
- Santa-Catarina C, Silveira V, Scherer GFE, Floh EIS. (2007) Polyamine and nitric oxide levels correlate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 90: 93–101.
- Schwertner ABS, Nagao EO, Hidalgo AF, Zaffari GR. (2008) Efeito do 6- benziladenina (BA) e do ácido indolacético (AIA) na propagação invitro da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 10 (1):76-81.
- Sharp WR, Evans DA, Sondahl MR. (1982) Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: Fujiwara, A. (Ed.). *Plant Tissue Culture*. Tokio: Maruzen. 759-762.
- Silveira V, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Floh EIS, Guerra MP, Handro W. (2008) Biochemical changes during zygotic embryogenesis in *Pinus taeda* L.. *Plant Growth Regulation*,160: 35-47
- Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP. (2004) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 53-60.
- Steiner N, Farias-Soares FL, Éder C, Schmidt Pereira MLT, Scheid B, Rogge-Renner GD (2016) Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *araucaria angustifolia*, (bert.) o. kuntze. *Protoplasma* 253(2):487–501.
- Steiner N, Vieira FN, Maldonado S, Guerra MP. (2005) Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Brazilian Archives of Biology and Tecnology*. 48 (6):895-903.
- Valente, C. Caracterização de funções mitocondriais em *Araucaria augustifolia*. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12:245–252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.002>.

Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci.* 12, 245–252.

Yang XY, Zhang XL (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit Rev Plant Sci* 29(1):36–57.

Zeng FC, Zhang XL, Cheng L, Hu LS, Zhu LF, Cao JL, Guo XP (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics* 90(5):620–628.

Zuzana V, Kateřina E, Lucie F, Martin V (2011) The role of auxins in somatic embryogenesis of *abies alba*. *Cent Eur J Biol* 6(4):587–596.

Capítulo IV

Genetic variability during *in vitro* establishment of bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.): an Amazon species

Artigo em tramitação na Revista Australian Journal of Crop Science

Genetic variability during *in vitro* establishment of bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.): an Amazon species

Tácila Rayene dos Santos Marinho^{1*}; Thais Roseli Corrêa^{1,2}; Karina da Silva Vieira¹; Irislène Souza Albuquerque¹; Givago Lopes Alves¹; Marcos Vinícius Marques Pinheiro²; Fabrício de Oliveira Reis¹; Fábio Afonso Mazzei Moura de Assis Figueiredo², José Ribamar Gusmão Araújo¹, Tiago Massi Ferraz^{1,2};

Filiação:

¹Graduate Program in Agroecology State University of Maranhão, 65055-310 São Luís, MA, Brazil.

E-mail address: tacilarayene@hotmail.com; ORCID TRSM: 0000-0002-3838-1393*;

²Graduate Program in Agriculture and Environment, State University of Maranhão, 65055-310 São Luís, ma, Brazil.

*Corresponding author: TRSM (email: tacilarayene@hotmail.com) Graduate Program in Agroecology, State University of Maranhão, 65055-310, Sao Luis, MA, Brazil, ORCID - 0000-0002-3838-1393

Keywords: callogenesis; Clusiaceae; somatic embryogenesis; genetic diversity; micropropagation.

Abbreviations

AC_accession;

BLUP_Best Unbiased Linear Prediction;

CAL_callogenesis;

CVr_coefficient of relative variation;

DAI_days after inoculation;

h^2_g broad-sense heritability of individual plants;

Kpal_kilopascal;

LCT UEMA_Tissue Culture Laboratory of the Universidade Estadual do Maranhão;

M_overall average of the experiment;

MS_Murashige e Skoog;

OXI_percentage of oxidation;

PCDS_pinkish-colored defense structures;

REML_Restricted Maximum Likelihood;

ROOT_radicle;

SENEGEN_Statistical System and Computerized Genetic Selection by Mixed Linear Models);

SHOOT_shoot forming;

Ve_residual variance;

Vf_individual phenotypic variance;

Vg_genotypic variance between individuals;

(v/v)_volume by volume;

Abstract

As a Brazilian Amazon fruit, bacuri tree (*Platonia insignis* Mart.) has been pointed out as an important species to the sustainable management and development of the Amazon region. However, since it is not yet domesticated, techniques regarding its propagation are still incipient. This study aimed to evaluate the genetic control of traits related to *in vitro* establishment of *Platonia insignis* accessions from different regions of the Maranhão state, Brazil. Immature fruits were collected over different sites for explants obtention. The *in vitro* responsiveness of the genotypes was evaluated by assessing the percentage of explant oxidation (OXI), pinkish-colored defense structures (PCDS), callogenesis (CAL), radicle (ROOT) and shoot forming (SHOOT). Callus was classified according to its callogenic potential, namely as: globular-friable, with higher embryogenic potential; undefined structure [cell mass], with lower embryogenic potential; and white spongy-like callus, absent of embryogenic potential. The estimates of genetic parameters were accomplished via REML (Restricted Maximum Likelihood)/BLUP (Best Unbiased Linear Prediction) mixed model. The outputs showed high genetic variability within the studied population. Additionally, accessions AC.7, AC.2, AC.1, AC.6, and AC.8 showed as more efficient by considering characteristics related to the *in vitro* regeneration, thereby presenting a superior callogenesis ability; lower susceptibility to oxidation; and higher capacity for root and shoot formation. This was the first study to investigate the relationship among genetic parameters and selecting accessions of *P. insignis* for *in vitro* regeneration, thus providing support for studies related to micropropagation and domestication of this species.

Introduction

As a fruit tree native to the Brazilian eastern Amazon, bacuri (*Platonia insignis* Mart.) stands out due to its socio-economic importance and high ability to contribute to the management and sustainable development of this region (Cavalcante, 1996; Alvarez et al., 2013). Belonging to the subfamily Clusioideae and family Clusiaceae, bacuri is the only species of the genus *Platonia* that occurs in areas that cover Maranhão, Pará, and Piauí states (Do Nascimento et al., 2007). It grows and develops easily both in upland forests and open vegetation transition zones, either in open areas or low vegetation (Cavalcante, 1996; Souza et al., 2013), within regions that present humid and sub-humid climates, as in Maranhão, in which they form dense agglomerates or settlements, mostly in plateau areas (Menezes et al., 2010).

Bacuri tree is still under domestication process and its production is mainly conducted in an extractive way (Menezes et al., 2012). This species is facing a risk of genetic erosion due to the pressure of land use by agriculture and the lack of efficient techniques for its propagation. The current propagation techniques for bacuri are quite limited – e.g., sexual method, which leads to slow germination speed due to the low viability and apical bud dormancy (Carvalho and Nascimento, 2018; Menezes et al., 2012). Moreover, issues concerning genetic self-incompatibility have been also observed, a common event in Amazon flora species (Saraiva et al., 2013). Therefore, the development of alternative methods to sexual propagation can be decisive for both domestication and genetic breeding of bacuri.

In this context, tissue culture technique emerges as an excellent biotechnological approach since it uses small sections with high multiplication capacity. This procedure is able to boost the efficiency of seedlings production since *in vitro* plant cells can regenerate and originate many new plants via “cellular totipotency” (Canhoto, 2009; Kumar, 2011; Hussain et al., 2012; Guerra, 2016). However, it is well-known that heterogeneous genotypes do not respond homogeneously to the same stimuli; namely genotype-specificity or genotype-dependent explants.

For this reason, knowledge on the genetic control of *in vitro* regeneration related-traits is essential for a further selection of more responsive genotypes. For instance, by estimating genetic parameters, it is possible to identify the action nature of genes related to overall characters and assess the efficiency of different breeding strategies to obtain genetic gains and/or desirable genetic bases within populations

(Cruz and Carneiro, 2006; Oliveira et al., 2015). Estimations of *in vitro* heritability, for instance, have been used to determine *in vitro* genetically dependent characteristics and viability of early selection of responsive progenies in increasing final production (Bergmann and Stomp, 1994). For this, the optimal estimation/prediction REML/BLUP (restricted maximum likelihood/best linear unbiased prediction) method has been widely recommended.

Currently, there are no reports about *in vitro* propagation protocols or studies concerning genetic variability of varied materials with desirable characteristics to micropropagation methods for bacuri species. It is worth mentioning that an established protocol would be extremely useful to overcome general issues, such as slow germination speed and genetic self-incompatibility, which may provide *in vitro* propagation of superior genetic materials on a large scale. Furthermore, it may provide a theoretical foundation for the development of other techniques such as micrografting, which may pave the way for the implementation of more sustainable production systems in the Amazon.

Therefore, this study evaluated the genetic control of traits related to *in vitro* establishment of *Platonia insignis* accessions from different regions of Maranhão state/Brazil, seeking to select responsive genotypes for further cloning programs.

Results

Bacuri accessions present high variability for in vitro responses

Based on the decontamination protocol, no significant differences were observed in the percentage of contamination. At 60 DAI, explants of all accessions showed *in vitro* germinal and/or callogenic responses.

Embryogenic callus (CAL) classified as friable, globular, and clustered were frequently observed in both AC.1 and AC.10 accessions (Figure 3A and 3J, respectively). There were also formations of mass of callus with undefined shape (Figure 3E) in accessions AC.3, AC.2 and AC.4, thereby presenting a lower embryogenic potential. Additionally, a proliferation of white spongy-like callus without embryogenic potential was also observed (Figure 3I) in all other evaluated explants.

The highest values of percentage of explants oxidation (OXI) were observed in AC.1 and AC.3 explants (Figure 3C). However, all evaluated accessions showed a certain occurrence of OXI, but with no relevance. Pinkish-colored defense structures (PCDS) also occurred in bacuri explants, mainly in AC.7 (Figure 3E) and AC.6 accessions.

Radicle formation (ROOT) occurred majorly in AC.4 (Figure 3F) and AC.7 accessions. On the other hand, both AC.7 and AC.2 presented a higher incidence of shoot growth and development (SHOOT) (Figure 3B and 3H, respectively).

Among parameters that contribute to the detection of genetic variability within a population, it is important to assess the coefficient of relative variation (CVr). CVr is obtained by the relationship between coefficients of genetic and experimental variation, and it is not influenced by character average. Based on some evaluated characteristics, it was observed a presence of genetic variability among bacuri genotypes. Regarding CAL and OXI, CVr values were higher than the unity (1.09 and 1.24, respectively), demonstrating the presence of a higher genetic variation of bacuri genotypes available for *in vitro* cultivation. However, ROOT, SHOOT, and PCDS showed lower values of relative coefficient (0.59, 0.41 and 0.31, respectively) (Table 3).

CAL, OXI, ROOT and SHOOT showed broad-sense heritability values higher than 18% and significant accuracy by over 70%. Furthermore, CAL and OXI presented accuracies considered as very high (above 90%) (Table 3). This result indicates higher reliability for estimated values related to these traits and, therefore, certain accuracy by selecting bacuri genotypes based on them.

The heritability of individual plants in the sense-broad (h^2g) was considered moderate for CAL, ROOT, and SHOOT, while high for OXI (Table 3). Altogether, it characterizes considerable genetic control of these characteristics and, thus, a high heritability for future generations to be developed in genetic breeding programs.

Selective accuracy is an important parameter to be estimated, as it shows a correlation between true and predicted genetic values. In other words, the higher value, the more is the confidence of individuals' evaluation. According to the classification of heritability and accuracy in terms of magnitude and their associations, proposed by Resende (1998), the values observed in the present study were of high magnitude for CAL, OXI, ROOT, and SHOOT (above 70 %), which indicates that selection based on such characteristics hold an advantage.

Selection of bacuri for in vitro establishment

The lowest value in the rank indicates a more suitable combination between established characteristics; the highest, an unsuitable condition. Among selected accessions, AC.2 (Bacabeira - Santa Luzia) and AC.7 (Bacabeira), AC.1 (Codó - Bom Jesus) and AC.6 (Codó) and AC.8 (Morros) showed as promising genetic materials to *in vitro* responses, standing over the first five positions based on the rank of averages. Therefore, such accessions are indicated for selection procedures since they have demonstrated suitable characteristics for cloning via tissue culture technique (Table 4). Moreover, they can be indicated for both genetic breeding programs and future improvement of tissue culture techniques, including micrografting.

Discussion

This was the first study to investigate the relationship between genetic parameters and the selection of bacuri accessions for *in vitro* regeneration. Bacuri is a plant under the domestication process, thus there is still a lack of studies and protocols for its *in vitro* cultivation. In this context, tissue culture is an ideal technique to tackle obstacles during fruit production, such as a longer juvenile period, sporophytic self-incompatibility, and seed dormancy (Villachica, 1996).

Tissue culture is an attractive alternative to the propagation of *P. insignis* on a large scale; however, *in vitro* response efficiency is strongly associated not only with growth conditions - such as growth regulators in the culture medium - but also with the genetic material used as an explant (Jiménez, 2001), which depends highly on the genotype.

A relevant aspect of *in vitro* culture is the explants oxidation, a common issue in tissues of tropical trees (Grattapaglia and Machado, 1998). However, the younger the tissue, the less susceptibility to oxidation (Paiva and Paiva, 2001). In this study, it was observed a higher influence of oxidation during *in vitro* regeneration processes of bacuri.

The results of this study suggest that genotypes with superior callogenic ability, less oxidation susceptibility, and higher capacity for root and shoot formation, present a higher probability of success in establishing *in vitro* regeneration protocols applied to bacuri. Overall, the outcomes indicate that there is a genetic variability that can be exploited by *in vitro* genetic breeding and cloning programs of this species. Therefore, the mean of ranks index by Mulamba and Mock (1978) was applied to the values to rate the genotypes in a favorable order of genetic breeding.

One of the most important genetic parameters in pre-breeding and plant breeding studies is the coefficient of relative variation (CVr). The coefficient of genetic variation makes it possible to infer genetic variability between different characters, provide a base for superior genotypes selection, and enable genetic variability levels evaluation among different genotypes, environments, and characters (Ferrão et al., 2008).

The CVr can be used as an indicative index for genotype selection based on evaluated characters. When the estimated ratio is equal to or higher than 1.0, there is a favorable condition for the selection process - since it reflects in a higher proportion of genotypic variability regarding the environment (Vencovsky and Barriga, 1992; Farias Neto, 2003). In the present study, significant CVr was observed for two important characteristics during *in vitro* regeneration process, as callogenesis and explant oxidation. This indicates that selections based on such variables may be promising for bacuri clones via tissue culture technique.

Heritability is the major genetic parameter used in plant breeding programs. Its relevance lies in how many genetic effects are in the individual's phenotypes - since the genotype values are what influence, in fact, the next generations (Falconer and Mackay,

1996). The broad-sense heritability estimates were significant for CAL, OXI, ROOT and SHOOT.

On the other hand, scarce are the traits related to *in vitro* regeneration that present estimates of heritability and selection of responsive genotypes for cloning. In this vein, seeking to select genotypes for cloning, Corrêa et al., (2015) observed significant values in broad-sense heritability for callogenesis and formation of embryogenic lines (15 and 19%, respectively) in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Nugroho et al., (2014) observed higher estimates of sense-broad heritability for percentages of callogenesis and embryogenic callus (49 and 77%, respectively) from leaf explants in *Elaeis guineensis*. As claimed by the authors, such studies can be used to select more responsive progenies.

Methods that estimate or predict genotypic values must provide the most accurate and realistic inference as possible. In this sense, selective accuracy is a parameter of immense importance (Henderson, 1984). For instance, the greater the accuracy, the greater the correlation between predicted breeding values and phenotypic values (Pimentel et al., 2014). In the present study, values observed in selective accuracy were high for CAL, OXI, ROOT, and SHOOT. Overall, CAL and OXI presented values higher than 90%, leading to higher confidence during evaluations, as well as an accurate inference of genotypic values. Navroski et al., (2012) have used selective accuracy to assess experimental precision of callogenesis in apical and internodal stem segments of *Satureja hortensis*, in which a moderate accuracy (66%) was demonstrated for rhizogenic callus; and high (85-93%) for friable ones. In *Elaeis guineensis*, Corrêa et al., (2015) observed high values (>90%) in selective accuracies for embryogenic callus formation. According to these authors, high accuracies for *in vitro* culture experiments are due to the high number of replications, low number of contaminations, and reliability in estimated genetic values.

The mean of ranks index postulated by Mulamba and Mock (1978) classifies the accessions for each characteristic by attributing lower absolute values to those with superior performance. Subsequently, each characteristic value is summed and the average of ranks is obtained, thereby indicating the accession classification.

In the present study, accessions with superior callogenesis ability, low oxidation susceptibility, and high capacity for root and shoot formation were classified as favorable according to the order of genetic breeding. Thus, since they have ideal characteristics for both cloning and the establishment of future micrografting protocols,

the first five of the rank were selected. The success of tissue culture depends on the studied genotype (Silva et al. 2012; Thawaro and Te-chato, 2009). Herein, the outcomes demonstrated that the accessions AC.7, AC.2, AC.1, AC.6 and AC.8 are more efficient for *in vitro* regeneration and related characteristics. The sampling of bacuri accessions at different sites of collection provides high accuracy to select these accessions as progenies due to the high genetic variability (Pena et al., 2019).

Results concerning the micropropagation of this species are still incipient. Moreover, *in vitro* culture protocols are not available for seedlings production. Thus, it is worth highlighting the relevance of similar studies for bacuri, both for the prospect of somatic embryogenesis and organogenesis techniques, which can be adapted to the propagative management of this species.

Bacuri is a tree with a high capacity root branch formation (Homma et al., 2018), and new buds is able to emerge up to 1 km from the mother plant without genetic variability. This is harmful to bacuri trees since it leads to genetic self-incompatibility, commonly observed in other native species. An alternative to this event is the establishment of cultures originating from different grafted clones. Therefore, studies concerning genetic variability involving novel propagation techniques for this species can provide a theoretical foundation for the development of more advanced propagation methods, such as *in vitro* micrografting. This would make it possible to select materials responsive to the most desirable characteristics, and contribute to a more sustainable agricultural production system and biodiversity valuing in the Amazon region.

Knowledge on the genetic control of traits related to *in vitro* regeneration will be important for further selections of more responsive genotypes, essential to either obtain gains into the establishment of a clonal mini-garden or to select matrices that may be used in tissue culture techniques, including micrografting; mainly for species that present self-incompatibility such as *Platonia insignis*.

Materials and methods

Collection of plant material

Immature fruits (Figure 1C) were collected from ten matrices (accessions) of bacuri tree (*Platonia insignis* Mart.) (Figure 1 B) obtained over ten different locations of Maranhão state (Table 1, Figure 1A). They were subsequently moved to the Tissue

Culture Laboratory of the Universidade Estadual do Maranhão (LCT-UEMA) São Luís - MA. At the laboratory, they were submitted to the pre-washing procedure under running water and neutral detergent.

Disinfestation and in vitro establishment of *Platonia insignis* explants

In a laminar flow chamber, immature fruits were immersed in 70% alcohol (v/v) for five min and subsequently soaked in commercial sodium hypochlorite solution (Jesus Ltda®) (with 2% active chlorine), containing 1 drop of Tween® (Isogar Ltda®, Duque de Caxias - RJ) by 100 mL of solution, in which fruits remaining for 20 min. Afterward, they were rinsed three times for 2 min each with autoclaved distilled water. Both peel and pulp of the fruits were removed with a knife, being then submitted to seed disinfestation by immersion in 70% alcohol for 1 min, followed by sodium hypochlorite (with 2% active chlorine) containing 1 drop of Tween® in each 100 mL of solution, during 2 min. Finally, they were rinsed three times with autoclaved distilled water for two min each.

The seeds were excised until cortical meristem obtention (Figure 2A), which were inoculated in 350 mL flasks containing 30 mL MS medium (Murashige and Skoog, 1962) (PhytoTech Lab® Kansas - USA), supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose (Isogar® Ltda, Duque de Caxias - RJ), 100 mg L⁻¹ of myo-inositol (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri - USA), 2.0 g L⁻¹ of Phytigel® (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri - USA) and 3.0 g L⁻¹ activated charcoal (Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri - USA). The pH of the medium was set up to 5.8±0.1 before autoclaving at 121°C and 108 kPa for 15 minutes.

Characterization of in vitro responses and estimates of genetic parameters

The explants were kept in growth room conditions, under dark, for 60 d, at a temperature of 24±2°C and. The *in vitro* genotypes responsiveness was evaluated at 60 DAI (days after inoculation) by assessing the percentage of explant oxidation (OXI) (Figure 2B), pinkish-colored defense structures (PCDS) (Figure 2C), callogenesis (CAL) (Figure 2D), radicle (ROOT) (Figure 2E) and shoot forming (SHOOT) (Figure 2F). Callus was classified according to its callogenic potential, such as: globular-friable,

with higher embryogenic potential; undefined structure [cell mass], with lower embryogenic potential; and white spongy-like callus, absent of embryogenic potential. The occurrence of a pinkish color, like anthocyanins, was considered as a defense structure. The percentage of explant oxidation was expressed as 0, for non-oxidized explants; 25%, for explants oxidized by up to 1/4; 50%, for explants oxidized by up to 1/2; 75%, for explants oxidized by up to 3/4; and 100%, for fully oxidized explants.

Estimates of genetic parameters were accomplished by the REML procedure (Restricted Maximum Likelihood) / BLUP (Best Unbiased Linear Prediction) mixed model and deviation analysis (Anadev) (Resende et al. 2014), as follows:

$$y = Xu + Zg + e_2$$

where: y is the observed vector, b is the fixed-effects vector (overall mean), g is the random-effect vector of the total genotypic effects.

To classify the magnitudes of heritability and selective accuracy, parameters postulated by Resende 1998 were then used (Table 2).

Selection index

The predicted genotypic values were used to calculate the selection index, which is based on the sum of ranks to classify the relationship between genotypes and characters (Mulamba and Mock, 1978). Based on this classification, values of each character were summed, thus resulting in a general value considered as a selection index (Cruz et al., 2004).

Statistical analysis

The statistical analysis was accomplished by the SELEGEN-Reml/Blup (Statistical System and Computerized Genetic Selection by Mixed Linear Models) software v. 2016, model number 83 (Resende, 2016).

Conclusion

We have shown that there is an available genetic variability among bacuri accessions from different locations of the State of Maranhão, Brazil, for *in vitro* establishment. Based on the demonstration that callogenesis, percentage of oxidation, root formation, and shoot formation are important characteristics for *in vitro* selection of *Platonia insignis*, as it presents a high genetic control, our data suggest that the selection of AC.7 (Bacabeira), AC.2 (Bacabeira Santa Luzia), AC.1 (Codó), AC.6 (Codó - Bom Jesus) and AC.8 (Morros) present a higher probability of success for *in vitro* regeneration protocols for *Platonia insignis*, thereby providing the basis for future studies concerning the micropropagation of this species.

Acknowledgments

study was partially financed by the Foundation for the Support of Research and Scientific and Technological Development of Maranhão – FAPEMA (Universal process n° 00675/19), Graduate Program in Agroecology and the Graduate Program in Agriculture and Environment State University of Maranhão.

References

- Alvarez AS, Potiguara RCV (2013) Leaf anatomical characterization of specimens *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) in different seasonal periods. *Biosc J.* 29(3):562-569.
- Bergmann BA, Stomp AM (1994) Effect of genotype on *in vitro* adventitious shoot formation in *Pinus radiata* and correlations between pairs of phenotypic traits during *in vitro* shoot development. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*; 39: 185-194.
- Cavalcante PB (1996) *Frutas comestíveis da Amazônia*. 6 ed. Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi.
- Canhoto JM, Correia SI & Marque SCI (2009) Factors affecting somatic embryogenesis induction and development in *Feijoa sellowiana* Berg. *Acta Horti.* 839:147–156.
- Corrêa TR, Motoike SY, Coser SM, Silveira G, Resende MDV & Chia GS (2015) Estimation of genetic parameters for *in vitro* oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes. *Indus Crop Produc.* 7(77):1033-1038.
- Cruz CD, Regazzi AJ, Carneiro PCS (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v. 1. Viçosa: UFV, 480.
- Do Nascimento WMO, Carvalho JEU & De Muller CH (2007) Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). *Rev Bras de Fruticul.* 29:657–660.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetic*. 4th ed. Essex: Longman. 464 p.
- Farias Neto JT, Clement CR & Resende MDV (2013) Estimativas de parâmetros genéticos e ganho de seleção para produção de frutos em progênies de polinização aberta de pupunheira no estado do Pará, Brasil. *Bragantia.* 32(3), 122-126.

- Ferrão RG, Cruz CD, Ferreira A, Cecon PR, Ferrão MAG, Fonseca AFA, Carneiro PCS & Silva MF (2008) Parâmetros genéticos em café Conilon. *Pesq Agropec Bras* 43: 61-69.
- Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CBAB, v.1. p.183-260.
- Guerra MP et al. FIT5507 (2016) *Biotecnologia I: apostila v2016.1*. Santa Catarina: UFSC., 44p. Disponível em: <http://lfdgv.paginas.ufsc.br/files/2014/08/Apostila-Biotec-2016.1-Final.pdf>. Acesso em: 5, maio, 2021.
- Henderson CR (1984) *Applications of linear models in animal breeding*. University of Guelph, Guelph. 462 p.
- Homma AKO, Menezes AJEA, Carvalho JEU & Matos GB (2018) Manejo e plantio de bacurizeiros (*Platonia insignis* Mart.): a experiência no manejo e domesticação de um recurso da biodiversidade amazônica. *Inclusão Social*. 12 (1) 48-57.
- Hussain A, Qarshi IA, Nazir H & Ullah I (2012) *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*. In: Leva, A, Rinaldi LMR, *Recent advances in plant in vitro culture*. 1st edition. InTech, Croatia, 210.
- Jiménez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Braz J of Plant Physio*. 13: 196–223.
- Kumar A, Singh R & Chhillar RK (2008) Influence of omitting irrigation and nitrogen levels on growth, yield, and water use efficiency of coriander (*Coriandrum sativum*). *Acta Agro Hungar* 56: 69-74.
- Menezes AJEA De, Schöffel ER, Homma AKO (2010) Caracterização de sistemas de manejo de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) nas mesorregiões do nordeste

paraense e do marajó, estado do Pará. Amazônia: Ciência & Desenvolvi. Belém, 6 (11).

Menezes AJE, Homma AKO , Schöffel ER (2012) Do Extrativismo à Domesticação: O Caso do Bacurizeiro no Nordeste Paraense e na Ilha de Marajó. Documentos – 379. Embrapa, 99, 66.

Mulamba N, Mock JJ (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. Egypt J of Genet Cytoly.7, 40-51.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physio Plantarum, Copenhagen, 15(3) 473-497.

Navroski MC, Waldow DAG, Pereira MDEO , Pereira ADEO (2012) Calogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares e internodais em segurelha (*Satureja hortensis* L.). Rev Agroambiente On-line. 6: 228-234.

Nugroho YA, Sumertajaya IM, Wiendi NMA , Toruan-Mathius N, (2014). Estimation of genetic parameters for *in vitro* culture traits and selection best progenies for Tenera oil palm tissue culture. Energy Procedia. 4, 316 - 322.

Oliveira AS, Reis EF, Miranda Filho JB, Mendes UC , Rodrigues LO (2015) Genetic variability, and yield potential of three semiexotic maize (*Zea mays* L.) Populations variabilidade genética e potencial produtivo em três populações semiexóticas de milho (*Zea mays* L.). Biosci J. 31(6) 1609–1617.

Paiva R, Paiva PDO (2001) Cultura de tecidos – Textos acadêmicos. Lavras: UFLA/FAEPE. 97p.

Pena DN, Moura EF, Rodrigues SM, Oliveira MSP, Sanches JP , Moura MF (2019) Molecular characterization of a germoplasma bank of *Platonia insignis* Mart.: a fruit tree. Genetic Resou and Crop Evolut. 67,10.

- Pimentel AJB, Guimarães JFR, Souza MA, Resende MDV, Moura LM, Rocha JRASC & Ribeiro G (2014) Estimação de parâmetros genéticos e predição de valor genético aditivo de trigo utilizando modelos mistos. *Pesq Agrop Bras* 49, 882-890.
- Resende MDV, Mora AL, Higa AR, Filho EP (1998) Efeito amostral na estimativa da herdabilidade em espécies perenes. *Floresta* 28(12): 51-63.
- Resende MDV, Freitas J (2014) Divergência genética e índice de seleção via BLUP em acessos de algodoeiro para características tecnológicas da fibra. *Pesq Agrop Trop* 44, 334-340.
- Resende MDV (2016) Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. *Crop Breed Applied Biotech*.
- Saraiva RVC, Albuquerque PMC de, Girnos EC (2013) Floral and vegetative morphometrics of three *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) populations, a native tree from the Brazilian Amazon. *Plant Biosyst*, 148,1-9.
- Silva RC, Gomes Luis Z, Scherwinsky-Pereira JE (2012) Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 111, 59-67.
- Souza VAB, Vale EDe M, Gomes SO, Costa MDOPSD & Guimarães ARC (2013) Efeito da concentração de sacarose na germinação *in vitro* do pólen de cinco acessos de bacurizeiro (*Platonia insignis* MART.). *Rev Bras de Fruti*, 35:677-684.
- Thawaro S, Te-Chato S (2010) Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. *J of Agricul Techno*. 5(1), 167-177.
- Villachica H et al. (1996) Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperacion Amazonica. Secretaria Pro-tempore, 367, 44.

Vencovsky R, Barriga P (1992) *Genética biométrica no fitomelhoramento*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 486.

Tables

Tabela 1 Identification of *Platonia insignis* Mart. accessions selected over ten locations of the State of Maranhão, Brazil, and their respective geographic coordinates.

Locations	Geographic coordinates		Accessions ID
	Latitude	Longitude	
Codó (Bom Jesus)	4° 27' 18" S	43° 52' 44" O	AC.1
Bacabeira (Santa Luzia)	2° 58' 14" S	44° 18' 32" O	AC.2
São Luís - Angelin	2° 31' 51" S	44° 18' 24" O	AC.3
Viana	3° 12' 26" S	44° 59' 57" O	AC.4
Fazenda Escola	2° 31' 51" S	44° 18' 24" O	AC.5
Codó	4° 27' 18" S	43° 52' 44" O	AC.6
Bacabeira	2° 58' 14" S	44° 18' 32" O	AC.7
Morros	9° 27' 1" S	46° 17' 53" O	AC.8
Itapecuru	3° 23' 42" S	44° 21' 36" O	AC.9
Santa Bárbara	2° 31' 51" S	44° 18' 24" O	AC.10

Tabela 2 Classification of heritability magnitudes and selective accuracy to estimate *in vitro* genetic parameters of *Platonia insignis*.

Selective accuracy	Classification of magnitudes of individual heritability	Classification of magnitudes of accuracy for individual selection
0.51	Low	Low
0.55	$0.01 \leq h_a^2 \leq 0.150$	$0.10 \leq ra \leq 0.40$
0.58		
0.61	Mean or	Mean or
0.66	Moderate	Moderate
0.71	$0.15 \leq h_a^2 \leq 0.50$	$0.40 \leq ra \leq 0.70$
0.76	High	High
0.80 to 0.95	$h_a^2 \leq 0.50$	$ra \geq 0.70$

Tabela 3 Estimates of genetic parameters based on the analysis of 10 accessions of *P. insignis in vitro*, at 60 DAI, for callogenesis (CAL), oxidation percentage (OXI), radicle emission (ROOT), shoot emission (SHOOT), and formation of pinkish-colored defense structures (PCDS).

Parameter	PCDS				
s	CAL	OXI	ROOT	SHOOT	
Vg	0.0713	993.24	0.0673	0.0275	0.013
Ve	0.1053	822.68	0.1988	0.1615	0.1485
Vf	0.1766	1815.93	0.2662	0.1890	0.1624
CVr	1.09	1.24	0.59	0.41	0.31
h²_g	0.4037	0.5469	0.2530	0.1890	0.0856
Accuracy	0.90	0.92	0.84	0.79	0.70
M	0.7634	39.49	0.5515	0.2453	0.1946

Vg: genotypic variance between individuals; Ve: residual variance; Vf: individual phenotypic variance; CVr: coefficient of relative variation; h²_g: broad-sense heritability of individual plants; M: overall average of the experiment.

Tabela 4 Classification based on sum of ranks for ten genotypes of *P. insignis* for callogenesis (CAL), percentage of oxidation (OXI), radicle emission (ROOT), shoot emission (SHOOT), and formation of pinkish-colored defense structures (PCDS) at 60 DAI *in vitro*.

Rank	Genotype	Location	CAL	OXI	RAIZ	SHOOT	PCDS	Average Rank
1°	AC.7	Bacabeira	3	7	2	1	1	2.8
2°	AC.2	Bacabeira (Santa Luzia)	7	6	3	2	3	4.2
3°	AC.1	Codó (Bom Jesus)	6	1	7	4	5	4.6
4°	AC.6	Codó	5	8	5	3	2	4.6
5°	AC.8	Morros	2	5	8	5	4	4.8
6°	AC.4	Viana	10	4	1	6	8	5.8
7°	AC.10	Santa Bárbara	1	9	6	8	6	6.0
8°	AC.9	Itapecuru	4	10	4	7	7	6.4
9°	AC.5	Fazenda Escola	8	3	9	9	9	7.6
10°	AC.3	São Luís (Angelin)	9	2	10	10	10	8.2

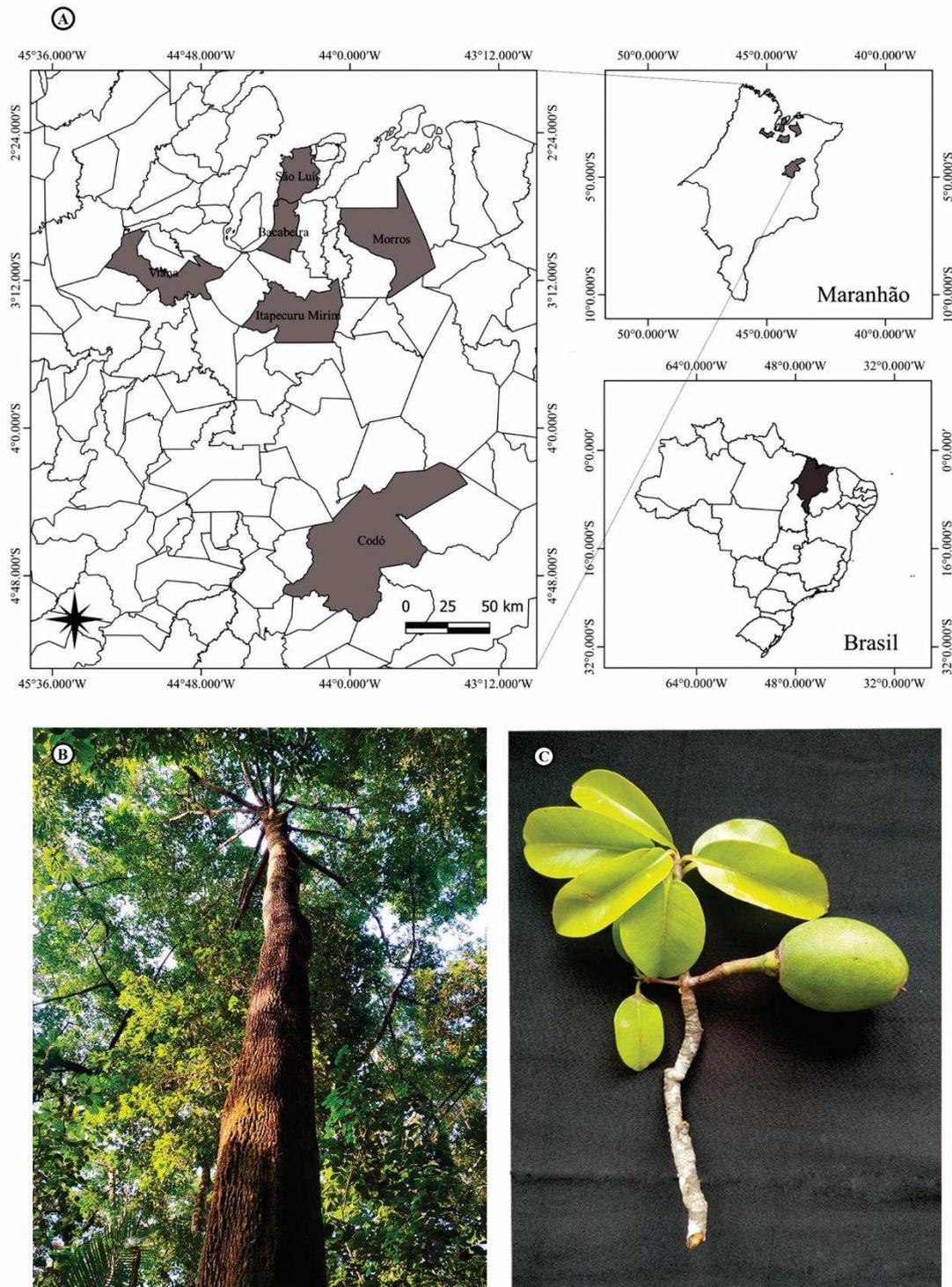


Figura 1 Distribution map of *Platonia insignis* accessions over the State of Maranhão, Brazil (A). *Platonia insignis* adult plant (B). Immature fruit of *Platonia insignis* (C).

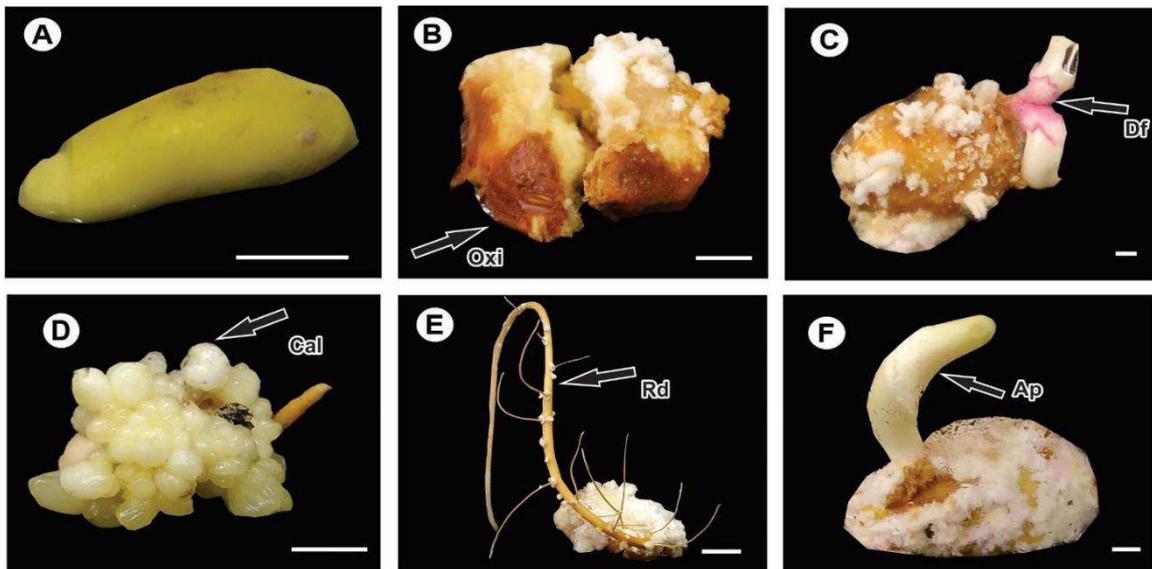


Figure 2 *In vitro* establishment of *Platonía insignis* embryos. (A) Early-stage embryo - 0 DAI coated with cortical meristem at the time of inoculation in MS medium absent of growth regulators. (B) Oxidation (OXI) of the embryo at 60 DAI. (C) formation of pinkish- colored defense structures (PCDS) in the shoot initiation region (arrowheads). (D) Callogenesis responses with the formation of globular-like embryogenic callus (CAL) (arrowheads) at 60 DAI (E) Radicle formation at 60 DAI (Rd). (F) Shoot formation at 60 DAI (Ap) Abbreviations: Oxi – the percentage of oxidation; Df – pinkish-colored defense structures; Cal – callogenesis; Rd - radicle emission; Ap – shoot emission. Bar: 3.5 cm

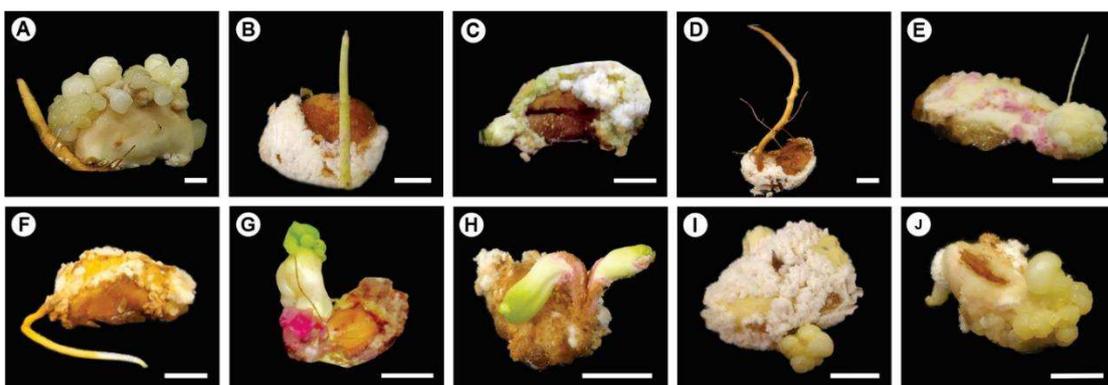


Figure 3 Embryos from 10 accessions of *Platonía insignis* at 60 DAI. AC.1 showing intense callogenesis, containing friable globular callus in the opposite region to the radicle emission (A). AC.2 displaying shoot formation and white spongy-like callus absent of embryogenic potential (B). AC.3 presenting intense oxidation and a little formation of white spongy-like callus (C). B.C. 4 showing intense radicle emission and formation of a

white spongy-like callus in opposite to the root axis (D). AC.5 demonstrating a suitable friable globular callus formation and undefined callus mass shape with less embryogenic potential, additionally to the formation of pinkish colored defense structure and radicle formation (E). AC.6 displaying root formation, and white spongy-like callus and undefined callus mass shape (F). AC.7 presenting pinkish-colored defense structures in the shoot-forming region, and undefined callus mass shape (G). AC.8 showing oxidized regions, besides callus and shoot formation (H). B.C. 9 displaying intense callogenesis (I). AC.10 presenting intense callogenesis and root initiation (H) Bar: 3.5 cm.

Considerações finais

Considerações finais

Os resultados desta pesquisa permitiram a obtenção de um protocolo eficiente de estabelecimento e indução de calos de *Platonia insignis* a partir de explantes oriundos de frutos imaturos, com bons resultados quanto à calogênese que servirão de subsídio para a micropropagação da espécie. A combinação de MS + BA [2,5 µM] + 2,4-D [0,1 µM] apresentou as respostas superiores quanto à capacidade de multiplicação, coloração e formato de calos. Ainda, as análises morfoanatômicas corroboram com esses resultados, uma vez que foi possível a obtenção de células com elevado conteúdo celular, isodiamétricas, núcleo e nucléolo bem definidos e com intensa atividade nas paredes periclinais.

Os testes de multiplicação e identificação de linhagens embriogênicas nos permitiram a classificação de uma progênie embriogênica, denominada de “linhagem 1”, que foi posteriormente utilizada nos experimentos. A combinação de 2,4-D 0,8 µm + putrescina 50 µm induziu a maior formação de calos com potencial embriogênico.

Além disso, a partir da avaliação de parâmetros genéticos, foi possível a identificação dos acessos AC.7 (Bacabeira), AC.2 (Bacabeira Santa Luzia), AC.1 (Codó), AC.6 (Codó - Bom Jesus) e AC.8 (Morros), como os de maior probabilidade de sucesso no estabelecimento de protocolos de regeneração *in vitro* de *P. insignis*.

Os resultados com a micropropagação dessa espécie ainda são incipientes, não se dispondo de protocolos de cultura *in vitro* até a obtenção de plântulas. Dessa forma, destaca-se a relevância das informações geradas nesse estudo para o desenvolvimento da embriogênese somática no bacurizeiro, técnica esta que será fundamental para otimizar o manejo propagativo da espécie.

ANEXOS

Anexo 1. Normas de formatação da Revista *Árvore*

O manuscrito deve ser preparado de acordo com as especificações da Tabela 1.

Tabela 1 – Regras para formatação de artigos

Formatação do artigo	Microsoft Word DOC, DOCX
Tamanho do arquivo	Até 10MB
Espaçamento entre linhas	1,5
Recuo de parágrafo	1,25 cm
Tamanho da página	A4 (210 X 297 mm)
Margem	2,5 cm
Fonte	Times New Roman, 12
Numeração de linha	Todas as linhas numeradas
Número máximo de páginas, incluindo tabelas e figuras	16
Número máximo de tabelas e figuras	5
Número de palavras-chave	3
Tamanho do resumo	280 palavras
Título do artigo	O título deve ser em letras maiúsculas, fonte em negrito, exceto em casos que possuam regras apropriadas, como nomes botânicos.
Principais tópicos do manuscrito	Os tópicos principais devem estar em letras maiúsculas, em negrito e numerados

	sequencialmente e devem incluir 1. INTRODUÇÃO, 2. MATERIAL E MÉTODOS; 3. RESULTADOS; 4. DISCUSSÃO; 5. CONCLUSÕES. 6. AGRADECIMENTOS E 7. REFERÊNCIAS
Subtítulos	Primeira letra maiúscula seguida de outras minúsculas, exceto aquelas que possuem regras gramaticais apropriadas. Os subtítulos devem ser numerados sequencialmente (por exemplo, 2.1 Área de estudo).

O manuscrito deve ter a seguinte estrutura:

Título, Autores, Resumo, Palavras-chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Agradecimentos (opcional) e Referências.

TÍTULO

Deve ser curto, conciso e informativo (máximo de 20 palavras). Evite siglas e métodos a menos que façam parte da originalidade da pesquisa.

AUTORES E AFILIAÇÕES

Os nomes dos autores não devem fazer parte do manuscrito apresentado. No processo de submissão, há um local apropriado para inserir os nomes dos autores. Use nome completo, afiliações, e-mail e o ORCID.

RESUMO

O resumo deve ser estruturado da seguinte forma:

- Contexto: O resumo deve iniciar com um Contexto, apresentando os argumentos que embasaram a pesquisa.
- Originalidade/contribuição/lacuna/ inovação: os autores devem indicar a inovação, contribuição ou qual lacuna o manuscrito preenche na Forest Science.
- Objetivo: deve indicar claramente o que o autor pretendia realizar.
- Metodologia: este tópico deve incluir uma breve descrição do material e métodos do estudo.

- Resultados: deve ter uma descrição sistemática dos resultados, destacando os principais dados para os leitores.
- Conclusão: as conclusões devem estar vinculadas ao objetivo, fornecendo respostas, explicações, principais achados do estudo com base nos resultados e discussão. As conclusões também podem resumir as implicações potenciais.

Referências e abreviaturas não são aceitas neste tópico.

PALAVRAS -CHAVE

Após o resumo, indicar três palavras-chave, separadas por ponto e vírgula. Não use palavras no plural, “ou”, “e”, abreviaturas e siglas. Palavras do título não são aceitas. Apenas a primeira letra de cada palavra-chave deve ser maiúscula.

INTRODUÇÃO

A introdução deve indicar claramente a importância do problema e apontar as lacunas de conhecimento com base no próprio conhecimento e referências. A originalidade da pesquisa e sua aplicação devem ser apresentadas de forma concisa. A descrição da introdução deve justificar cada objetivo da pesquisa.

O leitor deve imaginar quais são os objetivos da pesquisa ao ler a introdução. A motivação do estudo é particularmente importante para incentivar os leitores a continuar ou para ajudar os editores e revisores a definir se o artigo deve ou não ser publicado. Isso diz respeito principalmente a estudos que, a princípio, deveriam ser considerados como repetições de outros estudos. A introdução deve conter referências relacionadas ao assunto que sustentem a originalidade ou aplicação do estudo. Argumentos como “falta de estudos”, “referências escassas” e citação de livros devem ser evitados nesta seção. Os objetivos da pesquisa devem ser incluídos no final da introdução.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção deve suportar as informações necessárias para replicar o trabalho experimental. Para trabalho de campo, a área de estudo deve ser descrita detalhadamente, com coordenadas geográficas e mapas, se necessário. Os modelos de qualquer análise estatística devem ser claramente explicados. As principais recomendações são:

- O material e os métodos devem ser descritos na mesma ordem dos objetivos.
- Citar Os métodos publicados devem ser citados e apenas as alterações relevantes devem ser descritas.
- Caracterize, objetivamente, humanos, plantas, animais, organismos, máquinas, variáveis físicas, instrumentos de medida, etc.

RESULTADOS

Os resultados devem ser claros e concisos, delineando os principais achados. Os resultados a serem incluídos são apenas aqueles necessários para apoiar a discussão e as conclusões. Nesta seção, a discussão não deve ser apresentada. Os resultados devem ser

descritos na mesma ordem da seção Material e Métodos. Os resultados detalhados podem ser apresentados como tabelas ou figuras e não devem ser repetidos no texto.

DISCUSSÃO

Nesta seção, o autor deve discutir o significado dos resultados da pesquisa e não repeti-los. A discussão deve ser confrontada com a literatura relevante e descrita na mesma ordem de apresentação dos resultados.

A discussão geralmente deve conter os principais achados, indicando seus significados e implicações para a ciência e as práticas inovadoras. As relações com o conhecimento atual bem como as limitações ou constrangimentos também devem ser mencionadas. Não são aceitas citações de Tabelas e Figuras na discussão do manuscrito.

CONCLUSÕES

As conclusões devem ser concisas, destacando os principais achados do estudo de acordo com os objetivos. A conclusão é considerada uma das partes mais importantes do manuscrito. As principais recomendações para tirar as conclusões são:

- Explique as possíveis implicações e consequências do estudo.
- Evite abreviaturas, siglas e referências.
- Mostre a contribuição original ou a inovação da pesquisa.
- Responda aos objetivos do estudo.

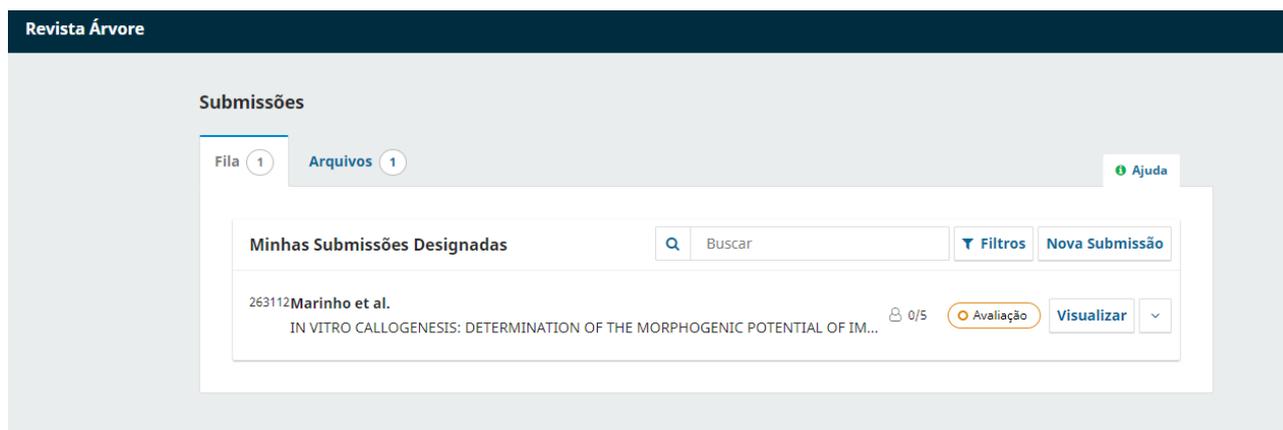
AGRADECIMENTOS (OPCIONAL)

Os agradecimentos devem ser concisos e limitados a agências de fomento ou a outros meios de apoio à pesquisa e, . devem ser incluídos apenas no procedimento de submissão.

REFERÊNCIAS

A lista de referências deve ser incluída de acordo com o estilo adotado pela Revista *Árvore*, conforme já descrito

Anexo 2. Comprovante de submissão da Revista *Árvore*



Anexo 3. Normas de formatação da Revista *Australian Journal of Crop Science*

Preparação do Manuscrito e Estilo: Artigos de pesquisa completos

Preparação do Manuscrito e Estilo

1) O idioma do diário é o inglês. Ortografia e terminologia em inglês britânico ou inglês americano podem ser usadas no artigo. Forneça seu manuscrito em espaçamento duplo (ou 1,5), fonte Times e New Roman (tamanho 12), alinhamento esquerdo, formato Word. Os colaboradores que não são falantes nativos de inglês são fortemente encorajados a garantir que um colega fluente no idioma inglês, se nenhum dos autores for assim, revise seu manuscrito. A revista tem uma opção para facilitar a correção de idiomas dos manuscritos, se os autores não tiverem certeza sobre a correção da gramática e ortografia dos manuscritos.

2) Estilo dos trabalhos: Os trabalhos de pesquisa originais geralmente não devem exceder 12 páginas de texto impresso, excluindo referências, tabelas e legendas de figuras (uma página de texto impresso = aproximadamente 600 palavras). Um manuscrito para um trabalho de pesquisa deve ser montado na seguinte ordem: Título, Autor (es), Afiliação (ões) (se o autor sênior não for o autor correspondente, isso é indicado) Palavras-chave, Abreviações, Resumo, Introdução, Resultados, Discussão (resultados e discussão podem ser combinados), Materiais e métodos, Conclusão, Agradecimentos, Referências. Tabelas e figuras (JPEG / 75 DPI ou mais) devem ser colocadas no final do manuscrito, após a seção de referência, e numeradas consecutivamente (por exemplo, para figuras, Fig 1.,

Fig 2 e para tabelas 1., Tabela 2. etc.). Coloque tabelas e figuras no final do manuscrito consecutivamente.

Resumo: forneça um resumo breve entre 150 e 250 palavras. O resumo não deve conter abreviações indefinidas ou referências não especificadas. Geralmente, o resumo resume o trabalho relatado e não contém informações básicas ou declarações especulativas.

Introdução: Esta seção deve discutir o caso do seu estudo, descrevendo apenas os antecedentes essenciais, mas não deve incluir os resultados nem as conclusões. Não deve ser uma revisão da área de assunto, mas deve terminar com uma declaração clara da questão que está sendo abordada. Forneça um contexto para o relatório com relação ao trabalho anterior realizado em campo. A literatura deve ser citada.

Resultados: isso deve destacar os resultados e a significância dos resultados e colocá-los no contexto de outro trabalho. O parágrafo final deve fornecer um resumo das principais conclusões.

Discussão: É necessária uma seção de discussão abrangente para justificar os resultados. Normalmente, uma comparação entre seus resultados e os resultados de trabalhos anteriores deve ser apresentada na Discussão.

Materiais e métodos: Forneça detalhes metodológicos suficientes para permitir que uma pessoa competente repita o trabalho. Tabelas, gráficos e figuras As tabelas, gráficos e figuras devem ser colocadas ao final do manuscrito, após a seção de referência, com as legendas e numeradas consecutivamente. Para figuras e gráficos ou ilustrações, basta usar a Fig 1., Fig 2. etc. Para tabelas Basta usar a Tabela 1., Tabela 2. etc.

Agradecimentos: Apenas mencione um rápido agradecimento aos provedores de fundos, apoiadores etc.

Referência cruzada: No texto, uma referência identificada por meio do nome de um autor deve ser seguida pela data da referência entre parênteses como Xue et al. (2011). No texto quando houver mais de dois autores, apenas o nome do primeiro autor deve ser mencionado, seguido por 'et al.' Por exemplo. Xu et al., (2016). Caso um autor citado tenha publicado dois ou mais trabalhos no mesmo ano, a referência, tanto no texto quanto na lista de referências, deve ser identificada por letra minúscula. Todos os exemplos abaixo podem ser usados no texto: De acordo Mark (1986); (Smith, 1987a, b), (Jones, 1986; Elders et al., 1988), (Bullen e Bennett, 1990).

Referências:

A) Artigo de periódico: Smith J, Jones MJ, Houghton LD (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med.* 965: 325–329.

B) Edição da revista com o editor da edição: Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J.* 14 (6): 126-233.

C) Capítulo do livro: Brown B, Aaron M (2001) A política da natureza. In: Smith J (ed) *O surgimento da genômica moderna*, 3ª edn. Wiley, Nova Iorque.

D) Trabalho apresentado em uma conferência: Chung ST, Morris RL (1978) Isolamento e caracterização do ácido desoxirribonucleico plasmídeo de *Streptomyces fradiae*. Trabalho apresentado no III Simpósio Internacional sobre Genética de Microrganismos Industriais, Universidade de Wisconsin, Madison, de 4 a 9 de junho de 1978.

E) Procedimentos como livro (em uma série e sub-série): Zowghi D et al (1996) Uma estrutura para raciocinar sobre requisitos em evolução. In: Foo N, Goebel R (eds) *PRICAI'96: tópicos em inteligência artificial*. 4ª Conferência da Orla do Pacífico sobre inteligência artificial, Cairns, agosto de 1996.

F) Notas de aula em ciência da computação (notas de aula em inteligência artificial), vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157. 6. Processo com um editor (sem editor): Aaron M (1999) O futuro da genômica. In: Williams H (ed) *Proceedings dos pesquisadores genômicos*, Boston, 1999.

Encargos de publicação: existe uma taxa de 530 AUD (dólares australianos) por artigo para publicação on-line. A partir de 1º de julho de 2018, um GST de 10% será aplicado. Uma pequena taxa de transação bancária pode ser cobrada dos autores / pagamentos de outros países. A publicação dos manuscritos não se restringirá à capacidade dos autores de fazer a taxa de publicação. Os manuscritos de autores australianos podem ser publicados gratuitamente, se o projeto tiver sido realizado ou financiado por universidades / institutos australianos. Para solicitar a cópia impressa do periódico e as reimpressões ou fazer perguntas sobre a taxa de publicação, entre em contato com o editor-gerente da revista: tony.elders@gmail.com

Anexo 5. Comprovante de tramitação de artigo na Revista Australian Journal of Crop Science





CASA
SOBRE
PÁGINA INICIAL DO USUÁRIO
PÁGINA INICIAL DO JORNAL

Home > Usuário > Autor > Submissões > #3575 > Revisão

#3575 Revisão

RESUMO ANÁLISE EDITANDO

Submissão

Autores	Tácila Rayene dos Santos Marinho, Thais Roseli Corrêa, Karina da Silva Vieira, Irislene Souza Albuquerque, Givago Lopes Alves, Marcos Vinícius Marques Pinheiro, Fabrício de Oliveira Reis, Fábio Afonso Mazzei Moura de Assis Figueiredo, José Ribamar Gusmão Araújo, Tiago Massi Ferraz
Título	Variabilidade genética no estabelecimento in vitro de bacuri (<i>Platonia insignis</i> Mart.): uma espécie amazônica
Seção	Artigos
editor	Tony Elders

Revisão por pares

Rodada 1

Versão de revisão	3575-8011-1-RV.DOCX	2021-11-18
Iniciado	—	
Última modificação	—	
Arquivo enviado	Nenhum	

DO UTILIZADOR
Você está logado como **tacilarayene**

- [Meus Diários](#)
- [Meu perfil](#)
- [Sair](#)

SISTEMAS DE DIÁRIO A

[Ajuda do Diário](#)

NOTIFICAÇÕES

- [Visualizar](#)
- [Gerenciar](#)

AUTOR

Envios

- [Ativo \(1\)](#)
- [Arquivo \(0\)](#)
- [Novo envio](#)

TAMANHO DA FONT

EM FORMAÇÃO

- [Para leitores](#)
- [Para autores](#)
- [Para bibliotecários](#)

AJCS-Marinho-PNE3575 [Major revisions required] 8

Traduzir a mensagem para: [Português \(Brasil\)](#) | [Nunca traduzir do: Inglês](#)

TE Tony Elders <tony.elders@gmail.com>
Seg, 21/03/2022 04:30
Para: Você

Dear Dr. Tácila Rayene dos Santos Marinho

Hereby, I acknowledge the receipt of your revised files and I will be back to you with a final decision as soon as possible. Thank you.

Regards
Tony
Australian Journal of Crop Science



On Sat, Mar 5, 2022 at 6:49 AM Tácila Marinho <facilarayene@hotmail.com> wrote:

Dear Dr. Mr. Editor-in-Chief Tony Elders

Thank you for considering our article in the Australian Journal of Crop Science. As requested, we made corrections and adjustments to the manuscript: Genetic variability in the *in vitro* establishment of bacuri (*Platonia insignis* Mart.): an Amazon species. Attached, are the corrected manuscript and the responses to the reviewers in a document in word format. We also did a review of the English language and attached here the Statement of Review by a Specialized Company. In addition, we have attached the Consent Document for publication and transfer of Copyright.

Grateful for your attention and available for any communication.
Yours sincerely,

Tácila Rayene dos Santos Marinho