

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

TACIANY FEITOR CARVALHO

**INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS DAS
ESPÉCIES *Bowdichia Virgilioides* Kunth E *Vanilla Phaeantha* Rchb.f. EM EXPOSIÇÃO
AO ETILENO E ÓXIDO NÍTRICO.**

Alfenas/MG

2025

TACIANY FEITOR CARVALHO

**INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS DAS ESPÉCIES
Bowdichia Virgilioides Kunth E *Vanilla Phaeantha* Rchb.f. EM EXPOSIÇÃO AO ETILENO E
ÓXIDO NÍTRICO.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos

Alfenas/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Carvalho, Tacyany Feitor.

Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos das espécies *Bowdichia Virgilioides* Kunth e *Vanilla Phaeantha* Rchb.f. em exposição ao etileno e óxido nítrico. / Tacyany Feitor Carvalho. - Alfenas, MG, 2025.

70 f. : il. -

Orientador(a): Breno Régis Santos.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Lenhosa. 3. Herbácea. 4. Fitormônio. 5. Molécula sinalizadora. I. Santos, Breno Régis, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

TACIANY FEITOR CARVALHO

INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS DAS ESPÉCIES *Bowdichia Virgilioides* Kunth E *Vanilla Phaeantha* Rchb.f. EM EXPOSIÇÃO AO ETILENO E ÓXIDO NÍTRICO

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 04 de julho de 2025.

Prof. Dr. Breno Régis Santos

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Prof. Dra. Gabriela Ezequiel Costa Martins

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)



Documento assinado eletronicamente por **Breno Régis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2025, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1552789** e o código CRC **FD488141**.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Financiamento 001.

Agradeço o apoio financeiro recebido pela Agência de fomento FAPEMIG ao longo do curso. Agradeço à UNIFAL-MG por ter colaborado para minha formação desde a graduação até o final do mestrado, além dos orientadores Prof. Dr. Breno Régis Santos e Prof. Dr. Antonio Rodrigues da Cunha Neto, por terem me aconselhado e guiado com paciência e didática ao longo dos meus projetos acadêmicos. Aos meus amigos e familiares que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e sempre estiveram ao meu lado nos momentos em que precisei de um ombro amigo. Como um todo, sou grata por ter passado por essa fase de forma tão produtiva, com erros e acertos, sempre aprendendo e reconhecendo o que posso melhorar, tanto profissionalmente quanto para meu crescimento pessoal. A realização desta dissertação reflete minha busca constante pelo crescimento, tanto na carreira quanto na vida. Agradeço a todos que fizeram parte dessa trajetória.

RESUMO

O etileno tem diversas funções fisiológicas e morfológicas, é um hormônio produzido naturalmente pelas plantas. Foi testado em algumas espécies no processo de regeneração, como na indução da embriogênese somática a fim de compreender melhor como ele influencia no metabolismo e na formação de estruturas morfológicas. Outro hormônio vegetal que possui propriedades importantes no desenvolvimento das plantas é o óxido nítrico, o qual é conhecido por apresentar características antioxidantes, prevenindo a reatividade do oxigênio em algumas espécies, impedindo danos oxidativos nas plantas, além de proteger e melhorar o estresse oxidativo. Com o intuito de obter informações como as citadas para melhoria genética, avanço biotecnológico e a preservação da espécie a ser trabalhada, o presente trabalho teve como objetivo o emprego do etileno e do óxido nítrico como indutores da embriogênese somática na espécie *Bowdichia virgilioides*, popularmente conhecida como Sucupira preta. As concentrações de etileno foi de 10 e 20 ppm e para o GSNO, doador de óxido nítrico, foi utilizada as concentrações 10 e 40 μM . As análises foram realizadas através da avaliação da formação de calos, embriões e raízes adventícias a partir dos explantes radiculares cultivados *in vitro* em condições controladas em BOD no escuro. O tratamento de GSNO teve desempenho inferior ao controle, não apresentando resultados significativos na micropropagação vegetal. Já o experimento realizado com etileno, os resultados tiveram sucesso, com formação de 52% de embriões somáticos na maior concentração testada em tempo menor que o que ocorre naturalmente. A pesquisa prosseguiu com o teste de uma faixa maior de concentração de etileno em duas espécies diferentes: *Bowdichia virgilioides* e *Vanilla phaeantha*, espécies lenhosa e herbácea, respectivamente. A indução dos embriões somáticos foi feita a partir de explantes cultivados *in vitro* com diferentes concentrações (0; 15; 20; e 25ppm) de Ethrel, composto doador de etileno. As análises foram realizadas através da avaliação da formação de calos, embriões e raízes adventícias em condições controladas e desta vez com fotoperíodo de 12h. Os resultados em *Bowdichia virgilioides* teve interação negativa na formação de embriões somáticos, porém foi positiva na formação de calos em qualquer concentração testada, sendo que a maior porcentagem de calos formados foi com os tratamentos de 20 e 25ppm. Em *Vanilla phaentha*, popularmente conhecida como orquídea, houve oxidação total dos explantes independente da concentração de etileno utilizada.

Palavras-chave: micropropagação; lenhosa; herbácea; fitormônio; molécula sinalizadora.

ABSTRACT

Ethylene plays various physiological and morphological roles as a naturally occurring plant hormone. It has been tested in several species during regeneration processes, such as in the induction of somatic embryogenesis, to better understand its influence on metabolism and the formation of morphological structures. Another phytohormone with significant importance in plant development is nitric oxide, known for its antioxidant properties, which prevent oxygen reactivity in certain species, thereby mitigating oxidative damage and enhancing protection against oxidative stress. To gather insights for genetic improvement, biotechnological advancement, and species conservation, this study aimed to evaluate the use of ethylene and nitric oxide as inducers of somatic embryogenesis in *Bowdichia virgilioides*, commonly known as Sucupira preta. Ethylene concentrations of 10 and 20 ppm were tested, while the nitric oxide donor GSNO was applied at concentrations of 10 and 40 μ M. Analyses were conducted by assessing callus formation, somatic embryos, and adventitious roots from root explants cultured *in vitro* under controlled conditions in a BOD incubator in darkness. The GSNO treatment underperformed compared to the control, showing no significant results in plant micropropagation. In contrast, the ethylene experiment was successful, yielding a 52% somatic embryo formation rate at the highest concentration tested, in a shorter time than occurs naturally. The research continued by testing a broader ethylene concentration range in two different species: *Bowdichia virgilioides* (woody) and *Vanilla phaeantha* (herbaceous). Somatic embryo induction was performed using *in vitro*-cultured explants treated with different concentrations (0, 15, 20, and 25 ppm) of Ethrel, an ethylene-releasing compound. Analyses included evaluating callus formation, somatic embryos, and adventitious roots under controlled conditions, this time with a 12-hour photoperiod. In *Bowdichia virgilioides*, ethylene negatively influenced somatic embryo formation but positively affected callus induction at all tested concentrations, with the highest callus formation rates observed at 20 and 25 ppm. In *Vanilla phaeantha*, commonly known as orchid, complete explant oxidation occurred regardless of ethylene concentration.

Keywords: micropropagation; woody plants; herbaceous plants; phytohormone; signaling molecule.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	<i>Bowdichia virgilioides</i> KUNTH.....	10
2.2	<i>Vanilla phaeantha</i> RCHB.F.	11
2.3	CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	12
2.4	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA (ES)	12
2.5	CALOGÊNESE.....	14
2.6	INDUTORES DA ORGANOGÊNESE	15
2.7	EXPOSIÇÃO DE ESPÉCIE LENHOSAS E HERBÁCEAS AO ETILENO	17
3	ARTIGOS.....	19
3.1	INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SUCUPIRA PRETA ATRAVÉS DO USO DO HORMÔNIO VEGETAL ETILENO E DA MOLÉCULA SINALIZADORA ÓXIDO NÍTRICO	20
3.2	INFLUÊNCIA DO ETILENO NA MICROPROPAGAÇÃO DA ESPÉCIE NATIVA BRASILEIRA <i>Bowdichia virgilioides</i> KUNTH	39
3.3	OXIDATION AND VIABILITY OF <i>VANILLA PHAEANTHA</i> RCHB.F. EXPLANTS EXPOSED TO ETHYLENE IN VITRO CULTIVATION	52
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO GERAL

A biodiversidade é essencial para a sobrevivência dos seres vivos do planeta Terra, garantindo o equilíbrio dos ecossistemas. A variedade das espécies e formas de vida garantem o desenvolvimento de produtos de todas as áreas, como na área de saúde, agricultura, alimentação e meio ambiente, além de proporcionar o funcionamento eficiente dos ecossistemas como a qualidade do ar, da água e dos habitats naturais. Em consequência das mudanças climáticas, poluição e destruição de biomas inteiros causados pela espécie humana, espécies vegetais já foram extintas ao longo das últimas décadas. Com isso, a preservação é uma alternativa viável para um futuro sustentável e a sobrevivência das espécies já existentes. Existem diferentes técnicas desenvolvidas em laboratório para a preservação vegetal, dentre elas, a micropropagação que é subdividida em quatro metodologias distintas: a organogênese, a embriogênese somática, a proliferação de gemas e a cultura de células em suspensão. O tipo de micropropagação a ser utilizada depende da espécie trabalhada. A embriogênese somática mostrou ser uma opção eficaz em espécies lenhosas em relação as outras técnicas de micropropagação, como em espécie de café (Aguilar *et al.*, 2022), e como em espécies de Linden de Amur, árvore nativa do extremo Oriente da Rússia, China e Coreia (Kang *et al.*, 2021).

Já em espécies herbáceas, os estudos utilizando a embriogênese somática também são testados, como por exemplo no cultivo de calos embriogênicos utilizado para transformação de genética de cereais como da espécie de aveia de nome científico de *Avena sativa L.* (Caren Regina Cavichioli Lamb *et al.*, 2002) em que os embriões maduros permitiram a indução de calos embriogênicos, os quais proporcionaram alta taxa de multiplicação e regeneração de grandes quantidades de plantas dessa espécie *in vitro*. Na maioria das espécies lenhosas e herbáceas, a tecnologia da cultura de tecidos apresenta diversas barreiras, como as condições para a indução dos calos e embriões, o genótipo, a quantidade de brotos e raízes disponíveis, a quantidade de embriões induzida e sua maturação, fatores externos como nutrientes e hormônios de crescimento, além da regeneração e do processo de aclimatização e seu desenvolvimento *ex vitro*. Em eucalipto, por exemplo, minerais e nutrientes como o nitrogênio, cálcio e boro possuem funções essenciais no desenvolvimento embriogênico, além disso, são associados com vários processos fisiológicos como a ativação enzimática e reações com reguladores de crescimento (Abiri *et al.*, 2020).

A embriogênese somática é uma técnica de propagação clonal *in vitro* muito utilizada em diferentes espécies. Em maracujá (*Passiflora sp.*), espécie que pode ser herbácea ou lenhosa dependendo da sua variedade. Estudos realizados *Passiflora cincinnata* mostraram que o uso de hormônio vegetal permitiu a regeneração *in vitro* dessa espécie através da embriogênese somática (Mohammadi *et al.*, 2023). Outras variedades de maracujá resultaram na indução de embriões somáticos, como de: *Passiflora miniata*, *Passiflora alata* e *Passiflora crenata* (De Carvalho *et al.*, 2019).

O emprego de hormônios vegetais em metodologias de cultura de tecidos cresce exponencialmente ao longo dos últimos anos, principalmente o etileno, único fitormônio que se apresenta em forma gasosa, além de fazer parte de diversos processos fisiológicos. Apesar dessa característica, em algumas espécies o etileno mostrou ser prejudicial na organogênese e na regeneração dos tecidos (Saha; Dutta Gupta, 2018) como na formação de brotos adventícios (Chae; Kim; Park, 2012). Como na *Epidendrum denticulatum*, uma espécie de orquídea nativa do Brasil, foi testado a influência do etileno na organogênese direta e os reguladores desse fitormônio no desenvolvimento e crescimento da planta. Os resultados nessa espécie demonstraram que ao adicionar no meio de cultivo um composto chamado CEPA, o qual promove a síntese de etileno, promoveu uma maior sobrevivência das plantas que foram expostas à luminosidade, já as que não foram expostas à luz, houve menor sobrevivência (Juras *et al.*, 2020), ou seja, esta espécie de orquídea é altamente sensível ao etileno. Outro suplemento exógeno que vem sendo utilizado para a micropropagação é o óxido nítrico, é uma molécula sinalizadora de processos fisiológicos vegetais. Participa da regulação de atividades proteicas e expressão gênica, auxiliando na resposta de estresses abióticos e bióticos, desenvolvimento da planta e sua senescência, além de ser capaz de captar melhor os micros e macronutrientes presentes no solo (Simontacchi *et al.*, 2015).

Em consideração a relevância da metodologia de micropropagação através da embriogênese somática testada em diferentes espécies e a influência do etileno e do óxido nítrico nessa técnica, o presente trabalho tem como objetivo a indução de calos, embriões somáticos e raízes adventícias da espécie *Bowdichia virgilioides* e *Vanilla phaeantha*, espécie lenhosa e herbácea, respectivamente. Inicialmente o etileno e o óxido nítrico foram testados na espécie lenhosa. Devido aos resultados positivos apenas do etileno, a pesquisa prosseguiu utilizando apenas esse fitormônio para a espécie herbácea.

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 *Bowdichia virgilioides* Kunth

A sucupira preta é uma espécie de lenhosas da família Fabaceae e gênero *Bowdichia*, é classificada como uma espécie heliófila, ou seja, não germina e nem desenvolve em temperaturas baixas. Sua altura pode chegar a 15 metros e seu diâmetro em 60 centímetros na idade adulta. Seu tronco pode ser reto ou contorcido, com ramificação dicotômica. A época de floração dessa espécie é entre junho e agosto, em algumas regiões do Brasil pode variar até setembro, as flores possuem coloração violeta ou azul escuro. A dispersão das suas sementes é predominantemente anemocórica, ou seja, é dispersa pelo vento. A *Bowdichia virgilioides* é uma planta que apresenta tolerância a solos secos, de textura arenosa e no Nordeste do Brasil há ocorrência em área de tabuleiro, que seria de relevo plano a ondulado.

A durabilidade da madeira da sucupira preta é considerada de alta resistência, em laboratório apresentou resistência em contato com organismos xilófagos, organismos que se alimentam de madeira. Além disso, a lenha provinda dessa espécie é de alta qualidade, apresenta utilidade versátil como para móveis de luxo, acabamentos internos, construções externas como de pontes, trabalhos de marcenaria e de carpintaria. Possui propriedades medicinais e terapêuticas no tratamento de sífilis, reumatismo, diabetes e afecções cutâneas. Tem utilidade na área de paisagismo por ser ornamental já que em épocas de floração esta árvore fica predominantemente da coloração das flores; também é utilizada na arborização por fazer uma grande área de sombra; é recomendada na recuperação de áreas degradadas (Ramalho, 2014).

A produção de mudas pode ser feita em sementeiras, após 2 a 4 semanas é feito a repicagem para compartimentos de polietileno ou polipropileno. É possível observar o aparecimento da planta entre 10 e 25 dias após semeadura, as mudas atingem porte para o plantio em solo em 5 meses.

A sucupira preta possui características fisiológicas envolvendo o endosperma, podendo comprometer a germinação, o desenvolvimento da planta e conseqüentemente entraves na produção das mudas. Como por exemplo, a dormência, que pode subestimar a viabilidade dessas sementes. Essa propriedade é recorrente em algumas espécies como uma forma de sobrevivência, permitindo a germinação em três condições: pelas características morfológicas

da semente, fenômeno nomeado polimorfismo; por condições ambientais favoráveis; e dormência embrionária, superada pela incidência de luz (Pereira; Al, 2000). A dormência da sucupira preta é classificada como dormência tegumentar ou exógena, sua permeabilização é importante para seu rompimento e desenvolvimento da planta. Pode ser caracterizada por quatro fatores: pela impermeabilidade da água no tegumento, acarretando dificuldades na conservação de germoplasma de espécies pertencentes à essa família, chamada de Fabaceae e em outras espécies como da família Leguminosae (Smiderle *et al.*, 2003), Cannaceae, Convolvulaceae, Malvaceae e Chenopodiaceae. O segundo fator é a resistência dos tecidos envolta do embrião, impedindo a penetração e conseqüentemente não é possível a germinação; em terceiro é a limitação nas trocas gasosas, como de oxigênio, entre os tecidos que estão em localizados envolta do embrião, impedindo a germinação; por último, em algumas espécies, existem inibidores químicos localizados no tegumento e no embrião que impedem a germinação (Pereira; Al, 2000). Este último fator é o que ocorre no caso das sementes de sucupira preta. Por isso, é necessário um tratamento pré-germinativo através da escarificação química com ácido sulfúrico. Portanto, o cultivo em *in vitro* auxilia na quebra da dormência, assim como na propagação da organogênese direta ou indireta.

2.2 *Vanilla phaeantha*

A *Vanilla* é uma planta que pertence à família Orchidaceae composta por 121 espécies, sendo que 40 delas foram identificadas no Brasil (Medeiros *et al.*, 2024). Algumas dessas espécies sofreram risco de extinção, com isso metodologias de micropropagação e conservação *in vitro* dessas espécies começaram a ser desenvolvidas (Divakaran, 2009). As espécies da *Vanilla* produzem um composto químico conhecido como vanilina, muito conhecida e utilizada nas indústrias de alimentos, farmacêuticos, cosméticos e terapêuticos e pelos seus aromas e sabores (Bramel; Frey, 2021; Liaqat *et al.*, 2023). A quantidade de vanilina produzida varia de espécie para espécie. A *Vanilla phaeantha*, nativa do Brasil encontrada na Mata Atlântica (Oliveira *et al.*, 2022), é considerada uma espécie aromática caracterizada por produzir elevadas concentrações desse composto de interesse comercial (Li *et al.*, 2020). Essa espécie possui potencial econômico, focado em consumidores de alimentos refinados, por ter característica de sabores diferentes ao paladar. Conseqüentemente, a produção da vanilina pode trazer desenvolvimento econômico para a população local das áreas em que ela é cultivada (Franco *et al.*, 2024). Os métodos de propagação convencionais dessa espécie é de baixa eficácia e de custo alto, além de levar bastante tempo para que esse

processo seja bem-sucedido (Gantait and Kundu, 2017). Dessa forma, a tentativa de implementação da técnica de micropropagação é considerável em cenários como este, em que a demanda econômica está em alta para este composto químico encontrado na *Vanilla spp*, e em concentrações maiores na *Vanilla phaeantha*.

2.3 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos consiste no cultivo de plantas e/ou explantes *in vitro* em condições adequadas de assepsia, nutrição, luz, temperatura, oxigênio e gás carbônico em meio nutritivo a fim de maximizar e desvendar as etapas para o desenvolvimento da espécie estudada (Carvalho *et al.*, 2006), proporcionando ferramentas biotecnológicas como a conservação e melhoramento genético, a micropropagação vegetal, regeneração de plantas livres de patógenos, e até mesmo a propagação clonal de mudas em larga escala (Solange, 2002). Existem diferentes vias de regeneração de plantas. A micropropagação é uma delas, tem ampla utilidade comercial e industrial em virtude da sua taxa de multiplicação ser alta, proporcionar melhor entendimento das rotas metabólicas e morfológicas necessárias para a formação da planta e regeneração ocorre diretamente de um tecido organizado, promovendo tempo menor para a finalização dos estádios de desenvolvimento. A outra via de regeneração é a embriogênese somática direta ou indireta na qual é feita a indução da formação de embriões através de células somáticas a partir de um explante, assim como a organogênese. Na embriogênese somática indireta, a proliferação de calos é feita e a partir destes que há a indução dos embriões somáticos. Já na embriogênese somática direta, os calos não são necessários, é feita a indução dos embriões apenas, esta é menos comum que a mencionada anteriormente (Ribeiro, 2006). Para essas duas vias de regeneração é necessário a aclimação das plântulas formadas a partir dos embriões somáticos, sejam eles provindos de calos ou diretamente do explante, por meio da sua transferência ao ambiente externo com variações de luminosidade e temperatura. Após esta etapa são colocadas em casa de vegetação.

2.4 Embriogênese somática (ES)

A exploração comercial da sucupira preta envolve diferentes setores, como medicinal e terapêutica, ornamental, móveis e acabamentos internos, construções civis, como citado anteriormente. Porém, devido a sua viabilidade reduzida, pesquisas envolvendo o fitomelhoramento a partir da propagação por sistemas que sejam eficientes até a formação de

uma planta adulta completa, aumentando sua produção e produtividade são de interesse biotecnológico e agrícola. A embriogênese somática é uma das estratégias que possui eficiência na conservação de espécies através da criação de banco de germoplasma, preservando características genéticas das espécies exóticas ou nativas. É um método de micropropagação vegetativa assexual (não zigótica) em que os embriões são originários do explante e não apresentam dependência do tecido materno para seu desenvolvimento, é uma ferramenta que permite o avanço da pesquisa sobre células totipotentes em plantas (Vasil, 2008), assim como na produção de semente sintética, na hibridização somática, variação somaclonal, propagação clonal e na regeneração de células transformadas geneticamente, auxiliando nos estudos morfológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem nesse processo (Carvalho *et al.*, 2006). Apesar da observação feita por VASIL, em 2008, outro estudo mais recente em *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), durante a germinação e maturação dos embriões somáticos, através de análises histológicas, mostrou que há uma conexão vascular entre os embriões formados a partir de calos com o tecido materno (Andrés Gatica-Arias *et al.*, 2019). Os embriões desenvolvem em etapas que são reguladas por fatores intracelulares da planta como fitormônios e fatores genéticos como a transcrição (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2014).

Esse método de micropropagação *in vitro* apresenta vantagens como: maior taxa de multiplicação em relação a outros métodos; escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido; plantio direto da muda; menor custo de produção; a planta formada ser geneticamente igual a planta-mãe, por suas células somáticas desenvolverem em estruturas que se assemelham a embriões zigóticos, sem a necessidade da fusão de gametas; além de possibilitar a transferência de genes (Carvalho *et al.*, 2006). Segundo Zimmerman (1993), os explantes radiculares são adequados para a indução da embriogênese somática. Múltiplos eventos afetam o ciclo da embriogênese somática, como o genótipo, tipo de explante e os reguladores de crescimento utilizados na cultura dos tecidos. Assim como as condições ambientais e os estresses bióticos e abióticos, controlados pelos hormônios vegetais também afetam a indução dos embriões somáticos, por isso estudos morfológicos, anatômicos, bioquímicos e histológicos podem contribuir para o entendimento dessa rota de regeneração (Andrés Gatica-Arias *et al.*, 2019). Em um estudo envolvendo a quantificação do total de açúcares, açúcares reduzidos, amido e sacarose em calos embriogênicos e não embriogênicos de *Medicago arborea* L. em diferentes tipos de explantes, mostrou que o amido é rapidamente metabolizado pelos tecidos embriogênicos com o propósito de promover altas quantidades de energia para a atividade metabólica e mitótica, permitindo a formação de calos através dessas

duas vias de regeneração. Além disso, o componente de maior abundância nos calos formados foi o açúcar, tanto no processo embriogênico, quanto no não embriogênico (Martin *et al.*, 2000), sendo assim, a maior fonte de energia é proveniente do amido.

Outra forma possível de induzir o aumento da taxa da embriogênese somática é o fator de transcrição, como no estudo em *Arabidopsis*, onde foi feita a expressão ectópica de alguns fatores de transcrição como o gene LEC, BBM, WUS/WOS ou o gene AGL15 que podem aumentar eficientemente a indução dos embriões somáticos sem adição de hormônios (Tian *et al.*, 2020) em condições controladas. Os estresses abióticos também podem aumentar ou reduzir metilação do DNA e na cromatina, sendo assim nota-se que as mudanças epigenéticas induzidas pode ser estáveis ou não, podendo se manifestar nas próximas gerações (Akhter *et al.*, 2021). A metilação do DNA na calogênese, por exemplo, causa diminuição na formação de calos na embriogênese. O uso de inibidores de metilação promoveram indução da embriogênese somática, mostrando a ocorrência de mudanças importantes na reprogramação epigenética na transcrição na indução de calos, provando que reguladores de cromatina tem envolvimento direto com a reprogramação celular e a formação de calos na embriogênese somática (Osorio-montalvo; Sáenz-carbonell; De-la-peña, 2018).

2.5 Calogênese

Assim como a embriogênese somática, a calogênese também é uma das metodologias mais utilizadas para o cultivo *in vitro*, em que a indução de calos através da diferenciação do tecido vegetal resulta na produção de biomassa a qual contém metabólitos secundários, auxiliando o estudo da embriogênese somática e formação de calos com alto potencial de divisão celular (Corpes; Santos, 2021). O sucesso da formação dos calos por esse método com a suplementação de hormônios de crescimento em meio de cultivo asséptico já foi relatado em diversas espécies. Tais como em uma pesquisa envolvendo a indução de calos em *Dipteryx alata* Vog., popularmente conhecida como baru, pertencente à família Fabaceae, mostrou que o uso de dois fitormônios, ANA e BAP, foram eficientes na formação de calos em meio MS (Targa *et al.*, 2021), evidenciando que o uso de determinados reguladores de crescimento é capaz de induzir a calogênese.

A espécie *Lallementia royleana* L., a qual possui propriedades terapêuticas, foi utilizada para a otimização da cultura de tecidos por meio da regeneração indireta, induzindo a formação de calos. Neste estudo, os melhores resultados obtidos utilizando a combinação de dois tratamentos, benzil aminopurina (BAP) e ácido indolacético (IAA), foi avaliado a

capacidade calogenética de 100%, sendo que os segmentos nodais foram as fontes de explantes que obtiveram maior sucesso comparado com o segmento internodal (Mahmood *et al.*, 2021). Em questão do parâmetro luminosidade ou a ausência dela, não há relatos suficientes em relação à sua influência no desenvolvimento fisiológico ou morfológico dos calos, porém isso pode variar de espécie para espécie. Como em outro estudo com a espécie *Senna alata* (L.) Robx., pertencente à família Fabaceae, foi analisado a influência de três tipos de iluminação (luz branca, colorida e escuro) em diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos. Nos dois explantes utilizados (nodal e segmentos foliares) foi obtido a maior porcentagem de calos com a luz branca e colorida do que no escuro (Corredor Lara *et al.*, 2022). Além disso, foi observado que a combinação de 2,4-D com duas citocininas, BAP e TDZ, separadamente, na concentração de 1.0 mg L^{-1} , proporcionou a formação de mais calos do que observado no controle, o qual não houve formação de calo algum. Porém, nos experimentos suplementados com maiores concentrações das citocininas, houve um decréscimo de calos formados.

2.6 Indutores da organogênese

Os reguladores de crescimento vegetal, os fitormônios, afetam diretamente no desenvolvimento celular por interferirem na fisiologia das plantas, como no seu desenvolvimento, produção de metabólitos secundários, crescimento, qualidade e saúde da planta. Especificamente, as auxinas e citocinas são fundamentais para a regeneração da planta.

O etileno é um hormônio que no meio de cultura *in vitro* e fechado ocorre o acúmulo desse gás na atmosfera (Biddington, 1992). O etileno acumulado na atmosfera do meio de cultura depende da taxa da troca do gás no interior e no exterior do experimento, e sua produção pelos tecidos vegetais. Esse hormônio tem efeito direto no desenvolvimento fisiológico da planta, algumas espécies são sensíveis ao etileno, inibindo ou sinalizando-o. Por isso, diversos estudos foram feitos para o melhor entendimento da influência desse hormônio nos processos fisiológicos das plantas. Um precursor do etileno, o ethepon, promove o aumento da biossíntese do etileno pela ACC oxidase que degrada o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Lougheed; Franklin, 1970), permitindo respostas semelhantes aos tratamentos feitos com etileno exógeno. A presença de etileno nas plantas e nas frutas causa seu amadurecimento e senescência, por isso é um composto comercialmente estudado. A s-adenosilmetionina (SAM) e a ACC são responsáveis pela conversão da metionina em etileno. Um exemplo dos efeitos positivos do etileno nas plantas foi o estudo

realizado com arroz através do método de knockdown no gene SAM, acarretando uma menor síntese de SAM e conseqüentemente a redução da produção de etileno, o que causou um tempo maior para germinação dessa espécie, além de reduzir a fertilidade e retardar a florescência (Li. W, *et al.* 2011), ou seja, esse hormônio vegetal tem influência direta no desenvolvimento de determinadas espécies.

Outro suplemento vegetal que possui propriedades importantes no desenvolvimento das plantas é o óxido nítrico, molécula sinalizadora de diversos processos fisiológicos, como germinação, crescimento radicular, regula respostas a estresses ambientais, expressão gênica, atividades de proteínas, além de apresentar características antioxidantes, prevenindo a reatividade do oxigênio em determinadas espécies e conseqüentemente os danos oxidativos nas plantas (Simontacchi *et al.*, 2015). Plantas em contato com compostos doadores de óxido nítrico, mostrou proteger e melhorar contra o estresse oxidativo em plantas expostas a metais pesados (Beligni MV, Lamattina L. 2001). O óxido nítrico é uma molécula sinalizadora de radicais livres que é produzida por rotas metabólicas oxidativas e redutoras (Gupta *et al.*, 2013). As rotas redutoras são ativadas em condições de hipoxia, ou seja, quando há redução do nível de oxigênio abaixo do nível considerado ótimo, geralmente ocorre através do estresse em solos com excesso de água, por exemplo. Esse processo é feito através da produção do óxido nítrico pela mitocôndria da enzima citocromo oxidase e outras proteínas relacionadas com o transporte de oxigênio (Gupta *et al.*, 2011).

Wany (2017) investigou a indução do etileno na formação de aerênquima nas raízes de trigo, sendo necessário a indução de hipoxia do óxido nítrico, sendo assim os dois hormônios mostram ter papéis interligados para a formação desse tecido importante na respiração das plantas que permite a troca de gases entre as células e o meio externo. Em adição, o óxido nítrico induzido pela hipoxia é importante na indução dos genes que codificam a ACC sintase e a ACC oxidase, mencionadas anteriormente, as quais são necessárias na biossíntese do etileno, assim como os genes ERF1 e PDF13 referentes a resposta da produção de etileno (Wany *et al.*, 2017). Essa molécula é crucial na sinalização das plantas, implica nas rotas que envolvem auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, ácido jasmônico, brassinoesteróides e outros hormônios vegetais importantes no controle do metabolismo, crescimento e desenvolvimento das plantas em respostas a estresses bióticos e abióticos (Nawaz *et al.*, 2017). Com isso, é importante o reconhecimento da regulação do óxido nítrico em conjunto com outros fitormônios nos processos fisiológicos do início da germinação até a senescência da planta.

2.7 Exposição de espécies lenhosas e herbáceas ao etileno

A injúria de explantes radiculares adventícios desencadeia respostas por meio de vias de sinalização aumentando a produção de ácido jasmônico e etileno (Druege *et al.*, 2016). Como na espécie *Arabidopsis*, a indução dos genes WIND, gene responsável pela indução da desdiferenciação da injúria causada no explante, codificam fatores que promovem respostas que induzem a formação de calo em *Brassica napus*, em tomateiro e na espécie *Nicotiana tabacum* (Iwase *et al.*, 2011). Através desse resultado, entende-se que tanto o ácido jasmônico e o etileno atuam diretamente nos genes WIND, reativando a proliferação celular da planta (Abarca, 2021). Porém em outras espécies, observou-se que o uso do AgNO₃, um bloqueador dos receptores de etileno, melhorou significativamente a qualidade da micropropagação (Cardoso, 2019) e acelerando a floração de *Manihot esculenta*, (Hyde *et al.*, 2020) uma espécie semilenhosa, ou seja, espécie que possui características intermediárias entre plantas herbáceas e lenhosas. Assim como no estudo com a espécie herbácea híbrida de morango de nome científico *Fragaria x ananassa*, em que nanopartículas de prata ocasionaram a redução do acúmulo de etileno durante a multiplicação de brotações e formação de estruturas radiculares, resultando em uma melhor qualidade das plântulas e de estolões, estruturas vegetativas responsáveis por se micropropagar, presente em espécies como do morangueiro (Thanh *et al.*, 2021).

Em um estudo feito com *Epidendrum denticulatum* da família Orchidaceae, uma planta herbácea, foi analisada o efeito de reguladores de etileno na organogênese direta. Os tratamentos com concentrações menores de etileno mostraram ter uma maior porcentagem de sobrevivência e melhor desenvolvimento das plantas. Assim como em tratamentos na presença de iluminação em que o estimulador de síntese de etileno ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) foi utilizado, onde os níveis de etileno também foram baixos, houve assim uma maior porcentagem de sobrevivência das plantas. Já nos tratamentos em que não houve iluminação, a adição de CEPA inibiu drasticamente a sobrevivência das plantas, em que a concentração de etileno era maior (Juras *et al.*, 2020). Esse estudo mostrou que a espécie *Epidendrum denticulatum* possui alta sensibilidade ao etileno, inibindo o crescimento e a sobrevivência das plantas em altas concentrações. Com isso, o presente estudo confirma que plantas herbáceas são, de fato, sensíveis ao regulador de crescimento etileno, prejudicando a organogênese direta nessa espécie. Já para espécies lenhosas, como em *Rosa hybrida*, o etileno promoveu a biossíntese de auxina no câmbio vascular, região importante na micropropagação de lenhosas por serem utilizadas para induzir a formação de calos (Yu *et al.*, 2023). Com isso, Yu (2023)

conclui que o etileno promove o funcionamento do câmbio vascular através da ativação da biossíntese de auxina naquela região, mantendo a sua atividade fisiológica.

3.1 INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SUCUPIRA PRETA ATRAVÉS DO USO DO HORMÔNIO VEGETAL ETILENO E DA MOLÉCULA SINALIZADORA ÓXIDO NÍTRICO

Artigo submetido na revista 3BIOTECH

Indução de embriões somáticos de Sucupira preta através do uso do hormônio vegetal etileno e da molécula sinalizadora óxido nítrico.

Taciany Feitor Carvalho¹ (0009-0002-0577-8738); Giovana Esteves² (0000-0001-5620-4211); Antonio Rodrigues da Cunha Neto^{1*} (0000-0001-7107-2755); Thaina Menegheti Nehme¹ (0000-0001-7993-0144); Artur Gomes Barros¹ (0000-0002-0456-6867); Arlinda de Jesus Rodrigues Resende¹ (0000-0001-9287-7376); Breno Régis Santos¹ (0000-0002-3980-9013)

1 Instituto de Ciências da Natureza; Universidade Federal de Alfenas; Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

2 Instituto de Ciências Naturais; Universidade Federal de Lavras; Lavras, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente: Antonio Rodrigues da Cunha Neto, Instituto de Ciências da Natureza; Universidade Federal de Alfenas; Alfenas, Minas Gerais, Brasil; e-mail: antoniorodrigues.biologia@gmail.com

Resumo

O presente trabalho está relacionado com a indução da embriogênese somática *in vitro*, a qual oferece produção de produtos biotecnológicos através da transformação genética e síntese de compostos químicos. Teve como objetivo a indução da organogênese, a qual implica na propagação e na cultura de tecidos, por meio da formação de embriões somáticos e calos através de explantes da espécie lenhosa *Bowdichia virgilioides*, conhecida como sucupira preta, utilizando dois tratamentos: etileno (0, 10 e 20 ppm) e óxido nítrico (0, 10 e 40 μM) em diferentes concentrações. Esses dois hormônios vegetais demonstraram ser proeminentes na indução da embriogênese somática em outras espécies, assim como possuem papel significativo em rotas metabólicas das plantas. A espécie escolhida para a pesquisa apresenta diversas aplicações como em programas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas; fabricação de móveis internos e até mesmo em construções civis; aplicação em tratamentos de doenças e terapêuticos. Por possuir um desafio para sua conservação, foi realizado o desenvolvimento desta pesquisa a fim de maximizar sua propagação, preservação do germoplasma e avanços no melhoramento genético da espécie. Os experimentos foram analisados a cada sete dias por oitenta e quatro dias, onde foi avaliado a presença e a ausência de embriões, calos e novas raízes, e seus respectivos desenvolvimentos ao longo do período de análise. O teste utilizado foi o de regressão e o teste de Skott-Knott usado para comparar as médias usando o programa estatístico SISVAR. Em paralelo foi feita uma análise *in silico* utilizando o banco de dados STRING com a espécie *Arabidopsis thaliana*, assim três genes FEZ, WOX5 e NOA1 foram selecionados para a investigação da rede de interatividade entre os tratamentos e seus respectivos genes. Após todas as análises citadas, foi concluído que o Ethrel, molécula doadora de etileno, na maior concentração testada, de 20 ppm, demonstrou ter melhor resultado na formação de embriões somáticos e calos, além de possuir interações associadas ao gene FEZ, participando do crescimento radicular dos explantes. Já o GSNO, doador da molécula de óxido nítrico, demonstrou ser prejudicial na formação de embriões somáticos independente da concentração testada.

Palavras-chave: Embriogênese somática; Calogênese; Fabaceae; *Bowdichia virgilioides*

Introdução

A embriogênese somática é um processo que ocorre em células ou tecidos vegetais, no qual passam por uma série de estágios de desenvolvimento, culminando na formação de uma planta completa. Essa transformação envolve a desdiferenciação das células somáticas em células meristemáticas embrionárias, as quais têm a capacidade de regular os processos metabólicos por meio de mudanças na rota metabólica do tecido vegetal e da aplicação controlada de substâncias químicas em concentrações baixas (SILVA *et al.*, 2023).

Existem duas abordagens principais para a realização desse processo: a forma direta, na qual a origem é a partir do próprio explante, e a forma indireta, na qual o embrião se desenvolve a partir de células de calo. A pesquisa relacionada à embriogênese somática *in vitro* tem atraído considerável atenção, dada as oportunidades que oferece na produção de produtos biotecnológicos de alto valor, incluindo a transformação genética e a síntese de compostos químicos. Esta técnica é eficaz no desenvolvimento de embriões a partir de explantes, uma vez que o processo envolve a formação de um eixo bipolar, assemelhando-se ao desenvolvimento de uma semente. O papel de substâncias como o etileno e o óxido nítrico no processo de embriogênese somática tem sido amplamente reconhecido, embora a concentração ideal para maximizar o desenvolvimento destes estágios ainda permaneça desconhecida (SILVA *et al.*, 2023).

O etileno, um hormônio vegetal, demonstrou ser um promotor chave da embriogênese somática e calogênese em diferentes espécies. Na cultura do café, o etileno estimulou a intumescência, um indicativo do progresso da embriogênese. Em diferentes culturas, o etileno também desempenha um papel importante, promovendo resistência a fatores bióticos e abióticos, além de facilitar a quebra da dormência, crescimento, desdiferenciação e amadurecimento, todos essenciais para as técnicas *in vitro* (BHATLA & LAL, 2023). Além disso, o etileno demonstrou vantagens em vários outros processos fisiológicos, como germinação, crescimento da parte aérea, fotossíntese, respiração, transpiração, iniciação de raízes, formação do xilema e senescência das plantas (SILVA *et al.*, 2023).

Outra substância de destaque é o óxido nítrico, que desempenha um papel significativo em rotas metabólicas, estimulando a germinação de sementes, a resistência contra estresses bióticos e abióticos, e atuando como agente cicatrizante. A sua síntese pode ocorrer por meio de reações de oxidação em rotas que envolvem hidroxilamina, poliaminas ou L-arginina, e pode ser armazenado nas plantas devido a interações específicas com outras moléculas (SILVA *et al.*, 2023).

A espécie arbórea *Bowdichia virgilioides* Kunth, pertencente à família Fabaceae é conhecida como Sucupira preta, nativa do Brasil e possui madeira de alta durabilidade amplamente utilizada na fabricação de móveis, acabamentos internos, objetos de madeira, construção civil e em aplicações em práticas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas. No entanto, a dormência das sementes representa um desafio para sua conservação e produção. Devido a este fator, seu cultivo *in vitro* e uso da técnica da embriogênese somática podem ser alternativas biotecnológicas para solução deste problema. Outras espécies arbóreas apresentam características fisiológicas similares à Sucupira preta, como a *Drimys brasiliensis* Miers, conhecida popularmente como cataia, a qual possui difícil propagação através das sementes devido a dormência por imaturidade embrionária (SILVA *et al.*, 2023). A espécie arbórea *Cassia grandis* L. f., da mesma família que a Sucupira preta é outro exemplo que apresenta as mesmas dificuldades de propagação (NASCIMENTO *et al.*, 2021), assim como a *Senna spectabilis* (BARBOSA *et al.*, 2022) e diversas outras.

Assim, objetivou-se aplicar etileno e óxido nítrico *in vitro*, em explantes de *Bowdichia virgilioides*, para avaliar a formação de embriões somáticos, calos e formação de raízes e analisar de forma *in silico* as redes de interação formadas a partir desta exposição. Desta forma, o desenvolvimento deste protocolo, sendo ele fundamental para melhorar a propagação da espécie, conservação do germoplasma e avanços em melhoramento genético, com implicações tanto comerciais quanto biotecnológicas.

Material e métodos

Experimento 1 – Cultivo in vitro de Bowdichia virgilioides exposta ao etileno e óxido nítrico

Para o experimento com etileno, utilizou-se o Ethrel, obtido comercialmente (2-chloroethylphosphonic acid = 24% m/v; outros ingredientes = 86,5% m/v), como fonte doadora. Para o outro experimento, do óxido nítrico (NO), empregou-se a S-nitrosoglutationa (GSNO) como fonte doadora. A síntese de GSNO foi realizada a partir de glutatona reduzida (GSH) e nitrito de sódio (NaNO₂), em proporção equimolar, mantida no escuro por 30 minutos, seguida da adição de hidróxido de sódio (NaOH).

Foram utilizados explantes de raízes de *Bowdichia virgilioides* provenientes de plantas com aproximadamente um ano de idade as quais as sementes foram submetidas à escarificação com ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos e germinadas *in vitro*. As plantas *in vitro* foram cultivadas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 ± 1 °C, e densidade de fluxo fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

Para o teste *in vitro*, foram utilizados quatro explantes radiculares (1 cm de comprimento) e inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado para pH 5,8–6,0. Após a solidificação do meio, adicionou-se os tratamentos com GSNO (10 e 40 µM) e Ethrel (10 e 20 ppm). As culturas foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. a 30 °C, no escuro. O controle foi feito com meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado para pH 5,8–6,0.

Os parâmetros de embriogênese somática, calogênese e formação de raízes foram avaliados semanalmente durante 84 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento. A presença/ausência de embriões, calos e raízes, bem como seu desenvolvimento, foram analisados por regressão e teste de comparação de médias de Skott-Knott, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2019).

Experimento 2 – metodologia de análise in silico

A análise de redes de interação foi realizada utilizando o banco de dados STRING (SZKLARCZYK *et al.*, 2023), selecionando a opção "nome da proteína" como parâmetro de busca. Devido à escassez de informações genômicas para *Bowdichia virgilioides*, optou-se por utilizar *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo, considerando seu amplamente estabelecido banco de dados genéticos.

Foram selecionados inicialmente dois genes relacionados à via de sinalização do etileno: FEZ e WOX5 (ZHENG *et al.*, 2013). Adicionalmente, incluiu-se o gene NOA1, associado à produção de óxido nítrico (VERMA *et al.*, 2020). Esses genes serviram como pontos de partida para a construção da rede de interação proteica.

A rede de interação foi gerada considerando um score mínimo de confiança de 0.400. A partir dessa rede inicial, outros genes de interesse (ADC2, SPDSYN1 e SPMS) foram incluídos para análise de suas interações. Estas interações possibilitaram identificar possíveis conexões entre as proteínas-alvo e eventos de cascata de sinalização desencadeados pela aplicação exógena de etileno e óxido nítrico. Essa abordagem permitiu explorar mecanismos moleculares associados à embriogênese somática, formação de raízes e calogênese em resposta a esses reguladores.

Resultados e discussão

Ao expor os explantes de *Bowdichia virgilioides* às substâncias doadoras de etileno e óxido nítrico, foi observado que, em relação ao controle, o qual teve a formação total de 33% de embriões somáticos, o etileno na concentração de 10 ppm teve comportamento semelhante e não diferiu na porcentagem de embriões somáticos formados. O etileno na concentração de 20 ppm foi superior aos demais tratamentos, formando 52% de embriões somáticos. Em relação ao óxido nítrico, este teve um desempenho inferior ao controle. A menor concentração testada teve, ao final da avaliação, 23% de embriões somáticos, e a maior concentração testada não permitiu a formação desta estrutura (Figura 1 A).

Ao analisar o número médio de embriões somáticos formados por explantes, nota-se que o etileno a 20 ppm diferiu dos demais tratamentos, apresentando o maior número de embriões somáticos formados. Já na concentração de 10 ppm não diferiu do controle, sendo ambos superiores à molécula doadora de óxido nítrico, independentemente da concentração (Figura 1 B). Com isso, observa-se que o etileno na maior concentração testada é um indutor proeminente na organogênese e na formação de embriões somáticos de espécies arbóreas caracterizadas com a complicação fisiológica que é a dormência, implicando na propagação da espécie.

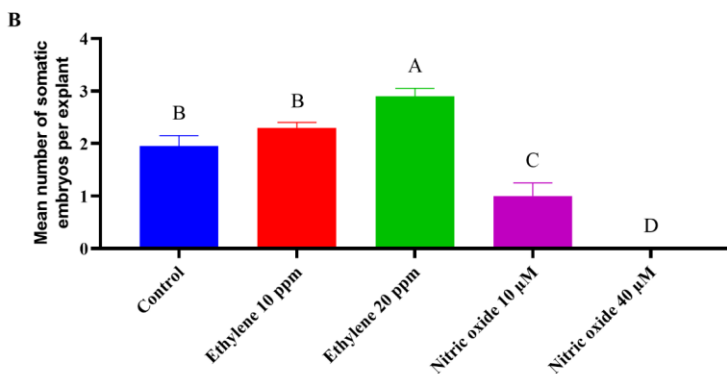
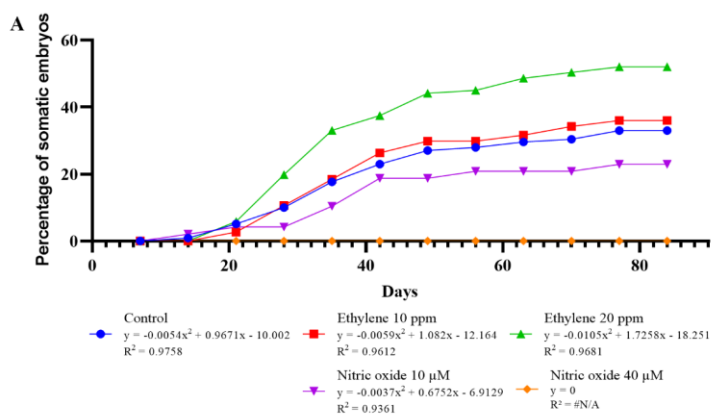


Figura 1. (A) Porcentagem de embriões somáticos e (B) média de embriões somáticos por explantes de *Bowdichia virgilioides* expostas ao etileno e óxido nítrico. Letras iguais não diferem estatisticamente para o teste de Skott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

O etileno é um regulador chave na desdiferenciação celular e na reorganização metabólica durante a embriogênese somática. O etileno atua na promoção da proliferação celular e na formação de estruturas embrionárias, especialmente em espécies com dormência, como a *Bowdichia virgilioides* (JIMÉNEZ, 2005). A concentração de 20 ppm pode ter otimizado a sinalização hormonal, estimulando vias metabólicas essenciais para a embriogênese, como a expressão de genes e à formação de eixos embrionários (NEVES *et al.*, 2021).

Por outro lado, o óxido nítrico apresentou um desempenho inferior ao controle, com a concentração mais alta inibindo completamente a formação de embriões somáticos. Uma possível explicação é que altas concentrações de óxido nítrico desencadeiam respostas antioxidantes excessivas, interferindo na divisão celular e na diferenciação embrionária (LOPES-OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Ao contabilizar a porcentagem de calos de *Bowdichia virgilioides*, foi possível constatar que o etileno possibilitou a formação desta estrutura em 14% e 29% dos explantes expostos a 10 ppm e 20 ppm respectivamente, ao contrário do óxido nítrico, que, independentemente da concentração, não proporcionou a formação de calos, sendo um indutor prejudicial na indução da calogênese (Figura 2).

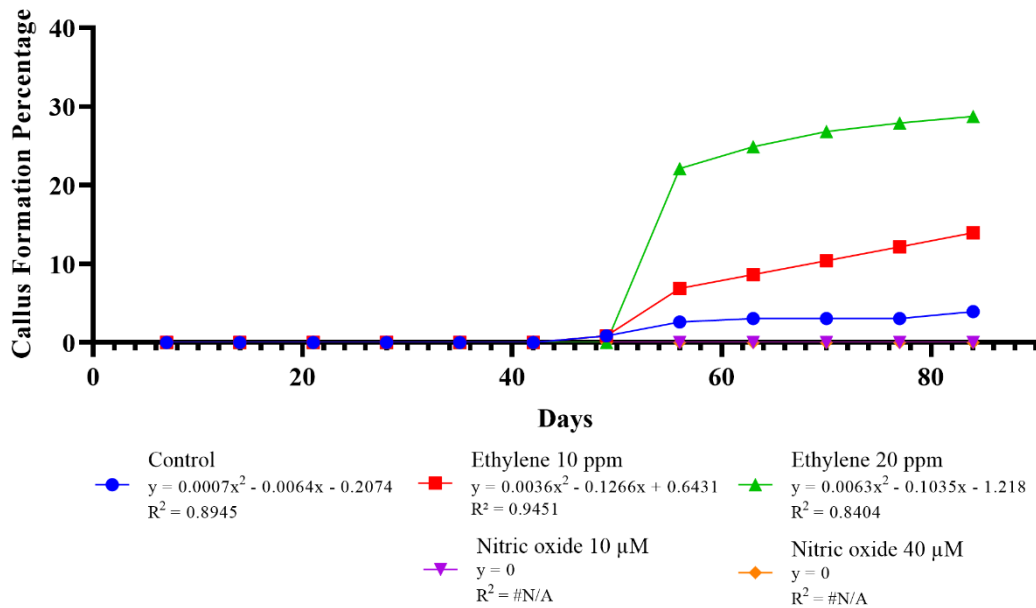


Figura 2. Porcentagem de calos de explantes de *Bowdichia virgilioides* expostas ao etileno e oxido nítrico.

A maior porcentagem de calos em 20 ppm comparado a 10 ppm sugere que o etileno, em concentrações mais altas, estimula mais eficientemente a calogênese, possivelmente por induzir expressão de genes relacionados à divisão celular ou suprimir vias que inibem a formação de calos (NEVES *et al.*, 2021).

O óxido nítrico frequentemente atua em oposição ao etileno em processos fisiológicos. Ele pode inibir a via de sinalização do etileno ou ativar enzimas que degradam seus precursores, impedindo a resposta morfogenética. Dessa forma, o óxido nítrico pode modular a ação de citocininas ou auxinas, hormônios críticos para a calogênese, de forma a desfavorecer a formação de calos (LOPES-OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A avaliação da morfogênese radicular em explantes de *Bowdichia virgilioides* apresentou diferença na porcentagem de enraizamento entre os tratamentos testados (Figura 3). O grupo controle apresentou um enraizamento basal, correspondendo à resposta esperada na ausência de reguladores de crescimento. O tratamento com etileno promoveu um aumento na indução radicular de forma dose-dependente. Na concentração de 20 ppm, observou-se um estímulo moderado, enquanto em 10 ppm, o efeito foi mais pronunciado, indicando que o etileno atua como um regulador positivo do enraizamento nesta espécie. Em contraste, a aplicação de oxido nítrico (10 µM e 40 µM) resultou em uma redução significativa na porcentagem de enraizamento comparado ao controle, sendo esse efeito mais pronunciado na concentração mais elevada (40 µM).

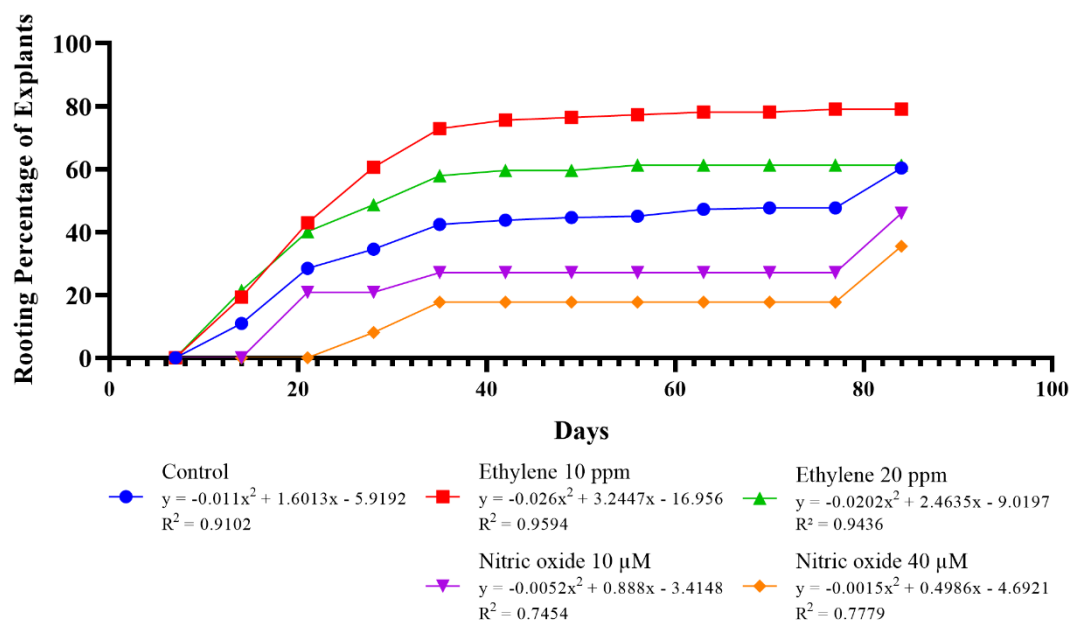


Figura 3. Porcentagem de raízes de explantes de *Bowdichia virgilioides* expostas ao etileno e óxido nítrico.

A partir da análise *in silico*, ao examinar a rede de interações associadas ao gene FEZ de *Arabidopsis thaliana* no banco de dados STRING, foram identificadas evidências significativas que demonstram a intrínseca relação entre o etileno e o crescimento radicular aprimorado (Figura 4).

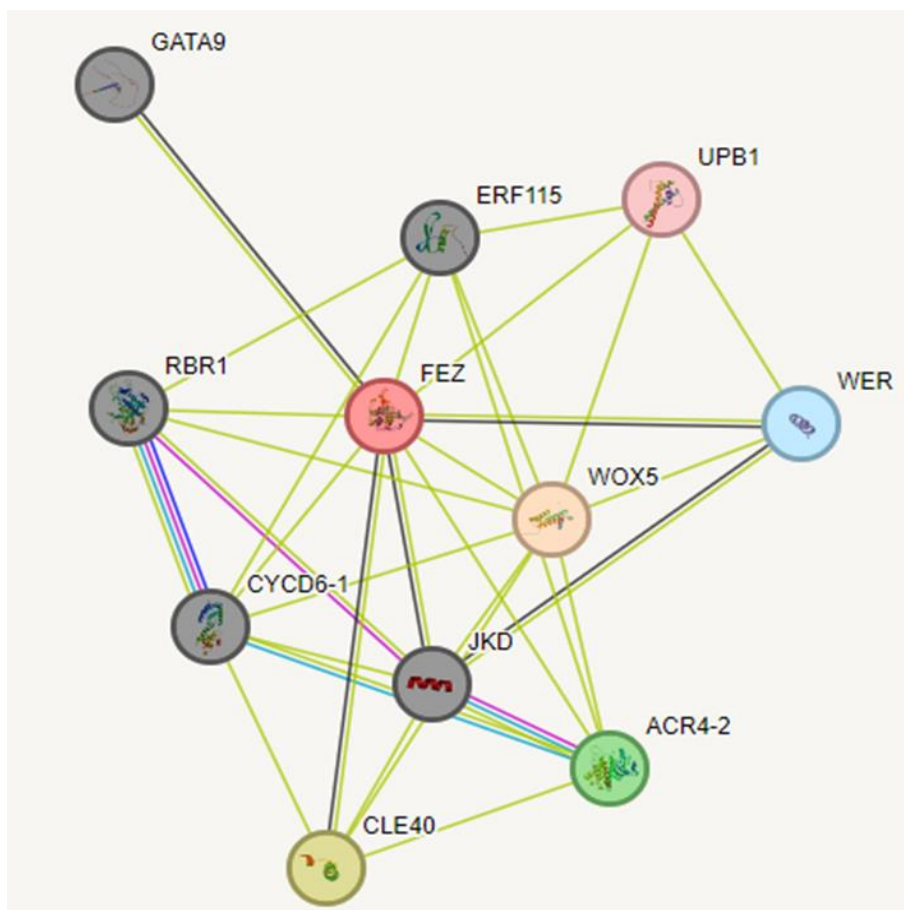


Figura 4. Rede de interação entre os genes FEZ e UPB1, WER, WOX5, ACR4-2, CLE40 de *Arabidopsis thaliana* através de provas de dados de Co-menção no Pubmed (linha amarela) e provas de Co-expressão (linha preta).

Neste contexto, a relação entre o gene FEZ, que estimula a multiplicação das células formadoras de raízes periclinais, e o gene WER, responsável por sintetizar uma proteína com uma função crucial na especificação do destino epidérmico das células na raiz. Além disso, destaca-se a associação com o gene UPB1, cuja principal atuação ocorre na diferenciação e multiplicação das células durante o crescimento das raízes, sendo ativado por vias distintas das influências dos fitohormônios presentes no vegetal (QU *et al.*, 2019).

Outra interação relevante é a entre FEZ e CLE40, envolvendo um gene que codifica uma proteína responsável por direcionar as células radiculares de forma eficiente, influenciando seu alongamento e diferenciação no meristema radicular. Isso tem um papel fundamental na determinação das estruturas que serão desenvolvidas na raiz (ZHANG *et al.*, 2023).

Continuando na análise, foi encontrado uma ligação persistente entre o gene FEZ e o gene ACR4-2. Esse último, além de ser ativado por FEZ, também responde à ativação pelo

gene CLE40, desempenhando uma função essencial na divisão celular, impactando no desenvolvimento radicular e na organização do crescimento da raiz.

Em seguida, analisando o gene WOX5 de *Arabidopsis thaliana* no banco de dados STRING, foram observadas as relações expressas na figura 5.

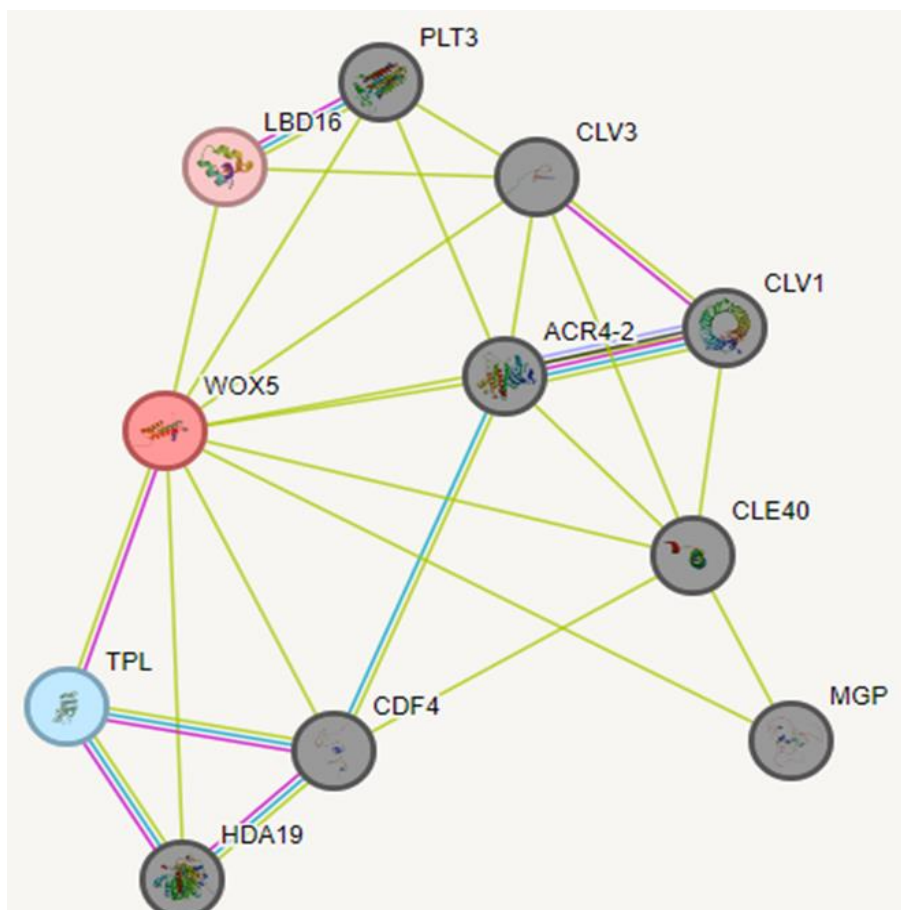


Figura 5. Rede de interação entre os genes WOX5 e TPL, LBD16 de *Arabidopsis thaliana* através de provas de dados de Co-menção no Pubmed (linha amarela) e provas experimentais e bioquímicas (linha vermelha).

Dessa forma, observa-se uma conexão entre o gene WOX5, cuja função envolve a manutenção e identificação das células-tronco, e o gene TPL, que atua na inibição da expressão de determinados genes promotores do crescimento radicular. Essa interação visa alcançar uma maior diferenciação celular. Adicionalmente, o gene TPL provoca respostas negativas aos estímulos do jasmonato e da auxina, resultando em um decréscimo na taxa de crescimento das raízes (FORZANI *et al.*, 2014).

No entanto, a interação entre o gene WOX5 e o gene LBD16 também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das raízes, uma vez que o gene LBD16 desempenha

um papel facilitador na formação das raízes laterais. Em contraste com o gene TPL, o gene LBD16 reage de maneira positiva à presença de auxina e possivelmente de etileno, devido à sua associação com o gene WOX5.

Em seguida, ao examinar a relação entre o gene NOA1 e *Arabidopsis thaliana* no banco de dados STRING, foi possível obter informações detalhadas sobre suas interações moleculares com outros genes, que são afetados por sua influência. Os resultados obtidos substanciam a conexão sólida entre o óxido nítrico e a embriogênese somática, devido à rede de sinalização envolvendo uma das proteínas relacionadas ao óxido nítrico. Essa relação se tornou evidente ao investigar mais profundamente o gene ADC2, que está associado ao NOA1 (Figura 6).

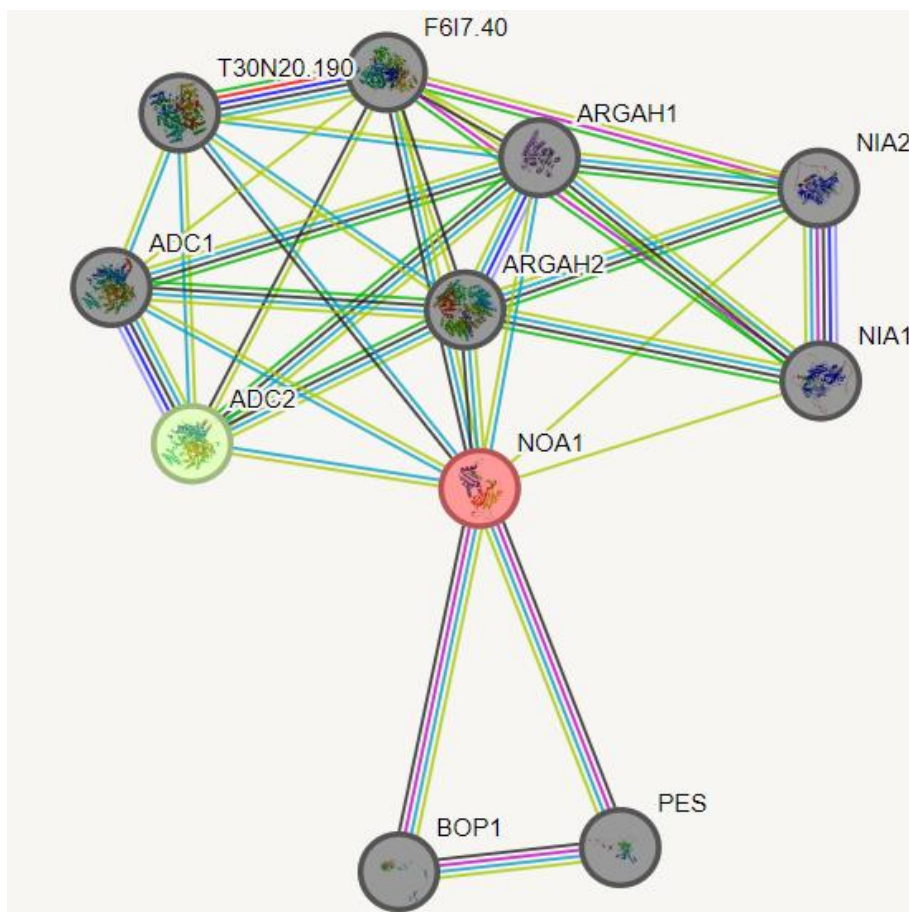


Figura 6. Rede de interação entre os genes NOA1 e ACD2 de *Arabidopsis thaliana* através de provas de dados de Co-menção no Pubmed (linha amarela) e provas de associação em banco de dados (linha azul).

A identificação dessa relação entre os genes NOA1, que é um gene responsável pela síntese de uma proteína relacionada ao óxido nítrico, para regular a síntese de outras proteínas

devido ao seu envolvimento com a estabilidade ribossomal, e o ADC2, que é um gene responsável pela produção de uma enzima que sintetiza putrescina a partir da arginina, presente na planta, e com a síntese e acumulação dessa proteína, contribui para o desenvolvimento normal da semente. Portanto, com essa relação entre o NOA1 e o gene ADC2, que aumenta a quantidade de putrescina, observa-se sua influência na embriogênese somática (SHAHBAZ & MAJEED, 2017).

No entanto, com uma análise mais aprofundada do gene ADC2 e de suas interações com outros genes no próprio banco de dados STRING, observou-se que ele possui relações com SPMS, SPDSYN1 e SAMDC2 (Figura 7).

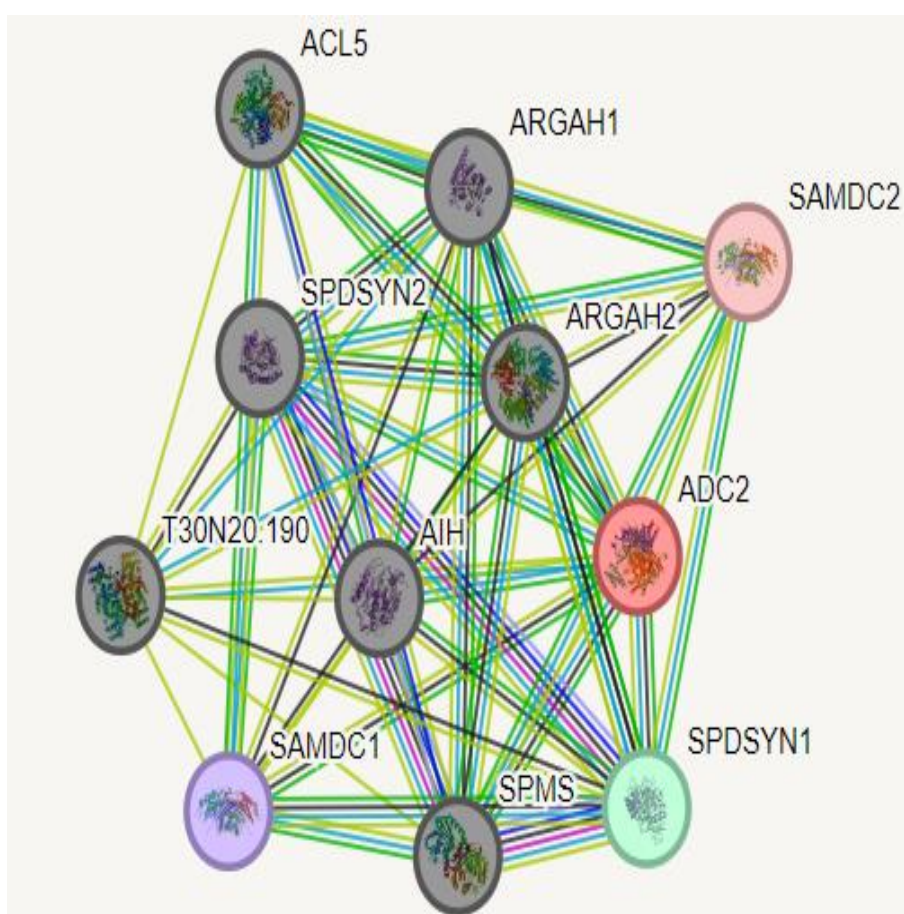


Figura 7. Rede de interação entre os genes ADC2 e SAMDC1, SAMDC2, SPDSYN1 de *Arabidopsis thaliana* através de provas de Co-expressão (linha preta) de provas de Co-menção no Pubmed (linha amarela) e provas de vizinhança genômica (linha verde).

Por meio dessas associações, a compreensão da família de genes SAMDC se aprofunda ao examinar as conexões envolvendo o gene SPMS. Esse gene é responsável pela síntese de uma enzima que produz espermina, uma poliamina derivada da putrescina, com implicações

intrínsecas na embriogênese somática e evidenciado por meio de suas interações na rede. Além disso, a relação entre o gene ADC2 e o gene SPDSYN1 é digna de nota, visto que o SPDSYN1 também sintetiza uma proteína que gera espermidina, e uma poliamina originada da putrescina, e tem conexões com a embriogênese somática.

Assim, tem-se, com uma análise em cadeia, a observação dos genes SPMS e SPDSYN1, onde os dois genes têm relação com genes da família SAMDC, os quais são essenciais para a embriogênese e o desenvolvimento normal das plantas (Figura 8 e 9).

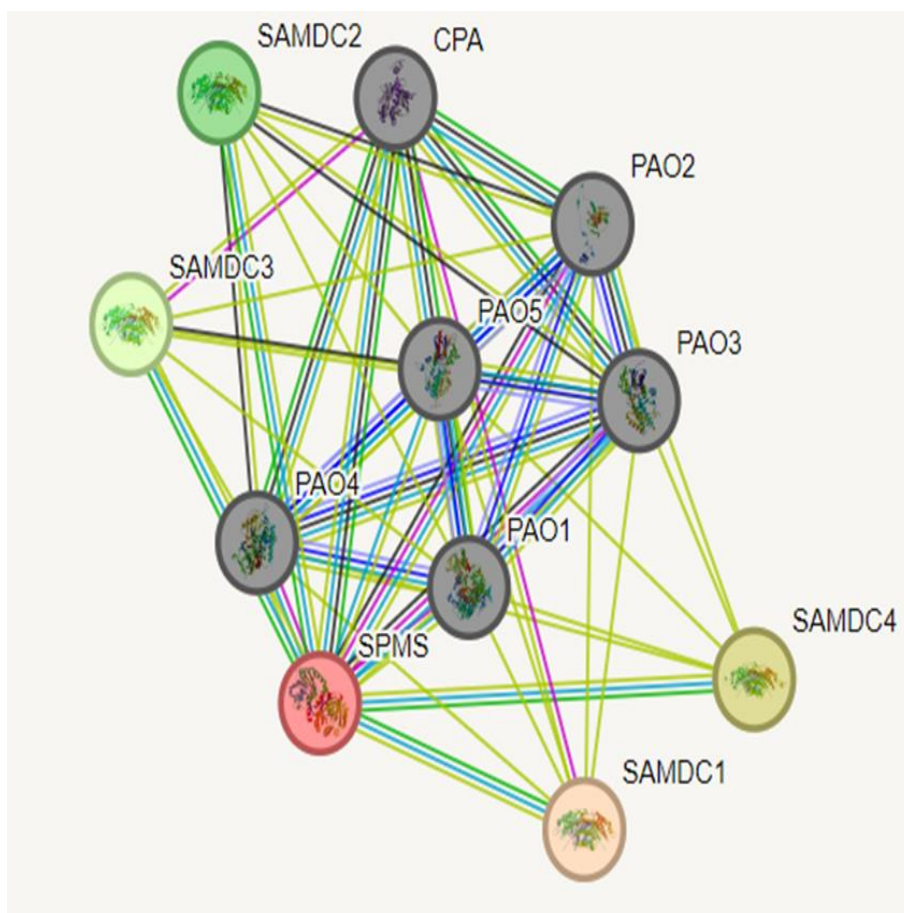


Figura 8. Rede de interação entre os genes ADC2 e SAMDC1, SAMDC2, SAMDC3, SAMDC4 de *Arabidopsis thaliana* através de provas de associação em banco de dados (linha azul), de provas de Co-menção no Pubmed (linha amarela) e provas de vizinhança genômica (linha verde).

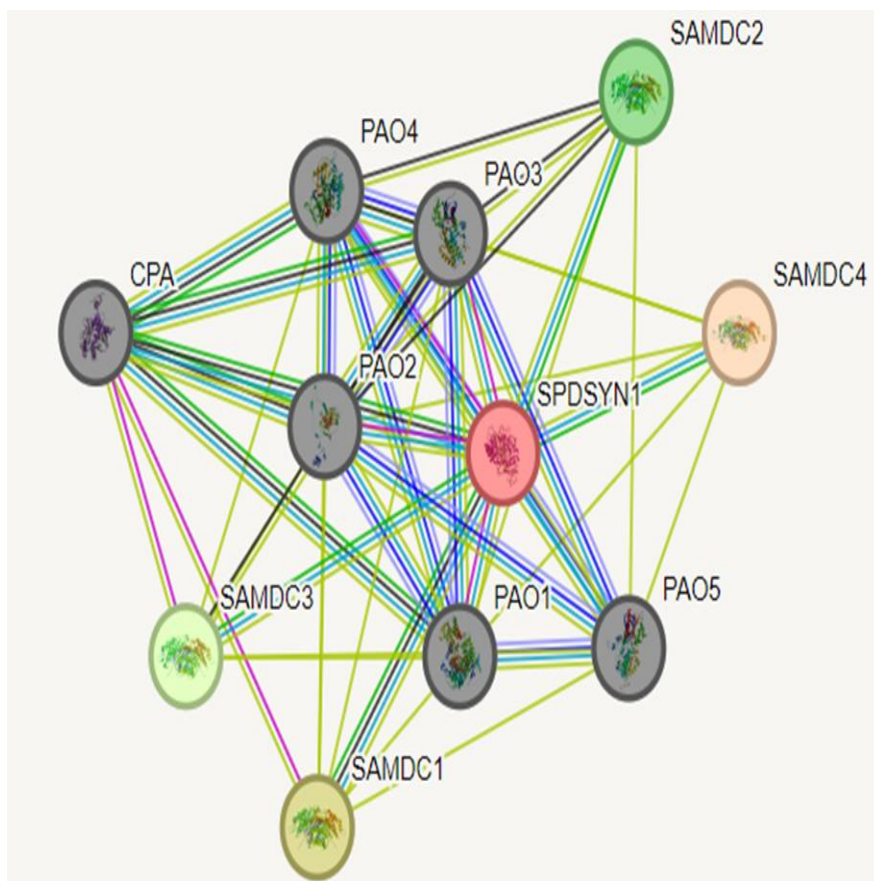


Figura 9. Rede de interação entre os genes ADC2 e SAMDC1, SAMDC2, SAMDC3, SAMDC4 de *Arabidopsis thaliana* através de provas de associação em banco de dados (linha azul), de provas de Co-expressão (linha preta) de provas de Co-menção no Pubmed (linha amarela) e provas de vizinhança genômica (linha verde).

A diferença observada entre SPMS e SPDSYN1 é que o gene relacionado à espermidina tem relação com mais genes da família SAMDC, revelando assim que a espermidina tem uma influência mais direta na embriogênese somática do que a espermina.

Em relação às colorações das linhas das redes de interação, as verdes implicam no domínio ao qual refere-se ao segmento genômico contendo características específicas associadas entre esses genes, providenciando conexão direta entre a atividade e a função metabólica. Já as interações vermelhas são genes híbridos formados previamente de outros genes independentes, que podem ter sido alterados devido a manipulação genética, ou seja, devido às condições em que as amostras foram realizadas, neste caso, o emprego dos indutores da organogênese. As interações em azul representa a interação de múltiplos genes associados a interações com diferentes proteínas. Os genes com nós em coloração preta não são relevantes para a discussão do trabalho visto que o etileno e o óxido nítrico não teve

intervenção no desenvolvimento de embriões somáticos através desses genes, que estão envolvidos em outras rotas metabólicas.

Conclusão

A indução dos embriões somáticos e calos através do método da embriogênese somática obteve melhor resultado com o uso do Ethrel, composto doador da molécula de etileno, na maior concentração testada de 20 ppm. Além disso, o etileno foi importante no crescimento radicular dos explantes por possuir interações associadas ao gene FEZ em *Arabidopsis thaliana*, o qual estimula a multiplicação de células formadoras de raízes. Já a utilização do GSNO, como composto doador de óxido nítrico mostrou ser prejudicial na formação de embriões somáticos, independente da concentração testada. Apesar dessa molécula possuir conexão com a embriogênese somática, através da análise do gene NOA1 em *Arabidopsis thaliana*, com a espécie estudada neste presente trabalho, não apresentou resultados que auxiliaram a indução de embriões e nem de calos que fossem melhores que os resultados apresentados pelo controle.

Referências bibliográficas

Barbosa, J. E. C., Neto, A. B. L., de Souza Santos, D., Lopes, E. A. P., de Lima Mendes, G., de Souza, G. S., ... & dos Santos Almeida, T. M. (2022). Superação de dormência em sementes de *Senna spectabilis* (DC) HS Irwin & Barneby. *Research, Society and Development*, 11(1), e32011124989-e32011124989. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24989>

Bhatla, S. C., & Lal, M. A. (2023). Crop physiology and biotechnology. In *Plant Physiology, Development and Metabolism* (pp. 809-830). Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1_34

Ferreira, D. F. (2019). SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Brazilian Journal of Biometrics*, 37(4), 529-535. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>

Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W., & Murray, J. A. (2014). *WOX5* suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Current Biology*, 24(16), 1939-1944.

Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant growth regulation*, 47, 91-110. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x>

Lopes-Oliveira, P. J., Oliveira, H. C., Kolbert, Z., & Freschi, L. (2021). The light and dark sides of nitric oxide: multifaceted roles of nitric oxide in plant responses to light. *Journal of Experimental Botany*, 72(3), 885-903. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa504>

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3). <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nascimento, E. V., Bonilla, O. H., de Lucena, E. M. P., do Nascimento, S. F., Farias, I. B. M., & de Sousa, L. H. (2021). Superação de dormência em sementes da *Cassia grandis* L. f.(Fabaceae). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 16(1), 89-96.

Neves, M., Correia, S., Cavaleiro, C., & Canhoto, J. (2021). Modulation of organogenesis and somatic embryogenesis by ethylene: an overview. *Plants*, 10(6), 1208. <https://doi.org/10.3390/plants10061208>

Qu, Y., Liu, X., Zhang, X., Tang, Y., Hu, Y., Chen, S., ... & Zhang, Q. (2019). Transcriptional regulation of *Arabidopsis* copper amine oxidase ζ (CuAO ζ) in indole-3-butyric acid-induced lateral root development. *Plant Growth Regulation*, 89, 287-297. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00535-w>

Shahbaz, M., & Majeed, S. (2017). Cross talk between nitric oxide and phytohormones regulate plant development during abiotic stresses. *Phytohormones: Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*, 117.

Silva, J. J. D. N., Navroski, M. C., Aquino, M. G. C. D., Denega, L., Fonseca, P. H. T. D., Oliveira, L. M. D., & Pereira, M. D. O. (2023). Vegetative rescue, in vitro establishment and cutting technique of *Drimys brasiliensis* Miers. *Ciência Florestal*, 33, e69093. <https://doi.org/10.5902/1980509869093>

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., ... & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 51(D1), D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>

Verma, N., Tiwari, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2020). Nitric oxide in plants: an ancient molecule with new tasks. *Plant Growth Regulation*, 90, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00543-w>

Zhang, Y., Xu, T., & Dong, J. (2023). Asymmetric cell division in plant development. *Journal of integrative plant biology*, 65(2), 343-370. <https://doi.org/10.1111/jipb.13446>

Zheng, Q., Zheng, Y., & Perry, S. E. (2013). AGAMOUS-Like15 promotes somatic embryogenesis in Arabidopsis and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response. *Plant physiology*, 161(4), 2113-2127. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216275>

3.2 INFLUÊNCIA DO ETILENO NA MICROPROPAGAÇÃO DA ESPÉCIE NATIVA
BRASILEIRA *Bowdichia Virgilioides* Kunth

Artigo submetido na revista *Plant cell, tissue and organ culture*

Influência do etileno na micropropagação da espécie nativa brasileira *Bowdichia virgilioides* Kunth

RESUMO

A técnica de micropropagação *in vitro* vem sendo amplamente utilizada para a propagação somaclonal de espécies diversas, as quais possuem interesse econômico e conseqüentemente industrial. É uma técnica que permite a regeneração da planta completa a partir da indução da formação de estruturas morfológicas como embriões somáticos, calos e raízes adventícias provindos de um explante o qual possui células somáticas. A embriogênese somática é um processo biotecnológico muito utilizado na micropropagação vegetal em que as células somáticas são induzidas através de reguladores de crescimento (fitormônios), condições específicas de cultivo e meio nutritivo pré-determinado a formação dessas estruturas morfológicas até a regeneração de uma planta completa. Esse processo permite o melhoramento genético e preservação de genótipos de interesse; a multiplicação é rápida e eficiente; permite aplicação na criopreservação, importante para espécies em risco de extinção; e não depende de sementes para a multiplicação da planta, já que algumas espécies possuem produção de sementes limitada. A espécie escolhida para o presente trabalho foi a *Bowdichia virgilioides*, popularmente conhecida como Sucupira preta, a qual já sofreu risco de extinção por ter uma característica fisiológica chamada de dormência tegumentar. Essa característica impede a germinação das sementes por ter o tegumento impermeável impedindo a absorção de água que, na natureza, é rompido apenas com condições ambientais específicas. A Sucupira preta faz parte de programas de reflorestamento, é comercialmente utilizada para construções civis e móveis de acabamento interno, possui propriedades medicinais e terapêuticas, além de ser uma espécie nativa do Brasil. Para o emprego da embriogênese somática utilizando a *Bowdichia virgilioides*, o etileno foi o composto utilizado para a indução das estruturas morfológicas de interesse. Esse regulador de crescimento é biossintetizado pelas plantas e faz parte de processos fisiológicos importantes para o desenvolvimento e crescimento saudável. Apesar de já ser produzido naturalmente pelos tecidos vegetais, o uso exógeno desse composto em metodologias de cultura de tecidos vem sendo aplicado em diferentes espécies e sua finalidade ainda é desconhecida. Com isso, o objetivo do trabalho é investigar a influência do etileno na embriogênese somática. As concentrações de etileno testadas foi de 0; 15; 20; e 25ppm em condições assépticas e controladas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12h. A indução da formação de embriões não obteve sucesso em relação ao controle, o que mostra a interação negativa do etileno na formação dessa estrutura. Já a formação de calos, esta foi positiva em todas as concentrações testadas, com maior porcentagem na concentração de 25ppm. Ou seja, a interação entre o regulador de crescimento e a técnica de calogênese mostra resultados relevantes para a metodologia empregada. Em relação a formação de raízes adventícias, a concentração de 20ppm de etileno foi a de maior sucesso, sendo que as outras concentrações testadas (15 e 25ppm) foram iguais ou inferiores ao controle. Desse modo, a espécie *Bowdichia virgilioides* apresenta alta sensibilidade ao etileno.

Palavras-chave: embriogênese somática; Sucupira preta; calogênese; raízes adventícias; fitormônio.

ABSTRACT

In vitro micropropagation has been widely used for the somaclonal propagation of diverse species with economic and industrial relevance. This technique enables whole-plant regeneration through the induction of morphological structures such as somatic embryos, calluses, and adventitious roots derived from somatic cell explants. Somatic embryogenesis is a key biotechnological process in plant micropropagation, where somatic cells are induced via growth regulators (phytohormones), specific culture conditions, and a predetermined nutrient medium to form these morphological structures until full plant regeneration is achieved. This process facilitates genetic improvement and the preservation of valuable genotypes, enables rapid and efficient multiplication, supports cryopreservation (crucial for endangered species), and bypasses seed dependency—particularly important for species with limited seed production. The species selected for this study was *Bowdichia virgilioides*, commonly known as Sucupira preta, which has faced extinction risks due to a physiological trait known as seed coat dormancy. This characteristic inhibits seed germination due to an impermeable seed coat that prevents water absorption, which in nature is only disrupted under specific environmental conditions. Sucupira preta is part of reforestation programs, commercially used in civil construction and fine interior furniture, possesses medicinal and therapeutic properties, and is a native Brazilian species. For somatic embryogenesis induction in *Bowdichia virgilioides*, ethylene was employed as the growth-regulating compound. This phytohormone is biosynthesized by plants and plays a vital role in physiological processes essential for healthy development and growth. Although naturally produced by plant tissues, exogenous ethylene application in tissue culture methodologies has been explored across various species, yet its precise role remains unclear. Thus, this study aimed to investigate ethylene's influence on somatic embryogenesis. The tested ethylene concentrations (0, 15, 20, and 25 ppm) were applied under aseptic, controlled conditions in a growth chamber with a 12-hour photoperiod. Embryo induction was unsuccessful compared to the control, indicating ethylene's negative interaction with this structure. Conversely, callus formation was positive at all concentrations, with the highest percentage at 25 ppm. This suggests a significant interaction between ethylene and callogenesis in the applied methodology. For adventitious root formation, 20 ppm ethylene yielded the highest success, while other concentrations (15 and 25 ppm) were equal to or lower than the control. Thus, *Bowdichia virgilioides* exhibits high sensitivity to ethylene.

Keywords: somatic embryogenesis; Sucupira preta; callogenesis; adventitious roots; phytohormone.

INTRODUÇÃO

O ciclo completo das plantas desde a germinação até a transição para a planta adulta inclui uma série de hormônios que fazem parte do crescimento, reprodução até sua senescência. Fazem parte do desenvolvimento de órgãos fundamentais como as folhas, flores, frutos e as estruturas morfológicas responsáveis pelo funcionamento da planta como um todo. Diferentes fitormônios fazem parte dessas vias de metabolismo, alterando e induzindo mudanças genéticas nas plantas de acordo com condições em que elas estão inseridas. O etileno é um desses fitormônios, o qual interage com diversos outros que estão presentes naturalmente na via metabólica, fazendo parte da sinalização e progressão dos diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento das plantas (Iqbal *et al.*, 2017).

O etileno tem duas funções controversas: de promover ou de inibir o processo de crescimento e senescência dependendo da sua concentração, da sua interação com outros hormônios, tempo de aplicação e a espécie a ser trabalhada (Reid, 1995; Lutts *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1998; Pierik *et al.*, 2006). Na espécie *Arabidopsis*, o crescimento das estruturas foliares podem ser alteradas de acordo com as condições ambientais em que esta espécie se encontra. Assim como a concentração do etileno nos tecidos vegetais ou na atmosfera em que a planta se encontra, pode estar diretamente ligada no desenvolvimento e crescimento desta estrutura morfológica dependendo da planta a ser trabalhada, como por exemplo, em diferentes espécies de gramas, em bulbos de tulipas e em espécie de mostarda (Fiorani *et al.*, 2002; Kawa-Miszczak *et al.*, 2003; Khan, 2005). Já na espécie *Lactuca sativa*, uma variedade de alface, foi observado que em ambiente fechado houve um crescimento reduzido das folhas de alface, devido a produção natural de etileno pelas plantas terem atingido um nível de estresse em comparação com as alfaces que foram cultivadas em frascos onde o etileno foi removido, resultando no crescimento normal das folhas (He *et al.*, 2009). Outra finalidade do etileno em interação com outros hormônios e enzimas é a senescência das estruturas morfológicas vegetais, como das flores, folhas, e até mesmo dos frutos. Os principais hormônios que interagem com o etileno na senescência vegetal são as auxinas, citocininas, giberelinas e o ácido abscísico, podendo promover ou retardar essa ocorrência nas plantas (Iqbal *et al.*, 2017).

O efeito do etileno em processos de regeneração como a organogênese e a embriogênese somática tem sido estudado com a finalidade de obter melhores informações de como esse hormônio influencia a formação e desenvolvimento em diferentes espécies, e como ele pode afetar na regeneração de certos tecidos e estruturas morfológicas. O impacto do etileno em culturas *in vitro* varia para cada espécie, genótipo e explante juntamente com os fatores transcricionais do etileno que tem ligação direta com a indução da embriogênese somática (ES), promovendo ou impedindo-a. A micropropagação é uma das melhores alternativas para a propagação em larga escala e a conservação das plantas. Esse processo de regeneração depende de múltiplos fatores para a otimização dos resultados dos tecidos vegetais, como a composição mineral, fonte de carbono, reguladores de crescimento, agentes gelificantes, pH, luminosidade, temperatura, e até mesmo os gases presentes no meio de cultivo (Kumar, 2011). O etileno é um hormônio presente na forma de gás que é liberado durante o cultivo *in vitro* pelos tecidos vegetais, onde há um acúmulo nos recipientes fechados, sendo mais difícil de ser analisado. A importância do entendimento da influência do etileno no cultivo *in vitro* é relevante para os avanços no processo de regeneração, permitindo

a compreensão do porquê algumas espécies são mais recalcitrantes do que outras (Neves *et al.*, 2021). Portanto, a manipulação das concentrações de etileno no cultivo *in vitro* permite entender melhor a influência desse hormônio nos inúmeros processos fisiológicos que ele está presente, como por exemplo, a inibição ou a sinalização das rotas metabólicas que ele participa, influenciando diretamente na embriogênese somática (Schaller *et al.*, 2017).

O etileno sintetizado naturalmente pelas plantas tem como conversores o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e o S-adenosilmetionina (SAM), os quais intermediam a conversão da metionina para etileno nos tecidos vegetais. Para o uso do etileno de forma exógena, alguns precursores que demonstraram eficácia em cultivo *in vitro* em diferentes espécies são utilizados como tratamentos doadores de etileno, como por exemplo o Ethephon e o Ethrel. Além dos doadores de etileno, outros tratamentos exógenos, como o ACC, podem ser utilizados para promover a biossíntese de etileno (Yang, 1969). A utilização de partes da planta, chamados de explantes, desencadeiam respostas de estresse, alterando a transcrição e conseqüentemente o metabolismo e a síntese proteica, dependendo podem afetar a proliferação celular, formando calos. Esse processo implica diretamente na indução da embriogênese somática, como por exemplo em folhas de *Solanum betaceum* e *Arbutus unedo*, que são espécies frutíferas (Correia *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2016). A biossíntese do etileno, em tecidos vegetais de plantas como em *Arabidopsis thaliana* e *Cucurbita maxima* mostrou ser induzida através da injúria na planta, ou seja, do explante (Hyodo *et al.*, 1991; Rojo *et al.*, 1999). A consequência dessa resposta é devido ao aumento da atividade de ACC sintase (ACS), após o corte do explante, acarretando uma maior síntese do precursor de etileno, o ACC, aumentando a produção desse hormônio (Boller *et al.*, 1980), além do acúmulo de citocininas, induzindo também a formação de calos (Ikeuchi *et al.*, 2017). Com isso, observa-se o papel do etileno a respostas de estresse biótico e abiótico, como mostrado em diversos outros estudos, como em espécies de tabaco, *Aspergillus flavus* em milho e em *Arabidopsis* (Park *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2013).

Nesse contexto, é válido atribuir certa relevância à técnica de micropropagação vegetal, a qual consiste na multiplicação de plantas em laboratório a fim de proporcionar a multiplicação rápida em larga escala de plantas livres de doenças, além da preservação de espécies ameaçadas, melhoria genética e proporcionar a produção durante o ano todo. Assim, objetiva-se o emprego do etileno como indutor da embriogênese somática por via direta e indireta (calogênese) e avaliação de formação de raízes dos explantes provindos da espécie *Bowdichia virgilioides* kunth, conhecida popularmente como Sucupira preta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foi feito a germinação das sementes de *Bowdichia virgilioides* kunth. As sementes foram inoculadas em Meio MS (Murashige; Skoog, 1962), com adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar, mantidos em pH entre 5.8 e 6.0. Após o meio solidificar, foi realizada a escarificação química das sementes de Sucupira preta com ácido sulfúrico PA por 15 minutos e após isso foi feito a lavagem das sementes com água destilada estéril três vezes para a quebra da dormência tegumentar. As sementes foram inoculadas e armazenadas em sala de crescimento com condições controladas em tubos de vidro transparente, permitindo a entrada de iluminação com fotoperíodo de 12h e troca gasosas com o meio externo controlada através da vedação dos tubos com algodão e plástico filme esterilizados. A germinação foi

acompanhada em durante três meses até a formação da plântula. O experimento foi realizado com quatro tratamentos de Ethrel, composto doador de etileno, em diferentes concentrações: 0; 15; 20; 25 ppm. Para esse experimento, foi realizado com explantes radiculares de 1 centímetro das plântulas de Sucupira preta cultivadas anteriormente *in vitro*. Foi inoculado três explantes por tubo, em Meio MS (Murashige; Skoog, 1962) com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado para pH 5,8–6,0 e com seus respectivos tratamentos (0; 15; 20; 25 ppm). Cinquenta repetições por tratamento. O controle foi feito com meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, ajustado para pH 5,8–6,0. Os parâmetros da embriogênese somática, calogênese, e formação de raízes foram avaliados a cada 3 dias totalizando 14 avaliações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os explantes radiculares expostos ao etileno nas concentrações de 20 e 25 ppm resultaram em uma formação de embriões somáticos em menor quantidade do que os formados pelo controle ao longo das 14 avaliações (fig. 1 A). Já o experimento com o tratamento de etileno na concentração de 15 ppm também foi abaixo do controle até o 30º dia de avaliação, nas avaliações seguintes a porcentagem dos embriões somáticos formados por esse tratamento foi maior que a porcentagem do controle. No entanto, não houve um crescimento exponencial significativo do tratamento de 15 ppm para o controle, já que a maior parte dos embriões formados foram nos primeiros 30 dias de análise. Da mesma forma, a média de embriões somáticos por explante em qualquer concentração de etileno foi menor do que a média dos embriões formados no controle (fig. 1 B). Podem ser atribuídos a esse resultado dois fatores: o etileno ser um fitormônio prejudicial na formação de embriões somáticos via embriogênese somática direta e as condições de luminosidade e temperatura.

Assim como em outros trabalhos como na espécie *Epidendrum denticulatum*, em que os tratamentos em menores concentrações de etileno utilizando tratamento com inibidores de etileno como o nitrato de prata, resultaram em uma maior sobrevivência e desenvolvimento das plantas dessa espécie (Juras *et al.*, 2020); em espécies de *Sinningia speciosa*, em que inibidores de etileno promoveram melhor a organogênese (Chae *et al.*, 2012); em espécies de *Cymbidium* em que os explantes apresentaram uma taxa de sobrevivência menor quando os níveis de etileno eram maiores. Com isso, a espécie *Bowdichia virgilioides* indica ser sensível a esse fitormônio. O segundo fator atribuído a baixa formação de embriões somáticos é as condições em que o experimento foi exposto, como a luminosidade em sala de crescimento com fotoperíodo de 12h. No estudo feito para analisar a influência da radiação UV-B nas mudanças causadas no etileno em brotos de *Pyrus communis* L., a concentração do etileno nos frascos aumentou significativamente em até quatro vezes mais, dependendo do tratamento, ao longo de duas semanas (Predieri *et al.*, 1993). Com isso, pode-se atribuir ao resultado do presente estudo, que os níveis de etileno aumentaram ao longo do tempo a ponto de ser prejudicial na formação de embriões somáticos devido a luminosidade em que o experimento estava condicionado. No entanto, em uma grande parte do experimento em que os embriões foram formados, houve oxidação completo do material.

A formação de calos a partir dos explantes radiculares de *Bowdichia virgilioides* apresentou resultados positivos em relação ao controle em todas as concentrações testadas. Sendo que a maior taxa de formação de calos foi na concentração de 25 ppm de etileno, porém

em relação à média de calos por explante, a concentração com maior índice foi de 20ppm, como indicado na figura 2A e 2B. O tratamento de 15ppm foi o experimento com menor taxa de formação de calos, tanto por explante quanto em porcentagem. Apesar de a formação de calos ter sido maior em relação ao controle comparado com a formação de embriões e seu respectivo controle, há um estudo feito com uma espécie de pimenta do gênero *Capsicum* em que a porcentagem de explantes com formação de calos sem a presença de um precursor de etileno, o nitrato de prata, foi menor em relação aos experimentos sem esse precursor. O nitrato de prata altera a ação nas células vegetais, atuando como um inibidor competitivo do etileno, impedindo os efeitos fisiológicos causados por esse hormônio (Gammoudi *et al.*, 2018). Ou seja, nesse estudo com *Capsicum*, os experimentos com maiores níveis de etileno, aqueles que não tinham a molécula precursora, houve maior formação de calos. Esse estudo também aborda que esse resultado é contradizente aos resultados com a espécie *Solanum lycopersicon* observado por Shah *et al.* (2014), em que houve maior formação de calos no meio contendo nitrato de prata. Assim, entende-se que a ação do etileno varia de espécie para espécie.

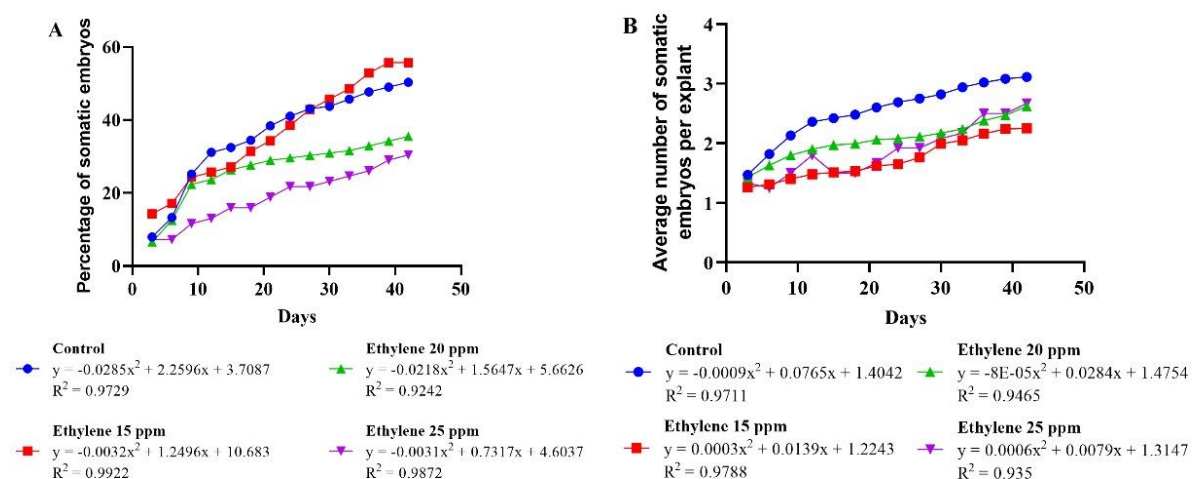


Figura 1. (A) Porcentagem de embriões somáticos induzidos com etileno nas concentrações de 0; 15; 20 e 25ppm. (B) Média do número de embriões somáticos por explante.

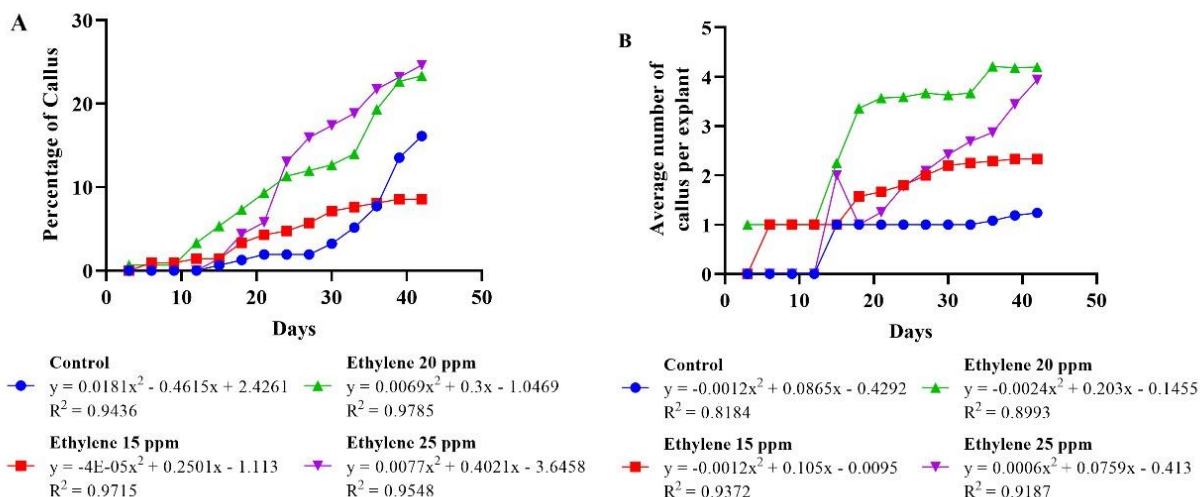


Figura 2. (A) Porcentagem de calos induzidos com etileno nas concentrações de 0; 15; 20 e 25ppm. (B) Média do número de calos por explante.

A porcentagem da formação de raízes adventícias na concentração de 20ppm de etileno foi significativamente maior que a porcentagem de raízes formadas pelo controle (fig. 3). Ou seja, o etileno nessa concentração, promoveu o desenvolvimento dessa estrutura que é considerada importante para a técnica de micropropagação. Já que permite que as plantas cultivadas *in vitro* desenvolvam um sistema radicular eficiente, o que facilita a absorção de nutrientes e conseqüentemente o bom desenvolvimento da planta após sua aclimatização. Na figura 3, o etileno na maior concentração se igualou aos resultados obtidos no controle. E quando a concentração foi menor, de 15ppm, a formação de raízes adventícias foi praticamente nula, não sendo significativa para a técnica implementada. Com isso, compreende-se que, para a formação dessa estrutura, a espécie *Bowdichia virgilioides* é sensível ao etileno, não permitindo grandes variações de concentração. Em estudo feito com a espécie *Tagetes erecta* L. cv. Marvel o uso de etileno estimulou significativamente a formação de raízes adventícias, isso aconteceu devido ao aumento dos níveis de óxido nítrico presente, melhorando as atividades enzimáticas das enzimas óxido nítrico sintase e nitrato redutase durante o processo de enraizamento (Jin *et al.*, 2017). Ou seja, a indução de raízes adventícias pelo etileno pode ser causada pelo aumento dos níveis de NO, composto biossintetizado naturalmente pelas plantas.

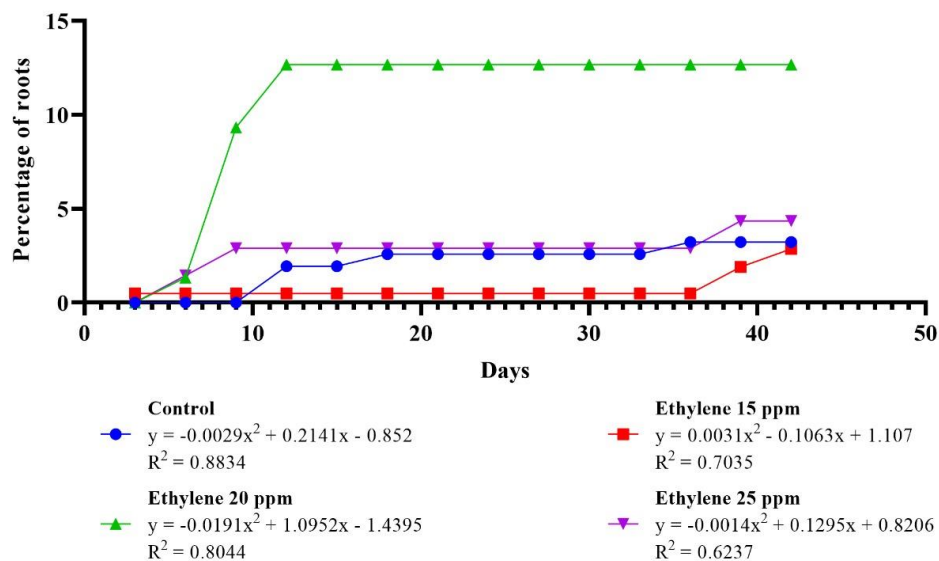


Figura 3. Porcentagem de raízes adventícias formadas com o emprego do etileno nas concentrações de 0; 15; 20 e 25 ppm.

Foi feita a análise multivariada em que avalia o grau de interação entre as variáveis do experimento. Ou seja, foi avaliado a interação entre os tratamentos com as diferentes concentrações de etileno e as variáveis resposta: embriões somáticos, calos e raízes adventícias; e a análise entre essas variáveis resposta. Observa-se na figura 4 que quanto mais próximo do valor (1) maior é a interação entre o etileno e essas variáveis resposta, dessa forma o etileno demonstrou ter uma interação negativa com a embriogênese somática e uma interação positiva com a calogênese. Já a interação entre essas duas técnicas também houve interação negativa, já que nessas condições há a formação de apenas um tipo de estrutura, embrião ou calo. A formação de raízes adventícias teve relação com o etileno de forma positiva e também houve formação dessa estrutura quando houve formação de calos. Porém observa-se que quando há formação de raízes, prejudica a formação de embriões e vice-versa, sendo assim, essas estruturas possuem relação indiretamente proporcional. Em um estudo de cultura de tecidos com cultura de cenoura (*Daucus carota*), foi aplicado dois tipos de citocininas BA com 2,4-D que resultou na mesma relação antagônica de formação de calos e isso suprimiu a formação de embriões somáticos, em que houve essa relação de desproporcionalidade (Kamada; Harada, 1979). Esse resultado pode ser devido às células dos embriões somáticos que apresentam regiões meristemáticas bem definidas em que já possuem funcionalidade primária de se tornar um embrião completo. Já as estruturas calogênicas possuem desdiferenciação celular possibilitando que essas células se reorganizem em uma nova estrutura novamente, facilitando assim o desenvolvimento dessa estrutura pela ação do hormônio testado.

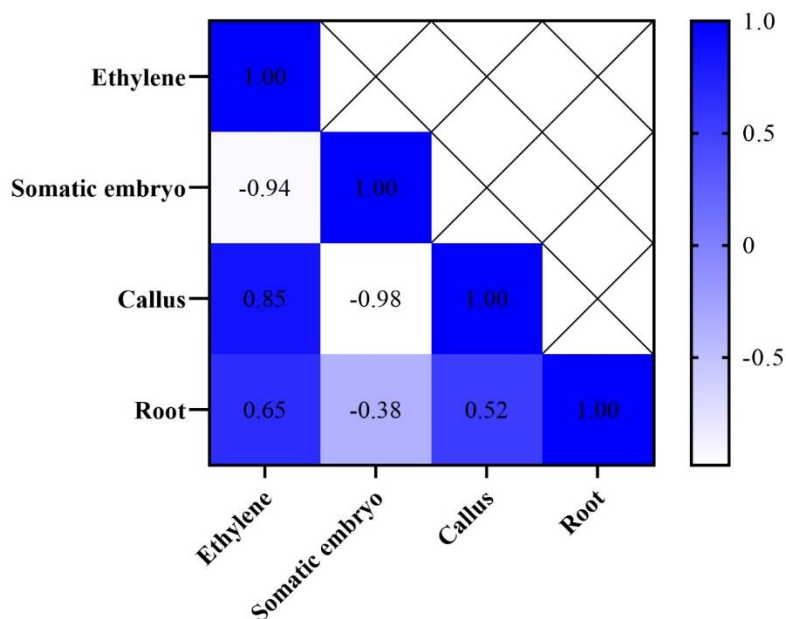


Figura 4. Gráfico de correlação de Pearson – análise do grau de correlação entre os tratamentos de etileno e entre as variáveis resposta. Sendo que o valor (1) corresponde a maior correlação do etileno com a embriogênese somática e a calogênese.

CONCLUSÃO

A influência do etileno nos explantes radiculares de *Bowdichia virgilioides* foi benéfica na formação de calos e de raízes adventícias, estruturas morfológicas importantes para a regeneração da planta na técnica de micropropagação. A espécie demonstrou ser altamente sensível aos níveis de etileno exógeno. Já que para a formação das raízes adventícias a concentração de maior sucesso foi de 20ppm enquanto que nas concentrações intermediárias a esse valor, 25 e 15ppm, obteve-se resultados iguais ou inferiores ao controle. Em relação a formação de embriões somáticos, o etileno mostrou ser prejudicial, com resultados inferiores ao controle. Foi atribuído a esse resultado as condições em que o experimento foi condicionado, como a luminosidade que pode ter afetado negativamente a formação dessa estrutura em conjunto com o etileno. Diferente da formação de calos, que resultou em uma maior porcentagem do que os calos formados pelo controle. Com isso, pode-se concluir que o etileno em conjunto com a luz pode afetar a embriogênese somática, mas promove a calogênese e a formação de raízes adventícias.

REFERÊNCIAS

Boller, T.; Kende, H. Regulation of wound ethylene synthesis in plants. *Nature*, 1980, v. 286, p. 259–260.

Chae, S. C.; Kim, H. H.; Park, S. U. Ethylene inhibitors enhance shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*). *ScientificWorld Journal*, 2012, p. 1–4.

Cheng, M. C.; Liao, P. M.; Kuo, W. W.; Lin, T. P. The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol.*, 2013, v. 162, p. 1566–1582.

Correia, S.; Lopes, M. L.; Canhoto, J. M. Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees*, 2011, v. 25, p. 1009–1020.

Fiorani, F.; Bogemann, G. M.; Visser, E. J. W.; Lambers, H.; Voeseckem, L. A. C. J. Ethylene emission and responsiveness to applied ethylene vary among *Poa* species that inherently differ in leaf elongation rates. *Plant Physiol.*, 2002, v. 129, p. 1382–1390.

Gammoudi, n.; San Pedro, t.; Ferchichi, a.; Gisbert, c. Improvement of regeneration in pepper: a recalcitrant species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 54, n. 2, p. 145–153, 2018

He, C.; Davies, F. R. jr.; Lacey, R. E. Ethylene reduces gas exchange and growth of lettuce plants under hypobaric and normal atmospheric conditions. *Physiol. Plant.*, 2009, v. 135, p. 258–271.

Hyodo, H.; Tanaka, K.; Suzuki, T. Wound-induced ethylene synthesis and its involvement in enzyme induction in mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Postharvest Biol. Technol.*, 1991, v. 1, p. 127–136.

Ikeuchi, M.; Iwase, A.; Rymen, B.; Lambolez, A.; Kojima, M.; Takebayashi, Y.; Heyman, J.; Watanabe, S.; Seo, M.; De Veylder, L.; *et al.* Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiol.*, 2017, v. 175, p. 1158–1174.

Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M. I. R. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 8(475), 1–19, 2017.

Jin, X.; Liao, W.-B.; Yu, J.-H.; Ren, P.-J.; Dawuda, M. M.; Wang, M.; Niu, L.-J.; Li, X.-P.; Xu, X.-T. Nitric oxide is involved in ethylene-induced adventitious rooting in marigold

(*Tagetes erecta* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 2017, v. 97, n. 4, p. 615–623.

Juras, M. C. R. et al. Direct organogenesis and ethylene regulators in the cloning of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, 2020, v. 131, p. 374–379.

Kamada, h.; Harada, h. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v. 91, n. 3, p. 255-266, 1979.

Kawa-miszczak, L.; Wêgrzynowicz-lesiak, E.; Miszczak, A.; Saniewski, M. Effect of methyl jasmonate and ethylene on leaf growth, anthocyanin accumulation and CO₂ evolution in tulip bulbs. *J. Fruit Orna. Plant Res.*, 2003, v. 11, p. 59–68.

Khan, N. A. The influence of exogenous ethylene on growth and photosynthesis of mustard (*Brassica juncea*) following defoliation. *Sci. Hortic.*, 2005, v. 105, p. 499–505.

Kumar, N.; Reddy, M. P. In vitro plant propagation: a review. *J. For. Sci.*, 2011, v. 27, p. 61–72.

Lutts, S.; Kinet, J. M.; Bouharmont, J. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.*, 1996, v. 78, p. 389–398.

Martins, J. F.; Correia, S. I.; Canhoto, J. M. Somatic embryogenesis induction and plant regeneration in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). In: Germana, M.; Lambardi, M. (Eds.). *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2016. v. 1359, p. 329–339.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, v. 15, n. 3, p. 473–497.

Neves, M., Correia, S., Cavaleiro, C., & Canhoto, J. Modulation of organogenesis and somatic embryogenesis by ethylene: an overview. *Plants*, 10(6), 1208, 2021.

Park, M. J.; Park, C.-J.; Lee, S.-B.; Ham, B.-K.; Shin, R.; Paek, K.-H. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*, 2001, v. 13, p. 1035–1046.

Pierik, R.; Tholen, D.; Poorter, H.; Visser, E. J.; Voesenek, L. A. C. J. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.*, 2006, v. 11, p. 176–183.

Predieri, Stefano; Krizek, Donald T.; Wang, Chien Y.; Mirecki, Roman M.; Zimmerman, Richard H. Influence of UV-B radiation on developmental changes, ethylene, CO₂ flux and polyamines in cv. Doyenne d'Hiver pear shoots grown in vitro. *Physiologia Plantarum*, v. 87, n. 2, p. 109-117, 1993.

Reid, M. S. Ethylene in plant growth, development, and senescence. In: Davis, P. J. (Ed.). *Plant Hormones*. Dordrecht: Springer, 1995. doi: 10.1007/978-94-011-0473-9_23.

Rojo, E.; León, J.; Sánchez-serrano, J. J. Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 1999, v. 20, p. 135–142.

Schaller, G. E.; Binder, B. M. Inhibitors of ethylene biosynthesis and signaling. *Methods Mol. Biol.*, 2017, v. 1573, p. 223–235.

Shah, s. h.; Ali, s.; Jan, s. a.; Din, j.; Ali, g. m. Assessment of silver nitrate on callus induction and in vitro shoot regeneration in tomato (*Solanum lycopersicum** Mill.)*. *Pakistan Journal of Botany*, v. 46, p. 2163–2172, 2014.

Thompson, J. E.; Froese, C. D.; Madey, E.; Smith, M. D.; Hong, Y. W. Lipid metabolism during plant senescence. *Prog. Lipid Res.*, 1998, v. 37, p. 119–141.

Wang, S.; Park, Y. S.; Yang, Y.; Borrego, E. J.; Isakeit, T.; Gao, X.; Kolomiets, M. V. Seed-derived ethylene facilitates colonization but not aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize. *Front. Plant Sci.*, 2017, v. 8, p. 415.

Yang, S. F. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiol.*, 1969, v. 44, p. 1203–1204.

3.3 OXIDATION AND VIABILITY OF *VANILLA PHAEANTHA* Rchb.f. EXPLANTS EXPOSED TO ETHYLENE IN VITRO CULTIVATION

Artigo redigido e aceito pela revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas.

OXIDATION AND VIABILITY OF *VANILLA PHAEANTHA* EXPLANTS EXPOSED TO ETHYLENE IN *IN VITRO* CULTIVATION

ABSTRACT

Vanilla phaeantha is a native species of Brazil with great potential for both the fragrance industry and ornamental cultivation. However, the propagation of this orchid through traditional methods is limited, making *in vitro* micropropagation a promising alternative. This study aims to evaluate the *in vitro* micropropagation of *Vanilla phaeantha*, with a focus on the effects of exogenous ethylene application on the viability and development of leaf and root explants. This research was carried out in June 2024, utilizing explants obtained from plants grown in the Federal University of Lavras' Botanical Garden. The explants underwent a disinfection process and were inoculated in Murashige and Skoog (MS) medium, supplemented with different ethylene concentrations (0, 15, 20, 25, and 30 ppm). The explants were cultivated under controlled temperature and continuous light. The results showed that, regardless of the explant type or ethylene concentration, all explants exhibited complete oxidation, with no callus formation, shoots, or roots. This suggests that the MS medium, although suitable for many plant species, may not be ideal for *Vanilla phaeantha* without modifications, such as the addition of antioxidants or other growth regulators. The study indicates that ethylene may not be beneficial for the *in vitro* propagation of *Vanilla phaeantha*, as its exogenous application seems to induce oxidative stress, hindering the regeneration of plant structures. In conclusion, further research is needed to optimize *in vitro* culture conditions, possibly focusing on alternative hormonal treatments and adjustments to the culture medium to improve the propagation success of this orchid species.

Keywords: Orchid; MS culture medium; Floriculture; Conservation.

1 INTRODUCTION

The genus *Vanilla* stands out not only for its unique botanical characteristics but also for its vast, yet unexplored, potential. Comprising over 120 species, many of which remain poorly studied or are not even included in commercial chains, this group of perennial vines features succulent stems, aerial and subterranean roots, as well as a unique floral structure (Karremans *et al.*, 2023). The richness of the Orchidaceae family, exemplified by species such as those in the *Vanilla* genus, highlights its biological and economic potential, which is still underexplored but full of possibilities for research and innovation (Oliveira *et al.*, 2022).

Understanding the genotypic and phenotypic diversity of the genus *Vanilla* is essential for developing strategies that promote the sustainable production of vanilla. Wild species of *Vanilla*, which have not yet been commercially exploited, represent a significant potential for responsible and environmentally balanced market introduction (Barragán-Ocaña *et al.*, 2024). The success of new crops will largely depend on the training of producers to properly manage the cultivation and processing of vanilla beans, ensuring quality. This progress is already observed in some regions of Brazil, particularly in the Midwest, where certain species of *Vanilla* are gaining recognition for their commercial value (Silva Oliveira *et al.*, 2022).

Among the *Vanilla* species native to Brazil, *Vanilla phaeantha* stands out for possessing an enzymatic structure favorable to the production of vanillin and other phenolic compounds essential for the characteristic flavor of vanilla. Studies indicate that the vanillin content of this species is comparable to that of *Vanilla planifolia*, which is widely cultivated for commercial purposes (Oliveira *et al.*, 2022; Barragán-Ocaña *et al.*, 2024). In addition to its potential for the fragrance and flavor industry, *Vanilla phaeantha* also attracts ornamental interest, being an orchid found in the phytogeographical domains of the Caatinga, Cerrado, and Atlantic Forest, with a predominant occurrence in resting areas (Barberena *et al.*, 2021).

In this context, *in vitro* cultivation techniques have been consolidating as an important biotechnological tool for both species conservation and increased vanillin production. This method enables the production of plants with broad genetic diversity in a relatively short period, while also ensuring high phytosanitary quality (Soares *et al.*, 2020). Among the various molecules used in *in vitro* cultivation, ethylene plays a key role as a plant growth regulator, potentially exerting both positive and negative

effects depending on its concentration and the developmental stage of the culture (Neves *et al.*, 2021).

This phytohormone plays a crucial role in the regulation of various physiological processes, such as germination, cellular differentiation, senescence, and stress response (Jangra *et al.*, 2023). In the *in vitro* environment, where conditions are highly controlled and ventilation is often limited, the accumulation of ethylene can become an adverse factor, compromising plant development (Pasternak & Steinmacher, 2024).

At low concentrations, ethylene can stimulate processes such as organogenesis and somatic embryogenesis, promoting the formation of shoots and adventitious roots, as well as contributing to the adaptation of plants to osmotic and oxidative stress. However, at elevated levels, this phytohormone can inhibit growth, induce hyperhydricity, and cause premature abscission of vegetative structures, compromising both regeneration and acclimatization of seedlings (Polivanova & Bedarev, 2022; Pasternak & Steinmacher, 2024). In this context, this study aims to evaluate the *in vitro* micropropagation of *Vanilla phaeantha*, with a focus on the effects of exogenous ethylene application on the viability and development of leaf and root explants.

2 MATERIALS AND METHODS

Plants of *Vanilla phaeantha* cultivated in the crowded orchidarium at the Botanical Garden of the Federal University of Lavras were identified and selected (Figure 1). From these plants, leaf and root explants were collected and subjected to micropropagation tests to evaluate their *in vitro* viability.



Figure 1. Mother plant of *Vanilla phaeantha* cultivated at the Botanical Garden of the Federal University of Lavras, from which the explants were obtained.

Leaf explants were obtained from the median portion of each leaf, with the central vein removed within a 1 cm radius. For root explants, selection occurred in regions close to the meristematic portion, with a length of 1 cm (Figures 2 and 3).

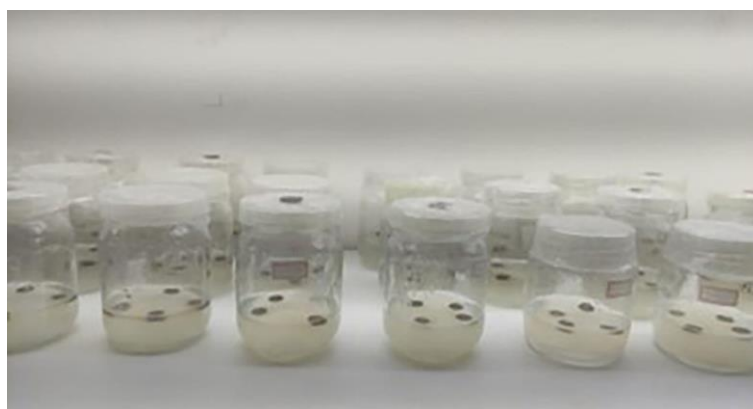


Figure 2. Leaf explants of *Vanilla phaeantha* with a 1 cm radius inoculated in MS medium with different concentrations of ethylene.

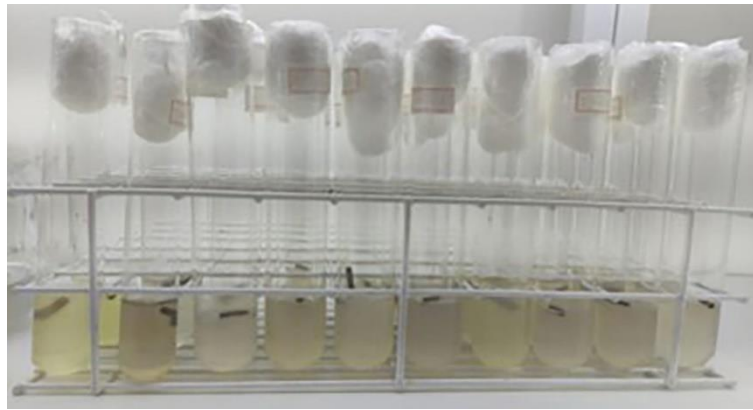


Figure 3. Root explants of *Vanilla phaeantha* with a length of 1 cm that were inoculated in MS medium with different concentrations of ethylene.

After selection, the explants were subjected to a decontamination process using 2% sodium hypochlorite for 20 minutes, followed by immersion in 70% ethanol for 10 minutes. They were then washed three times with autoclaved distilled water and subsequently inoculated into the *in vitro* culture medium.

For the composition of the *in vitro* culture medium, the MS medium (Murashige & Skoog, 1962) was used, supplemented with 6 g L⁻¹ of agar and 30 g L⁻¹ of sucrose. The pH of the medium was adjusted to 5.8, and the medium was then autoclaved to ensure sterility before the inoculation of the explants. After the medium solidified, different concentrations of ethrel were added through a sterile filter, characterizing the ethylene variation treatments (0, 15, 20, 25, and 30 ppm).

After inoculation, the bottles were transferred to a growth room with a controlled temperature of 25 °C and continuous light. The development of the explants was evaluated based on their oxidation after 30 days of *in vitro* cultivation.

The experimental design was completely randomized with a 2 x 5 factorial. Two types of explants (root and leaf) and four ethylene concentrations, along with the absence of this hormone in the medium as a negative control, were tested, with 30 repetitions per treatment. The data obtained were subjected to analysis of variance and the Skott-Knott test for mean comparison at a 5% significance level using the statistical software SISVAR (Ferreira, 2019).

3 RESULTS AND DISCUSSION

After 30 days of cultivation, oxidation was observed in 100% of the plant material in all explants, regardless of the type or concentration of ethylene tested (Figure 4). As a consequence, no callus, shoot, root, or other morphological structures, which are typically a result of *in vitro* cultivation, were formed. The oxidation of leaf and root explants of orchids cultivated in MS medium *in vitro* may be associated with a combination of endogenous and exogenous factors, which directly influence the viability and morphogenetic response of the tissues (Rathore *et al.*, 2013).

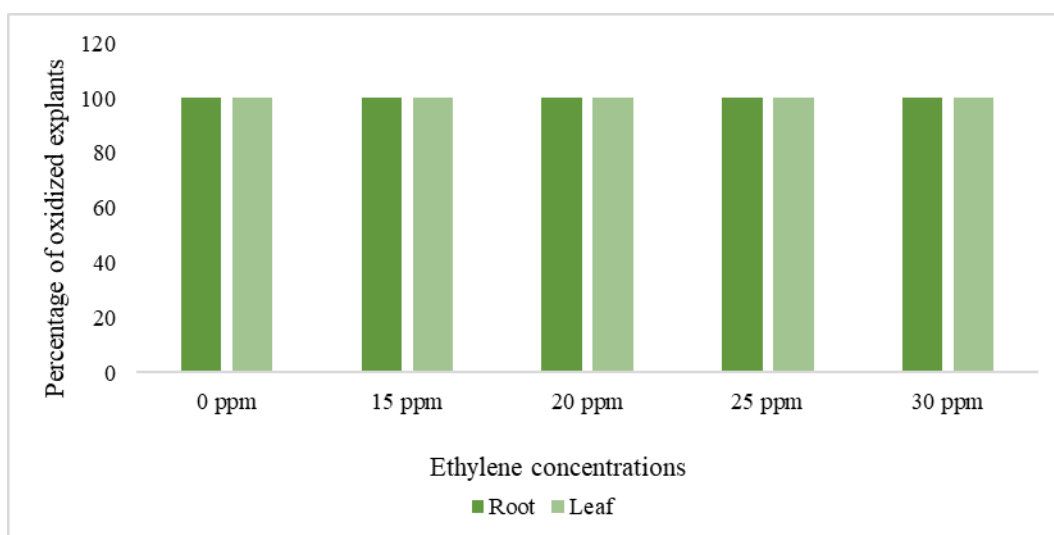


Figure 4. Percentage of oxidized root and leaf explants from *Vanilla phaeantha* orchids

Ethylene has various physiological functions in plants, such as the development of shoots, roots, calli, and other morphological structures, acting even before the formation of the plant (Ahammed *et al.*, 2020). The induction of root formation through the use of ethylene has been tested in different species, as the importance of roots in plants is to absorb nutrients and water, aiding in their growth and development. Hormones such as ethylene and auxin have proven effective in root growth through the interaction between both and other hormones involved in this process (Hu *et al.*, 2017). However, in some species such as *Arabidopsis* and rice species, the characteristics of ethylene or its precursors, such as 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), act as inhibitors of primary root

elongation when applied exogenously (Ruzicka *et al.*, 2007). Similarly, in monocot plants such as maize, wheat, and sorghum, ethylene also inhibits the formation and development of primary roots (Yang *et al.*, 2015). These studies have shown that ethylene can affect root development both by inhibiting the cells of the apical meristem and the cells in the root elongation zone (Qin & Huang, 2019), concluding that the cellular division of root morphological structures may be controversial depending on the species studied, as in some cases ethylene may be beneficial, while in others it can inhibit root growth or even cause oxidation of plant material, as was the case with the orchids in the present study.

Ethylene is naturally synthesized by plants and is known to cause senescence and abscission of leaves and flowers. It is involved in fruit ripening, contributes to both biotic and abiotic stress factors (Khan *et al.*, 2017), and regulates the expression of various genes responsible for the development of morphological tissues. With regard to leaves, ethylene induces chlorophyll loss (Koukounaras *et al.*, 2006), causing the leaves to yellow. As observed in *Vanilla phaeantha* orchids, the use of this hormone on *in vitro* leaf explants resulted in leaf oxidation, indicating that the role of exogenous ethylene in this plant structure is similar to the function of ethylene naturally produced by the plant.

Ethylene plays roles in stress signaling and the activation of metabolic pathways related to senescence and plant defense. Under normal conditions, oxidation in plant tissues occurs due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS), often associated with lipid peroxidation and the degradation of phenolic compounds (Arumugam & Panneerselvam, 2012). Exposure to ethylene may have stimulated excessive ROS production through the activation of enzymes such as peroxidase and polyphenol oxidase, which are common in tissue browning processes. Another relevant factor is the possible inhibition of endogenous antioxidants, such as catalase and superoxide dismutase, which would normally neutralize free radicals. This antioxidant system dysregulation may occur due to the sensitivity of orchid explants, which have specialized structures with low cell division rates *in vitro*, making them more susceptible to oxidative stress (Juras *et al.*, 2020). Oxidation may also have been caused by a secondary signaling cascade, such as the interaction between ethylene and other hormones like cytokinins, which also modulate stress responses (Cunha Neto *et al.*, 2025).

Initially, oxidation is often caused by the presence of phenolic compounds, which are released by plant tissues when exposed to stress or mechanical damage during the *in vitro* establishment phase. These compounds can be rapidly oxidized, resulting in the formation of products that cause the darkening of explants, which can be toxic to the cells and inhibit the formation of new structures. Furthermore, the composition of the MS culture medium, while generally favorable for the growth of many plant species, may not be ideal for orchids, which often require specific adjustments in the concentration of mineral salts, growth regulators, and antioxidant agents to prevent oxidation and promote tissue regeneration (Arumugam & Panneerselvam, 2012).

The absence of formed structures in the explants may also result from the lack of specific morphogenic factors, such as an adequate concentration of auxins and cytokinins, which are crucial for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis in orchids. Therefore, oxidation and failure in the formation of structures may indicate the need to optimize the culture medium and include antioxidant agents or adjust the concentration of growth regulators to improve the *in vitro* response of *Vanilla phaeantha* explants (Chang, 2007).

The inefficiency of ethylene in root explants showed that the response of this hormone *in vitro* can be controversial depending on the species studied, as in some species it participates in signaling pathways involving metabolism, leading to the development of primary and lateral roots (Neves *et al.*, 2024), but not in the case of *Vanilla phaeantha* orchids. This occurred because ethylene stimulates the accumulation of auxins in the meristematic zone as well as in the root elongation zone, inhibiting cell proliferation in this region, thereby impairing root formation. In the leaf explant, ethylene showed the same response as known in other species (Gepstein & Thimann, 1981), participating in senescence, chlorophyll loss, and toxicity, leading to the complete oxidation of the plant material. In species such as mustard, for example, the use of Ethephon, an ethylene-donor compound, at low concentrations induced an increase in leaf area, while at high concentrations it inhibited it (Khan, 2005; Khan *et al.*, 2008). In other words, the response to the use of this hormone depends on the concentration used, the species studied, and whether it is applied exogenously or not, as it can result in the development of plant morphological structures, senescence, or even toxicity, causing oxidation, depending on the factors mentioned.

To minimize oxidation in *in vitro* orchid cultures, strategies such as adding antioxidants (ascorbic acid or activated charcoal) to the culture medium can be employed to neutralize free radicals and adsorb phenolic compounds. Adjusting cultivation conditions, including reduced light intensity, moderate temperature, and a slightly acidic pH (5.6–5.8), may also help mitigate oxidative stress. Furthermore, the selection of young explants and pretreatment with antioxidant solutions can reduce oxidative enzyme activity (Juras *et al.*, 2020).

4 CONCLUSIONS

The present study on the micropropagation of *Vanilla phaeantha* highlighted the difficulty of *in vitro* cultivation due to the oxidation of explants, regardless of their leaf or root morphogenesis and independent of the ethylene concentration tested. The results suggest that the MS culture medium, although widely used, may not be suitable for the cultivation of *Vanilla phaeantha* without additional modifications, such as the addition of antioxidants or other growth regulators.

Future testing possibilities could include alternative culture medium formulations for *Vanilla phaeantha*, incorporating different antioxidant agents to reduce explant oxidation. Additionally, investigating the synergistic effects of growth regulators with ethylene application may yield significant insights into morphogenetic control.

5 REFERENCES

- Ahammed, G. J., Gantait, S., Mitra, M., Yang, Y., & Li, X. (2020). Role of ethylene crosstalk in seed germination and early seedling development: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.016>
- Arumugam, M., & Panneerselvam, R. (2012). Micropropagation and Phenolic exudation protocol for *Excoecaria agallocha*-an important mangrove. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S1096–S1101. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(12\)60368-2](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(12)60368-2)
- Chang, W.-C. (2007). *In vitro* Morphogenesis and Micro-Propagation of Orchids. in *Orchid Biotechnology*, 45–64. https://doi.org/10.1142/9789812775900_0003
- Cunha Neto, A. R., dos Santos Ambrósio, A., de Jesus Rodrigues Resende, A., Régis Santos, B., & Nadal, M. C. (2025). From Cell Division to Stress Tolerance: The Versatile Roles of Cytokinins in Plants. *Phyton*, 94(3). <https://doi.org/10.32604/phyton.2025.061776>
- Ferreira, D. F. (2019). SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Brazilian Journal of Biometrics*, 37(4), 529. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>
- Gepstein, S., & Thimann, K. V. (1981). The Role of Ethylene in the Senescence of Oat Leaves. *Plant Physiology*, 68(2), 349–354. <https://doi.org/10.1104/pp.68.2.349>
- Hu, Y., Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. (2017). Regulation of seedling growth by ethylene and the ethylene-auxin crosstalk. *Planta*, 245(3), 467–489. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2651-6>
- Juras, M. C. R., Purgatto, E., de Melo Ferreira, W., & Suzuki, R. M. (2020). Direct organogenesis and ethylene regulators in the cloning of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, 131, 374-379. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.010>

- Khan, N. A. (2005). The influence of exogenous ethylene on growth and photosynthesis of mustard (*Brassica juncea*) following defoliation. *Scientia Horticulturae*, 105(4), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.02.004>
- Khan, N. A., Khan, M. I. R., Ferrante, A., & Poor, P. (2017). Editorial: Ethylene: A Key Regulatory Molecule in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01782>
- Khan, N. A., Mir, M. R., Nazar, R., & Singh, S. (2008). The application of ethephon (an ethylene releaser) increases growth, photosynthesis and nitrogen accumulation in mustard (*Brassica juncea*L.) under high nitrogen levels. *Plant Biology*, 10(5), 534–538. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00054.x>
- Koukounaras, A., Siomos, A. S., & Sfakiotakis, E. (2006). 1-Methylcyclopropene prevents ethylene induced yellowing of rocket leaves. *Postharvest Biology and Technology*, 41(1), 109–111. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.01.018>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Neves, M., Correia, S., & Canhoto, J. (2024). Etileno. *Revista de Ciência Elementar*, 12(2). <https://doi.org/10.24927/rce2024.013>
- Oliveira, R. T., da Silva Oliveira, J. P., & Macedo, A. F. (2022). Vanilla beyond *Vanilla planifolia* and *Vanilla × tahitensis*: Taxonomy and Historical Notes, Reproductive Biology, and Metabolites. *Plants*, 11(23), 3311. <https://doi.org/10.3390/plants11233311>
- Qin, H., & Huang, R. (2018). Auxin Controlled by Ethylene Steers Root Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3656. <https://doi.org/10.3390/ijms19113656>
- Rathore, N. S., Rathore, N., & Shekhawat, N. S. (2013). In vitro propagation and micromorphological studies of *Cleome gynandra*: a C4 model plant closely related to *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 2691–2698. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1301-2>

Růžička K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská R., Beeckman, T., Friml J., & Benková E. (2007). Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution. *The Plant Cell*, 19(7), 2197–2212. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052126>

Silva Oliveira, J. P., Garrett, R., Bello Koblitz, M. G., & Furtado Macedo, A. (2022). Vanilla flavor: Species from the Atlantic forest as natural alternatives. *Food Chemistry*, 375, 131891. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131891>

Soares, J. S., Sorgato, J. C., & Ribeiro, L. M. (2020). Protocolo para germinação assimbiótica e desenvolvimento inicial de protocormos de orquídeas nativas do Cerrado brasileiro. *Rodriguésia*, 71. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071095>

Yang, C., Lu, X., Ma, B., Chen, S.-Y., & Zhang, J.-S. (2015). Ethylene Signaling in Rice and Arabidopsis: Conserved and Diverged Aspects. *Molecular Plant*, 8(4), 495–505. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.003>

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No primeiro experimento com a espécie *Bowdichia virgilioides*, a indução da formação de embriões somáticos com exposição de etileno foi possível com 52% de embriões formados na concentração de 20ppm em condições assépticas no escuro em BOD. Já no segundo experimento com essa espécie, as diferentes condições de cultivo, especificamente a luminosidade, com fotoperíodo de 12h, alterou significativamente a formação de embriões somáticos. Sendo que a porcentagem do controle foi superior comparado a todas as concentrações de etileno testada. Com isso, considera-se que o fator luminosidade afeta a ação do etileno diretamente na embriogênese somática em relação a formação de embriões somáticos. Assim como em outros estudos de micropropagação, os fatores ambientais em que os experimentos de estão condicionados são, geralmente, negligenciados. Esse resultado mostrou a importância da melhor compreensão desses fatores externos para o sucesso da técnica de micropropagação, em especial, da embriogênese somática. Para a formação de calos, foi observado que no primeiro experimento a concentração de 20ppm de etileno também foi a de maior sucesso, já no segundo experimento, o qual foi exposto a luminosidade, a concentração de maior formação de calos foi de 25ppm. Em relação a formação de raízes adventícias, nos dois experimentos a concentração de melhor resultado foi também de 20ppm, tendo em vista que o gene FEZ participa da rede de interações da embriogênese somática relacionada com o etileno na formação dessa estrutura morfológica. Além disso, a espécie *Bowdichia virgilioides* apresenta alta sensibilidade ao etileno para a formação de raízes adventícias, devido a análise feita no segundo experimento em que se a concentração desse hormônio for razoavelmente maior (25ppm) ou menor (15ppm) que 20ppm a formação dessa estrutura se iguala ou é inferior que o controle. A molécula de óxido nítrico impediu a formação das estruturas morfológicas avaliadas, com baixa porcentagem e menor do que o controle nas duas concentrações testadas. Esse resultado sugere que o óxido nítrico, embora conhecido por sua participação em processos como germinação e resistência a estresses, pode atuar como um inibidor da embriogênese somática nesta espécie. Uma possível explicação é que altas concentrações de óxido nítrico desencadeiam respostas antioxidantes excessivas, interferindo na divisão celular e na diferenciação embrionária. Os resultados envolvendo a espécie *Vanilla phaeantha* permitiu compreender os desafios ainda existentes na micropropagação especificamente em espécies herbáceas. A oxidação total dos explantes independente da concentração de etileno testada possibilitou compreender que essa é uma das consequências do uso desse hormônio, sendo necessário a adição de agentes antioxidantes no meio de cultivo ou até mesmo o teste de um meio alternativo e a investigação dos efeitos dos reguladores de crescimento com aplicação do etileno.

REFERÊNCIAS

ABARI, R. The prospect of physiological events associated with the micropropagation of *Eucalyptus* sp. *Forests*, **MDPI AG**, S.I, 1 nov. 2020.

ABARCA, D. Identifying molecular checkpoints for adventitious root induction: are we ready to fill the gaps? **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 12, n. March, 2021.

AGUILAR, M. Somatic embryogenesis of Arabica coffee in temporary immersion culture: advances, limitations, and perspectives for mass propagation of selected genotypes. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, Frontiers Media S.A., 6 out. 2022.

AKHTER, Z. In response to abiotic stress, DNA methylation confers epigenetic changes in plants. **Plants**, *S.I*, v. 10, n. 6, p. 1–21, 2021.

BIDDINGTON, N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, Netherlands, v. 11, n. 2, p. 173–187, 1992.

BRAMEL, P.; FREY, F. Global strategy for the conservation and use of Vanilla genetic resources. **Bonn: Global Crop Diversity Trust**, *S.I*, 2021.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S.; PASQUALI, G. ; BARRO, R. S. ES em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, Brasil, fev. 2002.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Millersville, United States, v. 50, n. 2, p. 166–175, 2014.

CARDOSO, J.C. Silver nitrate enhances in vitro development and quality of shoots of *Anthurium andraeanum*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, Netherlands, v. 253, p. 358–363, 2019.

CARVALHO, J. M. F. C. Embriogênese somática. **Campina Grande: Embrapa Algodão**, Campina Grande, Brasil, 2006. v. 1, p. 35.

CHAE, S. C.; KIM, H. H.; PARK, S. U. Ethylene inhibitors enhance shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*). **The Scientific World Journal**, *S.I*, 2012.

DE CARVALHO, P. P. In vitro organogenesis from root explants of *Passiflora miniata* Mast., an Amazonian species with ornamental potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, Brazil, v. 62, p. 1–9, 2019.

DIVAKARAN, M., BABU, K.N. Micropropagation and In Vitro Conservation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). In: Jain, S.M., Saxena, P.K. (eds) Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, United States, vol 547, 2009.

DRUEGE, U.; FRANKEN, P.; HAJIREZAEI, M. R. Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 7, p. 381, 2016.

LIAQAT, F.; LINGXIA, X.; KHAZI, M. I.; ALI, S.; RAHMAN, M. U.; ZHU, D. Extraction, purification, and applications of vanillin: A review of recent advances and challenges. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, Netherlands, Volume 204, Part B, 2023.

FRANCO, J. L.; AYRES, E. M. M.; OLIVEIRA, D.; MARTINS, I. B. A.; MACEDO, A. F.; DELIZA, R.; KOBLITZ, M. G. B. Exploring the potential of the *Vanilla* species from the Brazilian Atlantic Forest: sensory description and consumer acceptance. **Journal of Sensory Studies**, Hoboken, United States, v. 39, n. 1, 2024.

GANTAIT, S.; KUNDU, S. In vitro biotechnological approaches on *Vanilla planifolia* Andrews: advancements and opportunities. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, Germany, v. 39, n. 196, 2017.

GUPTA, K. J. On the origins of nitric oxide. **Trends in Plant Science**, Cambridge, United States, v. 16, n. 3, p. 160–168, 2011.

GUPTA, K. J. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco. **Journal of Experimental Botany**, Cary, United States, v. 64, n. 2, p. 553–568, 2013.

HYDE, P. T. The anti-ethylene growth regulator silver thiosulfate (STS) increases flower production and longevity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Growth Regulation**, New York, United States, v. 90, p. 441–453, 2020.

IWASE, A.; OHME-TAKAGI, M.; SUGIMOTO, K. WIND1: a key molecular switch for plant cell dedifferentiation. **Plant Signaling & Behavior**, Abingdon, United Kingdom, v. 6, p. 1943–1945, 2011.

JURAS, M. C. R. Direct organogenesis and ethylene regulators in the cloning of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, Amsterdam, Netherlands, v. 131, p. 374–379, 1 jul. 2020.

KANG, H. I. Comparative transcriptome analysis during developmental stages of direct somatic embryogenesis in *Tilia amurensis* Rupr. **Scientific Reports**, *S.I.*, v. 11, n. 1, 1 dez.

2021.

LI, J.; DEMESYEUX, L.; BRYM, M.; CHAMBERS, A. H. Development of species-specific molecular markers in *Vanilla* for seedling selection of hybrids. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, Netherlands, v. 47, p. 1905–1920, 2020.

LOUGHEED, E. C.; FRANKLIN, E. W. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid under nitrogen atmospheres. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, Canada, v. 50, n. 5, p. 586–587, 1970.

MEDEIROS, M. O.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; COSTA, F. H. S.; QUEIROZ, P. R. M.; ECKSTEIN, B.; SOUZA, A. L. X.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Unveiling innovations for enhancing in vitro propagation of *Vanilla phaeantha* Rchb.f. through the use of double-phase technique and temporary immersion bioreactor systems. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, Netherlands, v. 216, p. 118726, 2024.

MOHAMMADI, M. A. Advances in micropropagation, somatic embryogenesis, somatic hybridizations, genetic transformation and cryopreservation for *Passiflora* improvement. **Plant Methods**, BioMed Central Ltd., S.I, 1 dez. 2023.

OLIVEIRA, J. P. S.; GARRETT, R.; KOBLITZ, M. G. B.; MACEDO, A. F. Vanilla flavor: Species from the Atlantic Forest as natural alternatives. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 1, n. 375, p. 131891, 2022.

SAHA, N.; DUTTA, G. S. Promotion of shoot regeneration of *Swertia chirata* by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene interceptions and activation of antioxidant activity. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, Netherlands, v. 134, n. 2, p. 289–300, 1 ago. 2018.

SIMONTACCHI, M. Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne: Frontiers Research Foundation, Lausanne, Switzerland v. 6, p. 977, 2015.

ANEXO A – Carta de aceite do artigo OXIDATION AND VIABILITY OF VANILLA PHAEANTHA EXPLANTS EXPOSED TO ETHYLENE IN IN VITRO CULTIVATION pela revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas

