ORGANIZADOR:
Rafael Fernández Da Silva

Aspectos da Biotecnologia Agrícola Aplicada

MÉRIDA PUBLISHERS

ORGANIZADOR:
Rafael Fernández Da Silva

Aspectos da
Biotecnologia
Agrícola Aplicada

Canoas
2022

MÉRIDA
PUBLISHERS

Aspectos da Biotecnologia Agrícola Aplicada
© 2022 Mérida Publishers
https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-08-4

Organizador
Rafael Fernández da Silva

Adaptação da capa e desenho gráfico
Luis Miguel Guzmán

Foto da capa e contracapa
https://shutterstock.com/

Canoas - RS - Brasil
contact@meridapublishers.com
www.meridapublishers.com

Todos os direitos autorais pertencem a Mérida Publishers. A reprodução total ou parcial dos trabalhos publicados, é permitida desde que sejam atribuídos créditos aos autores.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

A838 Aspectos da biotecnologia agrícola aplicada [livro eletrônico] / Organizador Rafael Fernández da Silva. – Canoas, RS: Mérida Publishers, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
Edição bilíngue
ISBN 978-65-84548-08-4

1. Embriogênese. 2. Produtividade agrícola. 3. Biotecnologia. I.Silva, Rafael Fernández da.

CDD 630

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

CORPO EDITORIAL

Prof. Dr. Rafael Fernández da Silva

Professor Titular do Departamento de Biologia da Universidade de Carabobo, Venezuela.

Prefácio

Este livro apresenta informações pertinentes para alunos de graduação e pós-graduação interessados em formação na área de biotecnologia agrícola aplicada, bem como para pesquisadores que desejam inovar diferentes aspectos da mesma, a fim de satisfazer a crescente demanda de agroalimentos da população mundial.

Nesse sentido, este trabalho pretende ser um suporte fundamental no ditado de cursos de graduação e pós-graduação de carreiras relacionadas ao melhoramento de plantas, bem como para o desenvolvimento de estudos avançados em propagação massiva de novas variedades de plantas com características agroecologicamente importantes, aprimoramento de fertilizantes biológicos ecologicamente corretos, à base de *Trichoderma*, biocontroladores à base de *Bacillus*, além da atividade antimicrobiana de plantas como *Cyperus rotundus*.

Prof. Dr. Rafael Fernández Da Silva
Professor Titular do Departamento de Biologia
Faculdade Experimental de Ciência e Tecnologia (Facyt)
Universidade de Carabobo (UC).
Venezuela

Índice

CAPÍTULO 1 7

Secondary somatic embryogenesis and its potential biotechnological applications

Rafael Fernández Da Silva, María Daniela Artigas Ramírez, Zoraya De Guglielmo Cróquer

CAPÍTULO 2 53

Uso de bioestimulantes na produção agrícola

Luan Martin Arejano, Rafael Miritz Bartz, Thalia Strelov dos Santos, Guilherme Hirsch Ramos, Gizele Ingrid Gadotti, Maurizio Silveira Quadro

CAPÍTULO 3 73

Bioprodutos a base de *Bacillus* na agricultura: situação atual e perspectivas

Vicente Guilherme Handte, Valéria Ortaça Portela, Lisiane Sobucki, Bruno Cherobini Piovesan, Mônica Dickow Pozzobon, Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

CAPÍTULO 4 104

Avaliação da atividade antibacteriana da *Cyperus rotundus* Linn. (Cyperaceae) por meio de um sistema de análise por injeção em fluxo

Bianca de Souza Campos, Geovanna Kelly Chagas, Maria Karollyne Ferreira de Oliveira, Júlio Cezar de Jesus Silva, Viviane Gomes Bonifacio, Giuliana Muniz Vila Verde, Jonas Alves Vieira

CAPÍTULO 5 128

Efeito do uso de fertilizante organomineral e da inoculação de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento inicial de plantas jovens de *Eucalyptus grandis*

Adriana Maria Griebeler, Breno Magno Silva dos Santos, Kellin Vanessa Andriguetto, Janaine Giombelli Jachi, Gabriel Coelho Waimer, Clóvis Orlando Da Ros, Felipe Turchetto

CAPÍTULO 1

Secondary somatic embryogenesis and its potential biotechnological applications

Rafael Fernández Da Silva, María Daniela Artigas Ramírez, Zoraya De Guglielmo Cróquer

https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-08-4.c1

Abstract

Secondary somatic embryogenesis is a powerful biotechnological tool in the genetic improvement of plants. However, up to date, it has only been described in 148 species (7 Gymnosperms (G), 141 Angiosperms between 35 monocots (M) and 106 dicots (D)) in different explants, in particular zygotic embryos (G: 100%, M: 54%, D: 48%), mainly indirectly (G: 100%, M:67%, D: 66%), and asynchronous (G: 100%, M:100%, D: 96%), of unicellular origin (G: 63%, M: 63%, D: 67%); directly differentiating the secondary embryos in particular from the apical zone of higher stage primary embryos, plants regenerating in more than 90% of the species. The combination of growth regulators (single auxin, only cytokinin, or combination auxin + cytokinin) for the primary and repetitive embryogenesis stage varies with the species and explant type. However, in the second stage, the media is used without any hormones, with low auxin concentration, or increasing the cytokinin. The potential and avant-garde system used is poorly described; this review supports future research in this regard, given insights into the genetic improvements of many species with agro-ecological interest.

Keywords: *Agrobacterium*, biolistic, cyclic embryogenesis, repetitive embryogenesis, temporary immersion, unicellular origin.

1. Introduction

The system with the higher regenerative rate *in vitro* is somatic embryogenesis, and it is defined as the process in which develops a bipolar structure called embryos from a single somatic cell (without any cell fusion), being structurally and functionally identical to the derived zygotic embryo from the union of gametic cells in sexual embryogenesis. The first report was described using

Rafael Fernández Da Silva (Org.) © 2022 Mérida Publishers CC-BY 4.0

the dicotyledonous *Daucus carota* in the late 50s of the 20th century. More than 100 species have been reported (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2020). Frequently, it occurs in a larger proportion by the indirect way (presence of a transition phase called callus); it is given that exogenous hormonal stimuli must induce the competent cells. Consequently, these generate a morphogenic reprogramming for the plant's differentiation from the developed somatic embryos, and it can originate from one or more somatic cells, with subsequent implications in the genetic homogeneity of the developed plants (FEHÉR; BERNULA; GÉMES, 2016; NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2020).

A relevant aspect in the micropropagation efficiency is the synchrony of the process, which in most species is asynchronous, as somatic embryos with the same stage are not seen at the same time (WÓJCIKOWSKA; GAJ, 2016).
In some species, this regenerative process has a high cyclic capacity. It is determined by establishing two types of somatic embryogenesis, where the first one called "primary" is distinguished in the formation of somatic embryos directly from the explant or indirectly through the callus. At the same time, the "secondary" is characterized in the differentiation of new somatic embryos, generally directly on the surface of the primary embryos, and this process can be repeated in more than one cycle (PÉREZ; CHAN; SÁENZ, 2006). Thus, repetitive somatic embryogenesis reports began at the '80s ending and the beginning of the '90s of the last century. In the "solo" bibliographic revision of this topic, up to date was indicating 82 species following 10 Gymnosperms; 72 Angiosperms divided into eight monocotyledons and 64 dicotyledons (RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995).

The regenerative system through somatic embryogenesis is an efficient biotechnological tool that can be applied in the genetic improvement of different species with agro-ecological interest since it can be coupled in the processes of micropropagation and genetic engineering (LOYOLA, 2016). However, up to date, the use of the system is limited to a few species, particularly forestal ones. In this regard, the objective of this review is to detail update all the important and inherent aspects of the regenerative process and its potential applications. Furthermore, after 25 years of the first review, to support future research not only in the described species but also in others, whose resources for a human could be improved and increased by this way.

2. Conceptualization of secondary somatic embryogenesis

The somatic embryogenesis (also known as asexual or adventitious embryogenesis) consists of the development of bipolar structures (with two vegetative apices, the apical of the stem and the subapical of the root) called "embryos", from somatic cells that form the tissues. So, these cells are not the product of sexual cells fusion of gametes during fertilization, similar in sexual or zygotic embryogenesis, where the zygotic embryo is differentiated, being structurally and functionally identical in both types of embryos (LOYOLA, 2016). Comparing organogenesis and somatic embryogenesis as regenerative systems *in vitro*, the last one had the highest replicative rate in most plant species; therefore, it is frequently used in mass micropropagation and conventional or genetic engineering breeding programs (LOYOLA, 2016).

Regarding the pathway can be two types, direct and indirect. The direct pathway is characterized by the direct differentiation of somatic embryos from the explant. While the indirect is the second where the somatic embryos develop from callus (a dedifferentiated cell mass), considered a transitional phase of the regenerative process, being able to imply the appearance of genetic variations in the regenerated plants to the high rates of cell division in the callus. Thus, this can lead to mutations or permanent genetic aberrations without molecular repair mechanisms. The genetic uniformity of the variety of elite cultivars in propagation is not ensured; however, this does not occur in most cases (FEHÉR; BERNULA; GÉMES, 2016).

Furthermore, another important aspect from the point of view of plant breeding is the origin of somatic embryos, which can be unicellular or multicellular, in epidermic or sub epidermic layers of the explant or callus of embryogenic nature (QUIROZ *et al*., 2006). In the first case, the embryos are formed from a single cell, which divides anticlinally, distinguishing perfectly at the end the embryo isolated from the maternal tissue, united only by the suspensor (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Although, in the second case, the embryos are observed without suspensor and fused to the tissue that gave them origin because these were initially the product of the anticlinal cell division of more than one cell, being visualized sometimes bodies of fused embryos (HACCIUS; BHANDARI, 1975). Thus, the probability of genetic mosaicism or chimeras is

higher in the multicellular origin, not assuring the genetic homogeneity of the regenerated plants, an aspect that is feasible with the unicellular origin.

Concerning the synchronization during the differentiation of the somatic embryo, it can be synchronous or asynchronous. The synchronous is characterized for having only one type of stage observed simultaneously due to the cells that gave rise to them and divided at the same time. In contrast, the asynchronous refers to the differentiation of somatic embryos at different times, being observed simultaneously in different proportions of embryos according to the stage (WÓJCIKOWSKA; GAJ, 2016).

Regarding the cyclic capacity of somatic embryogenesis, two types can be defined as primary. Firstly, where only a series of somatic embryos are differentiated, and the second as secondary, repetitive, or cyclic, where somatic embryos are differentiated in more than one cycle, being denominated as primary to the somatic embryos that developed first from the explant or callus, and secondary to those that generally differentiate directly from the surface of the primary embryos, being able to repeat cyclically in the newest embryos (PÉREZ; CHAN; SÁENZ, 2006).

3. Cyclic somatic embryogenesis in Gymnosperms

Only seven forestal species of gymnosperms of the family Pinaceae are reported in this work. Although Raemakers *et al*. (1995) indicate ten species, after complete revision of different reports, it was determined in a conclusive and expressly way that currently, only this number of species described secondary somatic embryogenesis. Moreover, in this group of plants, only zygotic embryos were used as explant, with an indirect and asynchrony regenerative pathway at 100%, originating somatic embryos in a unicellular way in 63% of the species. In comparison, in two (25%), it was multicellular, and only in one (12%), both origins were reported (Table 1).

In the primary somatic embryo stage, where the cyclic embryogenesis occurs, 86% is torpedo and 14% in the cotyledon. While the zone of differentiation of secondary embryos was in greater degree (57%) in the hypocotyl, followed by the cotyledon (29%) and the meristem (14%), the regenerating plants (81-98%) only in 5 of the 7 species (Table 1).

Table 1. Gymnosperms with Cyclic embryogenesis somatic

SPECIES	EXPLANT REGENERATIVE VIA	ORIGIN OF THE SOMATIC EMBRYOS	PRIMARY SOMATIC EMBRYOGENESIS (PSE) AUXIN (mg/l) 2,4-D	Picloram	NAA	IAA	CYTOKININ (mg/l) BAP	K	TDZ	Z	DIFFERENTIATION ZONE AND TYPE FROM PSE TO SSE	SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS (SSE) AUXIN (mg/l) 2,4-D	Picloram	NAA	IAA	CYTOKININ (mg/l) BAP	K	TDZ	Z	PERCENTAGE OF PLANT DIFFERENTIATION FROM SSE (%)	REFERENCES
Abies numidica De Lannoy & Carrieré **(P [t])**	ZE I	M	-	-	-	-	[1]	-	-	-	A/ C[h]	-	-	-	-		-	[1]	-	90	Vooková *et al.*(2003); Vooková y Kortumák (2006)
Larix decidua x leptoeuropaea Mill. **(P [t])**	ZE I	M	[2]	-	-	-	[0,5]	-	-	-	A/ T[h]	[2]	-	-	-	[1]	-	-	-	98	Saly *et al.*(2002)
Picea abies (L.) H.Karst **(P [t])**	ZE I	U M	[2,2]	-	-	-	[1,1]	-	-	-	A/ T[h]		-	-	-	[1,8]	-	-	-	81	Nagmani *et al.* (1987); Von Arnold (1987); Mo *et al.* (1989); Mo & Von Arnold (1991)
P. glauca (Moench) Voss **(P [t])**	ZE I	U	[2,2]	-	-	-	[1,1]	-	-	-	A/ T[m]		-	-	-	[0,5]	-	-	-	0	Nagmani *et al.*(1987); Kong & Yeung (1992)
Picea glauca x engelmanni **(P [t])**	ZE I	U	[2,2]	-	-	-	[1,1]	-	-	-	A/ T[h]	[1,1]	-	-	-	[0,5]	-	-	-	0	Nagmani *et al.*(1987); Eatsman *et al.*(1991)
Pinus pinaster Ait. **(P [t])**	ZE I	U	[0,5]	-	-	-	[0,5]	-	-	-	A/ T[e]	[2]	-	-	-	[1]	-	-	-	90	Klimaszewska *et al.*(2009)
Pseudotsuga menziesii (Mirb.) **(P [t])**	ZE I	U	[0,5]	-	-	-	[0,5]	-	-	-	A/ T[e]	[2]	-	-	-	[1]	-	-	-	98	Lelu *et al.*(2018)

FAMILY. (P): Pinaceae. **HABIT.** (**[t]**): tree. **EXPLANT. ZE**: zygotic embryo. **REGENERATIVE VIA**. **D**: direct; **I**: Indirect. **ORIGIN OF THE SOMATIC EMBRYOS.** (**U**): unicellular; (**M**): multicellular. **SOMATIC EMBRYO**. **PSE**: primary; **ESS**: secondary. **DIFFERENTIATION TYPE PSE TO SSE**. **G**; globular; **T**: torpedo; **C**: cotyledonal. **SYNCHRONIC OF THE SSE.** (**SIN**). **S**: Synchronic; **A**: asynchrony. **DIFFERENTIATION ZONE PSE TO SSE.** (**[r]**): root; (**[h]**): hypocotyl; (**[e]**): epicotyl; (**[m]**): meristem. **AUXINS. 2,4-D:** 2,4-dichlophenoxyacetic**; PICLORAM:** 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid**; NAA:** 1-naphthaleneacetic acid; **IAA:** indole-acetic acid. **CYTOKININS: BAP**: 6-benzyl-amino purine**; K:** 6-furfuryaminopurinre or Kinetin; **TDZ**: thidiazurom; **Z**: zeatin.

Accordingly, the relationship of growth regulators in primary and secondary somatic embryogenesis (Table 1), it was found that only in *Abies numidica* was used cytokinins, in the primary (BAP) and the secondary (TDZ),

while in the rest of the species (86%) used in the primary, auxin plus cytokinin (2,4-D+ BAP), but in the secondary in two species (29%; *Picea abies* and *Picea glauca*) was induced only with cytokinin (BAP). On the contrary, the remaining five species (71%) were induced by combining auxin and cytokinin (2,4-D+BAP). Secondary embryo maturation is another important aspect prior to the regeneration, which is achieved mostly with the growth substances used in the cyclic embryogenesis phase. However, it is used at that stage 10 mg/L of ABA, 3% maltose, and 10% polyethylene glycol for *Abies numidica* (VOOKOVÁ; MATUSOVÁ; KORMUTÁK, 2003). In this sense, in *Pseudotsuga menziesii*, ABA is used as the only hormonal inducer that increases the secondary embryogenic frequency by 62% using 10.5 mg/l of it (WALTHER; WAGNER; RASCHKE, 2022).

4. Cyclic somatic embryogenesis in Angiosperms: monocotyledons group

In the bibliographic review carried out by Raemakers *et al*. (1995), eight species of monocotyledons with herbaceous habit were indicated, 25 years later in this work, 35 species with repetitive somatic embryogenesis were reported, 86% herbaceous and 14% tree (palms), being 37% grasses, 14% palms (tree-like), 14% muses, 9% orchids, and the remaining 9 (26%) species of different families (Table 2).

The most used explant was the zygotic embryo (48%), followed by the inflorescence (15%) and then leaf (13%), with the indirect regenerative way in 68% of the species. The only way found in anther, inflorescence, ovary, corm, stem, and cotyledon, while the direct way was found exclusively in the meristem, unlike both ways was described in zygotic embryos and leaves. Likewise, the differentiation of somatic embryos was asynchronous, originating unicellular in 58% of the species, multicellular in 8 (20%) and four (10%) with both origins (Table 2).

On the other hand, the type of primary somatic embryo where cyclic embryogenesis occurs, globular is 94% and 3% for cotyledonary and 3% torpedo, differentiating 100% of the secondary embryos in the apex zone, regenerating plants in all species, in more than 70% in 24 of them (Table 2).

Table 2. Cyclic Somatic Embryogenesis in Angiosperms species (monocotyledons)

Table 2. Cyclic Somatic Embryogenesis in Angiosperms species (monocotyledons)

SPECIES	EXPLANT	REGENERATIVE VIA	ORIGIN OF THE SOMATIC EMBRYOS	PRIMARY SOMATIC EMBRYOGENESIS (PSE) AUXIN (mg/l) 2,4-D	PICLORAM	NAA	IAA	CYTOKININ (mg/l) BAP	K	TDZ	2-IP	DIFFERENTIATION ZONE AND TYPE FROM PSE TO SSE	SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS (SSE) AUXIN (mg/l) 2,4-D	PICLORAM	NAA	IAA	CYTOKININ (mg/l) BAP	K	TDZ	Z*/2IP[a]	PERCENTAGE OF PLANT DIFFERENTIATION FROM SSE (%)	REFERENCES
Allium cepa L. **(A[h])**	ZE	I	M	2	-	-	-	-	-	-	-	A/G*	2	-	-	-	-	0,5	-	-	70	Saker (1997); Fereol *et al.*(2002)
Avena sativa L. **(P[h])**	ZE	D	U	1,8	-	-	-	0,5	-	-	-	A/G*	-	-	-	-	25	-	-	-	20	Eudes *et al.*(2003); Borji *et al.*(2018)
Asparagus officinalis L. **(As[h])**	A	I	U	1	-	0,1	-	-	0,2	-	-	A/G*	-	-	0,1	-	-	0,5	-	-	100	Feng & Wolyn (1993); Li & Wolyn (1996)
Alstroemeria L. **(Al[h])**	ZE	I	U	4	-	-	-	1	-	-	-	A/G*	1	-	-	-	0,5	-	-	-	85	Schaik *et al.*(1998)
Baloskion tetraphyllum (Labill.) B.G.Briggs & L.A.S. Johnson **(R[h])**	C	I	M	0,2	-	-	-	-	-	-	-	A/G*	0,2	-	-	-	-	-	-	-	100	Panaia *et al.*(2004; 2011);
Bactris gasipaes Kunth **(Ar[t])**	ZE	I	M	-	2,4	-	-	-	-	-	-	A/G*	-	-	-	-	-	-	-	-	86	Steinmacher *et al.*(2007); Steinmacher *et al.*(2011)
Cocus nucifera (L.) **(Ar[t])**	ZE	I	M	13	-	-	-	-	-	-	-	A/G*	1,3	-	-	-	6,8	-	-	-	82	Pérez-Núñez *et al.*(2006)
Cynodon dactylon x Cynodon transvaalensis **(P[h])**	I	I		1	-	-	-	0,01		-	-	A/G*	-	-	-	-	1	-	-	-	100	Li & Qu (2002b)
Dactylis glomerata L. **(P[h])**	L O	D I	U	-	6,7	-	-	-	-	-	-	A/G*	-	6,7	-	-	-	-	-	-	100 75	Conger *et al.*(1983); Sonstad y Conger (1986); Trigiano *et al.*(1989);
Dendrobium sp Sw. **(O[h])**	L	D	M	-	-	-	-	-	-	4		A/G*	-	-	-	-	-	-	0,2	-	25	Chung *et al.*(2005; 2007)
Elaeis quineensis Jacq. **(Ar[t])**	ZE L	I	U	-	25 1	-	-	-	-	-	3	A/G*	0,01	-	-	-	-	-	-	-	59-75	Rajesh *et al.*(2003) Te-chato & Hilae (2007); Inpuay & Te-chato (2012)
Euterpe precatoria **(Ar[t])**	ZE	I	U	-	4	-	-	-	-	-	0,8	A/T[h]	-	-	0,1	-	-	-	-	4b	93	Barbosa *et al.*, 2022
Gladiolus x grandiflorus **(I[h])**	CO	I	U M	2	-	-	-	-	-	-	-	A/G*	-	-	-	-	1,1	-	-	0,1 a	100	Remotti (1995)
Hordeum vulgare L. **(P[h])**	ZE	D I	U M	1,8	4	-	-	0,5	-	-	-	A/G*	-	-	-	-	25	-	-	-	100	Eudes *et al.*(2003) Ryschka *et al.*(1991); Kachhwaha *et al.*(1997)
Lepidosperma drummondii Benth. **(C[h])**	ZE	I	M	0,2	-	-	-	-	-	-	-	A/G*	0,2	-	-	-	-	-	-	-	100	Panaia *et al.*(2011)

Musa beccarii N.W.Simmonds **(M[h])**	I	I	U	-	40	0,2	0,2	-	-	-	-	A/ G*	20	-	-	-	-	-	-	-	57	Natarajan *et al.*(2020)
Musa laterita Cheesman. **(M[h])**	I	I	U	-	40	0,2	0,2	-	-	-	-	A/ G*	20	-	-	-	-	-	-	-	40	Natarajan *et al.*(2020)
Musa paradisiaca L. **(M[h])**	BR	I	U	-	-	-	-	-	-	1	-	A/ G*	-	-	-	-	-	-	-	-	100	Smitha et al. (2021)
Musa velutina H. Wendl. & Drude **(M[h])**	I	I	U	-	40	0,2	0,2	-	-	-	-	A/ G*	20	-	-	-	-	-	-	-	47	Natarajan *et al.*(2020)
Musa spp. L. **(M[h])**	I M	I D	U	4 1	-	1	1 0,2	 25	-	-	-	A/ G*	-	-	-	-	5	-	-	-	57 100 81	Khalil et al.(2002) Escalant *et al.*(1994) Smitha *et al.*(2020) Ramírez & de García (2009)
Narcissus sp L. **(A[h])**	O	I	M	28 28	-	-	-	1,1 1,1	-	-	-	A/ G*	 28	-	0,5	-	1,1 1,1	-	-	-	100	Mujib *et al.*(2013) Malik (2008) Malik & Bach (2017)
Oncidium cv. Gower *Ramsey* & cv. Sweet Sugar **(O[h])**	L	D	U	-	-	-	-	-	-	1	-	A/ G*	-	-	-	-	-	-	1	-	50	Cheng & Hong (2012)
Oryza sativa L. **(P[h])**	A	I	U	1	-	2	-	-	-	-	-	A/ G*	-	-	1	-	-	0,5	-	-	90	Jones & Thomas (1989); Datta *et al.*(1990)
Panicum máximum (Jacq.) **(P[h])**	ZE I	I	U	1	-	-	-	-	-	-	-	A/ G*	-	-	-	-	-	-	-	-	100	Lu & Vasil (1981); Lu & Vasil (1985)
Paris polyphylla Sm.**(Me[h])**	ZE	D	U		-	-	-	-	-	-	-	A/ C*	-	-	-	-	-	-	-	-	95	Raomani *et al.*(2014)
Pennisetum americanum L.R.Br. **(P[h])**	ZE	I	U	2,5	-	-	-	-	-	-	-	A/ G*	-	-	-	-	-	-	-	-	100	Vasil & Vasil (1981); Vasil & Vasil (1982)
Paphiopedilum niveum (Rchb.f.) Stein **(O[h])**	ZE	I	M	-	-	0,1	-	-	-	0,5	-	A/ G*	-	-	0,1	-	-	-	0,5	-	68	Soonthornkalump *et al.*(2019)
Phoenix dactylifera L. **(Ar[t])**	L	I	M U	10	-	-	-	-	-	-	-	A/ G*	0,1	-	-	-	-	-	-	-	90	Othmani *et al.*(2018) Sané *et al.*(2006)
Secale cereale (L.) M.Bieb. **(P[h])**	ZE	D	U	1.8	-	-	-	0,5	-	-	-	A/ G*	-	-	-	-	25	-	-	-	10	Eudes *et al.*(2003)
Triticum aestivum L. **(P[h])**	ZE	D I	M U	1.8 1	-	-	-	0,5	- 0,5	-	-	A/ G* G*	- 0,5	-	-	-	25	-	-	-	100 8,3	Eudes *et al.*(2003) Ryschka *et al.*(1991) Wu *et al.*(2005)
Triticum durum L. **(P[h])**	ZE	D	U	1.8	-	-	-	0,5	-	-	-	A/ G*	-	-	-	-	25	-	-	-	100	Eudes *et al.*(2003) Fernandez *et al.*(1999)
Triticum monococum L. **(P[h])**	ZE	D	U	1.8	-	-	-	0,5	-	-	-	A/ G*	-	-	-	-	25	-	-	-	100	Eudes *et al.*(2003) Miroshnichenko *et al.*(2017)
Triticum urartu Thumanjan & Gandilyan **(P[h])**	ZE	D	U	1.8	-	-	-	0,5	-	-	-	A/ G*	-	-	-	-	25	-	-	-	100	Eudes *et al.*(2003)
Zea mays L. **(P[h])**	ZE M *Zingiber officinale* Rosc. **(Z[h])**	I D S I	U U	2 0,5 2	-	-	-	 2 -	-	-	-	A/ G* A/ G*	 0,5 -	-	-	-	2 2 2	-	-	-	80 100	Lupotto & Lusardi (1988) Lincy *et al.*(2009)

FAMILY. (A): Amaryllidaceae**; (Ar):** Arecaceae; **(Al):** Alstroemeriaceae; **(As):** Asparagaceae; **(C):** Cyperaceae**; (I):** Iridaceae; **(M):** Musaceae; **(Me):** Melanthiaceae; **(O):** Orchidaceae; **(P):** Poaceae; (**R**): Restionaceae; **(Z):** Zyngiberaceae**. HABIT.** (ᵗ): tree; (ʰ): herbaceus**. EXPLANT. A:** Anther; **BR**: Male flower bract; **C:** Coleoptile; **CO**: Cormo; **I**: Inflorescence; **L**: leaf; **O**: Ovary; **M**: Meristem; **S: Stem; ZC**: zygotic embryo. **VIA REGENERATIVA**. **D**: direct; **I**: Indirect. **ORIGIN OF THE SOMATIC EMBRYOS.** (**U**): unicellular; (**M**): multicellular. **SOMATIC EMBRYO**. **PSE**: primary; **SSE**: secondary. **SYNCHRONIC OF THE SSE.** (**SIN**). **S**: synchronic; **A**: asynchrony. **DIFFERENTIATION TYPE PSE TO SSE. G**; globular; **T**: torpedo; **C**: cotyledonal. **DIFFERENTIATION ZONE PSE TO SSE. b:** base; **a:** apex. **AUXINS. 2,4-D:** 2,4-dichlophenoxyacetic**; PICLORAM:** 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid**; NAA:** 1-naphthaleneacetic acid; **IAA:** indole-acetic acid. **CYTOKININS: BAP**: 6-benzyl-amino purine**; K:** 6-furfuryaminopurinre or Kinetin; **TDZ**: thidiazurom; **2-IP**: 2-isopentenyl adenine; **Z**: zeatin.

In relation to the combination of growth regulators in primary and secondary somatic embryogenesis (Table 2), it was found only in zygotic embryos, the induction media for primary embryogenesis were devoid of growth

promoters in 5% of the cases, being used mostly only auxin (11% with Picloram; 32% with 2,4-D) or auxin plus cytokinin (47% with 2,4-D+ BAP; 11% with Picloram + 2-IP; 5% with ANA+ TDZ) similar trend in anther (50% with 2,4-D+ ANA; 50% with 2,4-D+ ANA+K), inflorescence (17% with 2,4-D; 17% with 2,4-D+ANA+AIA; 50% with Picloram+ANA+AIA; 17% with 2,4-D+ BAP) and ovule (50% with Picloram 50% with 2,4-D+ BAP), using only auxin (2,4-D) in corm, stem and cotyledon (100%), auxin plus cytokinin (2,4-D+ BAP) in meristem (100%) and in leaf segments with auxin (33% with 2,4-D; 67% with Picloram) or cytokinin (100%: TDZ). On the other hand, in the secondary embryogenesis induction medium, the absence of growth regulators was observed from 21% in zygotic embryos, 17% in inflorescences, while the cases with only cytokinin were 36% in zygotic embryos (BAP), 20% in leaves (TDZ), 33% in inflorescences (BAP), 50% in meristem (BAP) and 100% in corm (BAP) and stem (BAP), additionally the use of only auxin was reported in coleoptile (100% with 2,4-D), and leaf (40% with 2,4-D; 20% with Picloram), decreasing the use of only auxin and auxin plus cytokinin in zygotic embryos (5% with 2,4-D+ K; 11% with ANA+TDZ; 16% with 2,4-D+ BAP) and ovules (50% with Picloram; 50% with 2,4- D+ ANA+ BAP).

Furthermore, in the secondary somatic embryogenesis phase of Asparagus officinalis, other growth regulators, such as ABA and acymidol, increase the frequency of repetitive embryos. In this order, ABA (0.5 mg/L) increases from 77 to 95%, while acymidol (0.2 mg/L) increases from 99 to 101%, being better this last substance for this process (LI; WOLYN, 1996). Similarly, the concentration and type of carbon source affect the degree of differentiation of secondary embryos, where 6% sucrose increases up to 61% and 0.2 M Mannitol 78% in Elaeis quineensis (TE-CHATO; HILAE, 2007).

The maturation of secondary embryos, before their regeneration, is achieved in the medium of differentiation of the same. However, in some cases, other growth substances are additionally used, such as 0.5 mg/L GA3 in *Paris polyphylla* (RAOMANI; KUMARIA;TANDON, 2014), NAA 0.1 mg/L and 0.75 mg/L ancimidol in *Asparagus officinalis* (LI; WOLYN, 1996) or without growth regulators in MS medium in *E. quineensis* (TE-CHATO; HILAE, 2007).

5. Cyclic somatic embryogenesis in angiosperms: dicotyledonous group

The only preceding bibliographic compilation of 64 dicotyledonous species with secondary somatic embryogenesis was done by Raemakers *et al*. (1995), while this work reports 106 species, 39 herbaceous, and 67 trees, distributed into 44 families (Table 3).

Independently of the species habits, 16 different explants were used. The intact zygotic embryo represents 42%, followed by leaves with 19%, cotyledon with 9%, anther with 6%, inflorescences with 5%, nucellus with 2%, a zygotic embryo without meristem with 2%, and the remaining ones (corm, petiole, petale, pistils, meristem, microspore, stem and root) with 1% each; these explants regenerated exclusively by the direct way with meristems and microspores, and by the indirect way only with segments of corm, inflorescences, petiole and stem, and by both ways in anthers (D: 33%; I: 67%), cotyledon (D:40%; I:50%; both: 10%), intact zygotic embryos (D: 39%, I:54%; both: 7%), zygotic embryos without meristems (D: 50%; I: 50%), root (D: 67%; I: 33%) and nucellus (D: 33.3%; I: 33.3%; both: 33.3%). Correspondingly, the differentiation of somatic embryos was asynchronous in 96% of the species, originating unicellular in 62% of the species, multicellular in 26 (25%) and 14 (13%) with both origins.

The differentiation of secondary somatic embryos was presented in primary somatic embryos torpedo type in 88% of the species, followed by the cotyledonary (10%) and globular (2%), mostly (80%) in the hypocotyl zone and to a lesser extent in the root (18%), apex (2%) and epicotyl (1%), regenerating plants in 96 out of the 106 species (Table 3).

Regarding the combination of plant growth regulators in the primary and secondary somatic embryo induction media (Table 3), it was found only with intact zygotic embryos, the use of media lacking growth substances for primary embryogenesis in 13% of herbaceous species and 4% of forestal species, using mostly only auxin (29% with 2,4-D; 11% with ANA; 3% with IBA), cytokinin alone (11%: BAP), or auxin plus cytokinin (29% with 2,4-D+BAP or K; 18% with ANA+BAP, 8% AIB+BAP, 5% AIB+ K, 3% AIA+BAP, 3% AIB+2-IP, 3% AIB+BAP+K, 3% 2,4-D +2-IP; 3% with AIA+DPU), as well as in stem sections (11% with 2,4-D; 11% with BAP, K, 2-IP or Z; 11% with 2,4-D +BAP; 22% with ANA+BAP; 11% with ANA+BAP+K), using only auxin (100%: 2,4-D) or cytokinin (100%: K) in zygotic embryos without meristem, also using only cytokinin or auxin

plus cytokinin in corm (50%: BAP+Z; 50%: 2,4-D+Z), cotyledon (9% with TDZ; 9% with 2,4-D; 45% with 2,4- D+BAP; 9% with AIB+BAP; 19% with AIB+ K; 9% with AIB+ BAP+K) and meristem (50% with BAP; 50%: 2,4-D+BAP), while using auxin plus cytokinin in microspore, petale (100%: 2 ,4-D+K), petiole, pistiles (100%: 2,4-D+BAP) and finally with media with only auxin or auxin plus cytokinin in anther (11,1% with ANA; 55.6% with 2,4-D+BAP ; 22.2% with ANA+BAP; 11,1% with 2,4-D+BAP+K), inflorescence (28.6% with 2,4-D; 28.6% with 2, 4-D+BAP; 14.3% with 2,4-D+K; 14.3% with 2,4-D+DPU; 14.3% with AIB+BAP+K), nucellus (33% with 2,4-D; 67% with 2,4-D+BAP), leaf (15.4% with 2,4-D; 3.8% with IBA or Picloram, 30.8% with 2,4-D+BAP, 23.2% with 2,4-D+ K, 3.8% with 2,4-D+ TDZ or DPU, 3.8% with 2,4-D+ NAA+ K, 15.4% with ANA+BAP, 3.8% with AIB+ BAP) and root (33.3%: AIB; ANA+BAP; AIB+K).

The induction in the cyclic embryogenesis, it is detailed that increasing in the use of medium devoid of growth promoters in 23% of herbaceous species and from 19% in the tree or forestal species, using intact zygotic embryos, as well as when using zygotic embryos without meristem (100%), petal (100%), cotyledon (25%), leaf (19%) and anther (12,5%). In media with hormones, in anther (13% with ANA; 38% with ANA+BAP; 13% with 2,4-D+BAP+ K; 13% with ANA+AIB+Z), only cytokinin and auxin plus cytokinin in corm (50%: BAP+Z ; 50%: ANA+BAP), inflorescence (28% with BAP; 14% with K; 14% with Z; 14% with 2,4-D+BAP; 14% with 2,4-D+BAP +TDZ) and nucellus (67% with BAP; 33% with ANA+BAP+K), auxin alone, cytokinin alone, and auxin plus cytokinin in intact zygotic embryos (10% with 2,4-D or ANA; 4% with AIA; 2% with ANA+AIA+AIB; 15% with BAP; 4% with K; 8% with ANA+BAP; 4% with AIB+BAP; 2% with AIB+Z; 2% with AIA+BAP or K; 8% with 2,4-D+BAP; 2% with 2,4-D+Z; 2% with Picloram+BAP), leaf (4% with 2,4-D, ANA or AIB; 12% with Picloram; 4%with K, 12% with BAP, 4%with ANA+BAP, 4%with AIB+BAP or Z, 4% with 2,4-D+ANA+K; 4% with 2,4-D+DPU, SA, TDZ or SA, 8% with 2,4-D+K; 12% with 2,4-D+BAP), cotyledon (8.3% with AIA or 2,4-D; 8.3% with BAP; 8.3% with AIB+BAP; 17% with AIB+K; 8.3% with AIB+BAP+K; 8.3% with 2,4-D+BAP; 8.3% with 2,4-D+BAP+K), stem (12.5% with ANA or 2,4-D; 25% with 2-IP; 25% with ANA+BAP).

On the other hand, some species in the differentiation stage of secondary somatic embryos used another growth regulator such as ABA, which increases

the rate of cyclic embryogenesis. Thus from primary cotyledonary embryos, secondary somatic embryos increase by 73% in *Aralia cordata* with 0.2 mg/L (LEE; LEE; SOH, 1998) and by 87.5% with 3 mg/L in *Calliandra tweedii* (HEIKRUJAMA *et al*., 2014), 100% with 0.03 to 0.3 mg/L in *Daucus carota* (OGATA *et al*., 2005), or improving their morphology with 0.01 mg/L in *Aesculus hippocastanum* (CÁLIĆ; DEVRNJA; MILOJEVIĆ, 2012).

Similarly, another substance is AgNO3 at 6.7 mg/L that influences the cyclic embryogenesis rate by increasing 90% in Coffea canephora (KUMAR; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2007), as well as the action of 0.1% activated carbon in *Sorbus pohuashanensis*, where it increases by 60.5% (YANG *et al*., 2012a). Furthermore, the concentration and type of carbon source affect the degree of secondary embryo differentiation, where 6% sucrose increases by 80 and 100% respectively in *Chrysanthemum indicum* (NAING *et al*., 2013) and Morus alba (AGARWAL *et al*., 2004), as well as in *Q. suber*, which increases by 100% when using 4% of this disaccharide or 3% glucose (BENALI; LAMARTI, 2019). Similarly, it increases by 100% in *Ocotea catharinensis* when using 0.5 M Mannitol (SANTA CATARINA *et al*., 2004). Finally, in *Q. suber*, the use of amino acids increases the secondary embryogenic rate by 80% with 438.3 mg/L of L-Glutamine and 73% with 396.3 mg/L of L-Asparagine (RAHMOUNI *et al*., 2020); however, when using a lower concentration (30 mg/L) of L-Glutamine the increase was 35%, while when using 30 mg/L of Casein hydrolysate the increase was 36% (ALI; AHMAD, 2021).

Other factors of *in vitro* culture that influence the development of repetitive embryos in some species are temperature and pH. Thus, in *Hovenia dulcis*, a maximum of 66.7% is obtained at 30°C; however, 20°C is optimum for the development of cotyledonary embryos and their conversion into plants (YANG *et al*., 2013). It increases from 70 to 84% at pH 3.5-5 in *Albizia lebbeck* (SAEED; SHAHZAD, 2015) or to 100% at pH 7 in Glycine max (SANTAREM *et al*., 1997). While in the case of light, 16 h of photoperiod improved the plant regeneration by 35% in *Olea europaea* (MAZRI; NACIRI; BELKOURA, 2020).

Furthermore, related to the secondary embryo maturation prior to their regeneration, is achieved simultaneously at the differentiation stage. Regardless, in some species, other growth substances are used, such as GA_3, in *Satalum album* at 0.5 mg/L (RAI; MCCOMB, 2002), in *Carthamus tinctorius* at 0.3 mg/L

(KUMAR; KUMARI; CASTAÑO, 2008) and 1 mg/L (KUMAR; KUMARI, 2010) and 0.1 mg/L in Olea europaea (MAZRI; NACIRI; BELKOURA, 2020). Similarly, ABA is used at 1 mg/L in *Rosa hybrida* (LI *et al*., 2002) and 0.5 mg/L in *Cinnamomum camphora* (SHIN *et al*., 2010) and *Cyclamen persicum* (YOU *et al*., 2011). In addition, MS salts were at 1/2 in *Dianthus caryophyllus* (KARAMI; DELJOU; KARIMI, 2008) *Rosa hybrida* (BAO *et al*., 2012), or to 1/3 *Panax ginseng* (KIM *et al*., 2012).

On the other hand, the increase in the number of cycles of secondary somatic embryos increases the obtaining of genetically stable plants, as was found in *Hevea brasiliensis*, evaluating the number of chromosomes and the variation rate of EST-SSRs loci, showed the chromosome number of the regenerated plants was similar to the mother tree and the rate of EST-SSRs was considered low (2.61%), fundamentally due to the unicellular origin of somatic embryos, according to the study of Wang *et al*. (2017).

Finally, the culture time in the medium significantly influences the greater number of secondary somatic embryos, according to Montoya *et al*. (2022) in *Theobroma cacao*, obtaining an average of 15.2 cyclic embryos per primary somatic embryo (globular and cotyledonary stage), in a medium without hormones after 30 days of culture, decreasing at longer incubation times (40 to 80 days).

Table 3. Cyclic Somatic Embryogenesis in Angiosperms species (dicotyledonous)

SPECIES	EXPLANT	REGENERATIVE VIA	ORIGIN OF THE SOMATIC EMBRYOS	PRIMARY SOMATIC EMBRYOGENESIS (PSE) AUXIN (mg/l) 2,4-D	Picloram	NAA	IAA+IAB[a]	CYTOKININ (mg/l) BAP	K	TDZ	Z+2IP+/DPU[c]	DIFFERENTIATION ZONE AND TYPE FROM PSE TO SSE	SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS (SSE) AUXIN (mg/l) 2,4-D	Picloram	NAA	IAA+IAB[a]	CYTOKININ (mg/l) BAP	K	TDZ	Z+2IP+/AS+/ DPU[c]	PERCENTAGE OF PLANT DIFFERENTIATION FROM SSE (%)	REFERENCES
Albizia lebbeck (L.) Benth **(F[t])**	S	I	U	-	-	-	-	-	2,8	-	-	A/ T[h]	-	-	0,6	-	-	-	-	-	42	Saeed & Shahzad (2015)
Acanthopanax senticosus (Rupr. et Maxim) Harms **(Ar[t])**	ZE	D	M	0,5 0,5	-	-	-	-	-	-	-	A/ T[he]	-	-	0,2	-	-	-	-	0,5 *	75 -	Gui *et al.*(1991) Xing *et al.*(2006)
Aesculus carnea Hayne. **(S[t])**	A	I	M	1	-	-	-	1		-	-	A/ T[hr]	-	-	-	-	2	-	-	-	99	Zdravković *et al.*(2008)
Aesculus hippocastanum L. **(S[t])**	ZE A	D I	U M	-	-	1 1	-	10	-	-	-	A/ T[h]	-	-	1	-	0,5	-	-	-	1	Kiss *et al.*(1992) Radojević *et al.*(1978); Troch *et al.*(2009)
Akebia trifoliata Dcne. **(La[t])**	ZE	D	U	-	-	-	-	-	-	-	-	A/ T[r]	-	-	-	-	-	-	-	-	95	Zou *et al.*(2019)
Alyssum borzaeanum Nyar. **(B[h])**	ZE	I	M	1	-	-	-	-	0,1	-	-	A/ T[r]	2,5	-	-	-	-	-	-	-	100	Păunescu (2008)
Apium graveolens L. **(Ap[h])**	L I	I	U M	0,5	-	-	-	0,2	-	-	-	A/ T[h]	-	-	-	-	-	0,5	-	-	100	Nadel *et al.*(1989;1990)
Arachis hypogaea L. **(F[h])**	L	I	M	40	-	-	-	-	0,2	-	-	A/ T[h]	5	-	-	-	-	0,2	-	-	14 90	Baker & Wetztein (1992) Durham & Parrot (1992) Baker & Wetztein (1995)
	ZE			40 40									20								45	Chengalrayan *et al.*(2001)
A. paraguariensis Chodat & Hassl. **(F[h])**	ZE	I	M	0,5	-	-	-	-	0,01	-	-	A/ G[a]	-	-	-	-	0,5	-	-	-	100	Sellars *et al.*(1990)
Aralia cordata Thunb **(Ar[t])**	I	I	M	1,5	-	-	-	-	-	-	-	A/ T[h]	-	-	-	-	-	-	-	-	73	Lee *et al.*(1998)
Aralia elata Seem **(Ar[t])**	L	I	M	-	-	-	3[b]	-	-	-	-	A/ T[h]	-	-	-	3[b]	-	-	-	-	100	Dai *et al.*(2011)
Azadirachta indica A. Juss **(Me[t])**	ZE	I	U M	-	-	-	0,08*	0,22	-		-	A/	-	-	-		-	-	-	-	100	Chatuverdi *et al.*(2004) Singh & Chaturvedi (2009)
	C	D I								0,02 0,02		T[h]				1*					10 33	Artigas & Fernandez (2015;2018)

Beta vulgaris L. (**A^{h}**)	ZE	I	U M	-	-	1	-	-	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	-	0,1	-	-	61	Tenning *et al.*(1992) Zhang *et al.*(2008)
Bixa Orellana L. (**Bi^{t}**)	ZE	I	U	-	-	0,01	-	0,1	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	0,01	-	0,1	-	-	-	100	Parimalan *et al.*(2010)
Brassica campestris L.	ZE	D	M	0,02	-	-	-	-	0,002	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	0,05	-	-	-	100	Maheswaran &Williams (1986)
B. napus L. (**B^{h}**)	A ZE MI	D	U	0,02	-	1	-	0,5	0,002	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	0,05	-	-	0,2 a	100 75	Thomas *et al.*(1976) Pretova & Williams (1986) Koh & Loh (2000)
B. juncea (L.) Vassilii Matveievitch Czernajew (**B^{h}**)	A	D	U	-	-	0,1	-	-	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	0,1	-	2	-	-		100	Prabhudesai & Bhaskaran (1993)
B. oleracea L. (**B^{h}**)	ZE R	D I	M U	- 1	-	-	0,05*	-	0,5	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	0,2 b	100 83 60	Ćosić *et al.*(2013) Pavlović *et al.*(2013) Shamari *et al.*(2018)
Calliandra tweedii (Benth.) (**F^{t}**)	S	I	U	-	-	-	-	-	-	-	0,2 b	A/ C^{fs}	-	-	-	-	-	-	-	0,2 b	70	Heikrujama *et al.*(2014)
Camelia japonica L. (**T^{t}**)	ZE R	D	M	-	-	-	1b	-	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	0,1 b	0,1	-	-	-	72	Vieitez & Barciela (1990)
C. reticulata Lindl. (**T^{t}**)	ZE	D	M	-	-	-	0,5 b	0,1	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	Plata & Vieitez (1990); Plata *et al.*(1991)
C. sinensis (L.) Kuntze (**T^{t}**)	ZE	D	M	-	-	2	0,5 b	10 2	-	-	-	A/ T^{h} S/ T^{h}	-	-	-	3* 0,2 b	2 2	-	-	-	20 92	Jhaa et al.(1992) Kuntze *et al.*(2001)
Carica papaya L. (**C^{t}**)	ZE	I	M	2 7	-	-	-	-	-	-	-	S/ T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cipriano *et al.* (2018) Chaudhary *et al.*(2019)
Carthamus tinctorius L. (**Asa^{h}**)	ZE L S	I	U	-	-	1	2,5 b	1,5	0,5	-	6*	A/ T^{hs}	-	-	1	2,5 b	1,5	-	-	6*	61 100	Kumar *et al.*(2008) Kumar & Kumari (2010) Mandal & Gupta (2003)
Catharanthus roseus (L.) G. Don (**As^{h}**)	ZE	I	U	-	-	1	-	1,5	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	1	-	1	-	-	-	22	Junaid *et al.*(2007)
Centaurium erythraea Rafn (**G^{h}**)	L	I D	U M	0,1	-	-	-	-	-	-	0,3c	A/ T^{h}	0,2	-	-	-	-	-	-	0,5f	80	Bogdanović *et al.*(2021)
Chrysanthemum indicum L. (**As^{h}**)	L	D	U	2	-	-	-	-	2	-	-	A/ T^{h}	2	-	-	-	-	2	-	-	100	Naing *et al.*(2013)
Cinnamomum camphora L. (**Lu^{t}**)	ZE	I	U M	0,1 0,1	-	-	-	1 1	-	-	-	A/ C^{ch}	0,1	-	1	-	1	-	-	-	93 -	Shin *et al.*(2010) Jing *et al.*(2019)
Clematis sp (**Ra^{h}**)	M	I D	U	-	-	-	-	0,5	-	-	-	A/ C^{h}	-	-	-	-	0,5	-	-	-	100	Mitrofanova *et al.*(2021)
Clitoria ternatea L. (**F^{h}**)	ZE	I	M	-	-	0,5	-	0,5	-	-	-	A/ T^{fh}	-	-	-	0,5 a	-	0,5	-	-	-	Dhanalakshni & Lakshmanan (1992)
Coffea arabica L. (**Ru^{t}**)	L	I	U M	1	-	-	-	8	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	8	-	-	-	100	Fernández *et al.*(2005)
Commiphora wightii (Arnott) Bhandari (**Bu^{t}**)	ZE	I	U	1	-	-	-	-	-	-	-	A/ C^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	61	Kumar *et al.*(2015)

Coriandrum sativum L. **(Ap^{h})**	C S	I	U	1	-	-	-	-	-	-	-	A/ T^{h}	1	-	-	-	-	-	-	-	90	Murthy *et al.*(2008)
Crocus vernus (L.) **(I^{h})**	CO	I	M	1	-	-	-	-	-	-	0,5 [a]	A/ T^{h}	-	-	0,5	-	2	-	-	-	100	Sivanesan *et al.*(2012) Blazquez *et al.*(2009)
Cucumis sativus L. **(Cu^{h})**	T	I	M	-	-	-	-	-	-	-	0,2 [a]	A/ T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	0,2 [a]	82	Ziv & Gadasi (1986) Cade *et al.*(1990)
Cyclamen persicum Mill **(Pr^{h})**	L	I	M	2	-	-	-	0,2	-	-	-	A/ G^{a}	2	-	-	-	0,2	-	-	-	100	You *et al.*(2011)
Datura metel L. **(So^{h})**	ZE^{-m}	D	M	-	-	-	-	-	2	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	50	Wijesekaraa & Iqbal (2013)
Daucus carota L. **(Ap^{h})**	ZE^{-m} ZE	I D	U	1	-	-	-	-	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	100 93	Tokuyi *et al.*(1995) Ogata *et al.*(2005)
Dianthus caryophyllus L. **(Cr^{h})**	I	I	U	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-	A/ T^{h}	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-	95	Karami *et al.*(2008)
Eleutherococcus senticosus Maxim **(Ar^{t})**	ZE	D	U M	1	-	-	-	-	-	-	-	A/ Th	-	-	-	-	-	-	-	-	65	Yang *et al.*(2012b); Zhou *et al.*(2014)
Eriobotrya japonica (Thunb.) Lindl. **(Ro^{t})**	A	I	M	0.5	-	-	-	2	-	-	-	A/ Tth	-	-	0,2	0,2 [b]	-	-	-	0,05 [a]	73	Junqianga *et al.*(2008) Yang *et al.*(2012)
Eucalyptus citriodora Hook. **(M^{t})**	ZE	I	U M	-	-	3	-	-	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	3*	-	-	-		50	Muralidharan *et al.*(1989)
Eucalyptus globulus Labill. **(M^{t})**	ZE	I	U M	-	-	3	-	-	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	3*	-	-	-	-	50	Pinto *et al.*(2008)
Fagus sylvatica L. **(Fa^{t})**	ZE	I	M	5	-	-	-	-	-	-	-	A/ T^{h}	1	-	-	-	-	-	-	-	10	Vieitez *et al.*(1992)
Fraxinus americana L. **(O^{t})**	ZE	I	M	1	-	-	-	1	-	-	-	A/ T^{h}	-	0,2	-	-	0,2	-	-	-	20	Bates *et al.*(12993)
Garcinia indica Choiss. **(Cl^{t})**	ZE	D	M	-	-	-	-	5	-	-	-	A/ Cth	-	-	-	-	5	-	-	-	70	Thengane *et al.*(2006)
Gladiolus x Gladiolus L. **(I^{h})**	CO	I	M	-	-	-	-	0,2	-	-	0,2 [a]	A/ T^{h}	-	-	-	-	0,2	-	-	0,2 [a]	100	Remotti (1995)
Glycine max L. **(F^{h})**	ZE	I D	U	-	-	10 40	-	-	-	-	-	A/ Tth	-	-	10 40	-	-	-	-	-	100 77	Liu *et al.*(1992)
Ipomea batatas L. (Lam) **(Co^{h})**	L P	I	U	2,5	-	-	-	0,3	-	-	-	S/ T^{h}	0,2	-	-	-	-	-	-	-	100	Zheng *et al.*(1996)
Helianthus maximiliani (Schrader) **(Ar^{h})**	L	D	U	-	-	0,5	-	0,5	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	0,5	-	0,5	-	-	-	100	Vasic *et al.*(2001)
Hepatica nobilis L. **(Ra^{h})**	ZE	I	M	-	-	0,2	-	0,02	-	-	-	A/ T^{h}	-	-	0,02	-	0,2	-	-	-	52	Szewczyk & Pawłowska (2015)
Hevea brasiliensis (Willd & A. Juss) Müll. Arg. **(E^{t})**	A	I	U	-	-	0,02	-	0,5	3	-	-	A/ T^{h}	-	-	0,02	-	0,5	3	-	-	75	Hu *et al.*(2010)
Hovenia dulcis Thunb. **(Rh^{t})**	ZE	I	U	1	-	-	-	-	-	-	-	S/ T^{h}	-	-	-	-	0,1	-	-	-	43	Yang *et al.*(2013)
Juglans hindsii (Jeps.) Jeps. ex R.E.Sm. **(J^{t})**	C	D	U	-	-	-	0,01 [b]	-	2	-	-	A/ T^{r}	-	-	-	0,01 [b]	-	2	-	-	100	Tulecke & Mcgranahan (1985) Polito *et al.*(1989)
J. nigra L. **(J^{t})**	ZE	D	U	-	-	-	0,01 [b]	-	1	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Jariteh *et al.*(2011)
J. nigra x regia **(J^{t})**	C	D	U	-	-	-	0,01 [b]	-	2	-	-	A/ T^{r}	-	-	-	0,01 [b]	-	2	-	-	100	Tulecke & Mcgranahan (1985) Polito *et al.*(1989)
J. regia L.**(J^{t})**	C	D	U	-	-	-	0,01 [b]	1	2	-	-	A/ T^{h}	-	-	-	0,01 [b]	1	2	-	-	48	Fang *et al.* (2022)

Limnanthes alba Benth. (**L^{h}**)	ZE	D	U	0,02	-	-	-	-	-	-	0,02*	A/T^{h}	0,02	-	-	-	-	-	-	0,02*	-	Southworth &, Kwiatkowski (1991)
Linum usitatissimum L. (**Li^{h}**)	S	I	U	-	-	0,5	-	0,5	-	-	-	A/T^{h}	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-	-	3	Tejavathi *et al.*(2000)
Liquidambar stryaciflua L. (**Al^{t}**)	I	I	U	3	-	-	-	-	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01*	100	Merkle *et al.*(1997)
Magnolia delbata Zucc. (**Ma^{t}**)	ZE	I	U	1	-	-	-	-	-	-	-	A/T^{h}	1	-	-	-	-	-	-	-	-	37	Chávez *et al.*(2020)
Magnolia spp. L. (**Ma^{t}**)	ZE	D I	U	2	-	-	-	0.3	-	-	-	A/T^{h}	2	-	-	-	0.3	-	-	-	-	25	Merkle & Wiecko (1990)
Malus domestica Borkh. (**Ro^{t}**)	N	D I	U	0,4	-	-	-	0,04	-	-	-	A/C^{h}	-	-	0,2	-	0,2	0,2	-	-	-	70	Daigny *et al.*(1996)
M. pumila Mill. (**Ro^{t}**)	N	D	U	0,4	-	-	-	0,04	-	-	-	A/C^{h}	1	-	-	-	0,5	-	-	-	-	50	James *et al.*(1984)
Mangifera indica L. (**An^{t}**)	N	I	U	2	-	-	-	-	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	55	Litz *et al.*(1984)
Manihot esculenta Crantz (**E^{h}**)	M L L	D I	U	0,01 4 4	1	-	-	0,1	-	-	-	A/T^{h} C^{h}	0,01 4	12 12	-	-	0,1 0,2	-	-	10^{c}	35 43 13 80	Szabados *et al.*(1987) Groll *et al.*(2001) Wongtiem *et al.*(2011) Anuradha *et al.*(2015)
Medicago sativa L. (**F^{h}**)	C L	I	U	2 1	-	-	-	0,3	0,2	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	Lupotto (1986) Sangra *et al.*(2019)
Medicago trunculata Gaertn. (**F^{h}**)	L	I	U	1	-	-	-	-	-	-	2*	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34	Das Neves *et al.*(1999)
Morus alba L. (**Mo^{t}**)	ZE	I	U	2	-	-	-	0,5	-	-	-	A/T^{h}	0,05	-	-	-	0,01	-	-	-	-	92	Agarwal *et al.*(2004)
Myrtus communis L. (**M^{t}**)	C S	I	U	1	-	-	-	1	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	Parra & Amo (1998)
Ocotea catharinensis Mez. (**Lu^{t}**)	ZE	I	U	4	-	-	-	-	-	-	-	A/C^{h}	4	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	Moura *et al.*(1993)
Olea europaea L. (**O^{t}**)	L C ZE	I D	U M	-	-	-	0,05^{h} 5,6^{b} 6,2^{b}	0,1 2,8	-	-	- 0,6^{b}	A/T^{r}	-	-	0,1	0,05b 0,05b	0,1 0,1	-	-	-	-	90 75 35	Rugini & Caricato (1995) Pires *et al.*(2020) Mazri *et al.* (2020) Benelli et al.(2001)
Panax ginseng C.A.Mey. (**Ar^{h}**)	C	I	U	1	-	-	-	0.1	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88	Kim *et al.*(2012) Kim *et al.*(2010)
Panax vietnamensis Ha et. Grushv. (**Ar^{h}**)	L	I	U	1	-	0,5	-	-	0,2	-	-	A/G	1	-	0,5	-	-	0,2	-	-	-	66	Diem *et al.* (2022)
Passiflora cincinata Mast.. (**Pa^{h}**)	A	I	U M	4	-	-	-	1	-	-	-	A/T^{h}	4	-	-	-	1	-	-	-	-	100	Lemes *et al.*(2021a)
Petiveria alliacea L. (**Pe^{h}**)	L	D	U	5	-	-	-	-	-	5	-	A/T^{h}	-	4	-	-	-	-	-	-	-	5	Cantelmo *et al.*(2013)

Pharbitis nil L. (**M^{h}**)	ZE	D	M	-	-	3	-	-	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	0,2 *	2	-	-	-	100	Jia & Chua (1992)
Piper nigrum L. (**Pi^{h}**)	ZE	D	U	-	-	-	-	-	-	-	-	A/T^{r}	-	-	-	-	-	-	-	-	75	Nair & Gupta (2006)
Polyscias filicifolia (C. Moore ex E. Fourn.) L. H. Bailey (**Ar^{t}**)	L	I	M	0,5	-	-	-	1	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	90	Sliwińska *et al.*(2008)
Populus ciliata Wall. & Royle (**Sa^{t}**)	L	I	U	0,4	-	-	-	-	-	-	-	A/T^{h}	-	-	0,2	-	0,4	-	-	-	100	Cheema (1989) Huang *et al.*(2015)
Prunus avium L. (**Ro^{t}**)	ZE	I	U	-	-	-	0,05^{h}	0,1	0,1	-	-	A/T^{h}	-	-	0,1	0,1 * 0,05^{h}	-	-	-	-	18	Garin *et al.*(1997)
Prunus cerasus L. (**Ro^{t}**)	C	D	U	2	-	-	-	0,1	-	-	-	A/T^{r}	2	-	-	-	0,1	-	-	-	-	Tanga *et al.*(2000)
Prunus persica (L.) Stokes. (**Ro^{t}**)	C	D	U	5	-	-	-	2	2	-	-	A/T^{h}	1	-	-	-	0,2	0,2	-	-	100	Bhansali *et al.*(1990)
P. avium x P. seudocerasus (**Ro^{t}**)	R	D	U	-	-	1	-	0,1	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pesce & Rugini (2004)
P. incisa x P. serula (**Ro^{t}**)	ZE	I	U	-	-	-	-	1	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Druart (1990)
Quercus alba L. (**Fa^{t}**)	ZE	D I	U	1	-	-	-	1	-	-	-	A/T^{h}	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	3	Gingas & Lineberger (1989)
Q. bicolor Willd. (**Fa^{t}**)	I	I	U	1	-	-	-	1	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	1	-	-	-	20	Gingas (1991)
Q. brantii L. (**Fa^{t}**)	ZE	I	U	0,8	-	-	-		-	-	-	A/	-	-	-	-	-	-	-	-	100	Faizy *et al.*(2019)
Q. ilex L. (**Fa^{t}**)	S	I	U	-	-	2	-	0,5	-	-	-	A/T^{h}	-	-	0,06	-	-	-	-	-	87	Martínez *et al.*(2017)
Q. rubra L. (**Fa^{t}**)	ZE	D I	U	1	-	-	-	1	-	-	-	A/T^{h}	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	3	Gingas & Lineberger (1989)
Q.robur L. (**Fa^{t}**)	ZE L	I	U M	-	-	2,4 0,06	-	0,1	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Zegzouti *et al.*(2001) Mallón *et al.*(2012) 48 Puiderrajols *et al.*(2001)
Q. suber L. (**Fa^{t}**)	S L	I D	U M	-	-	-	-	2 0,2	-	-	-	A/T^{h} A/T^{r}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	El Maataqui *et al.*(1990) Fernandez *et al.*(1995) Puiderrajols *et al.*(2001) 35
Robinia pseudoacacia L. (**F^{t}**)	ZE	D	U	4	-	-	-	0,3	-	-	-	A/T^{h}	4	-	-	-	0,3	-	-	-	100	Merkle & Wiecko (1989)
Rosa chinensis (**Ro^{t}**)	L	I	U	3	-	-	-	-	0,5	-	-	A/T^{h}	1	-	-	-	-	-	0,1	-	40	Cai *et al.*, 2022
Rosa hybrida (**Ro^{t}**)	L	I	U	10 3	-	-	-	-	-	-	-	A/T^{h}	-	-	-	-	-	-	-	-	100 56	Li *et al.*(2002a) Bao *et al.*(2012)
Rosa rugosa Thunb. (**Ro^{t}**)	L	I	U	4	-	-	-	-	0,05	-	-	A/T^{h}	1	-	-	-	0,01	-	-	-	86	Xing *et al.*(2014)
Satalum album Linn. (**St^{t}**)	ZE	D	U	-	-	-	-	-	-	0,01	-	A/T^{h}	-	-	1	-	-	-	-	-	85	Rai & McComb (2002)
Sorbus pohuashanensis (Hance) Hedl. (**Ro^{t}**)	ZE	I	U	-	-	1	-	0.1	-	-	-	A/T^{h}	-	-	0,01	-	-	-	-	-	40	Yang *et al.*(2012a)
Sweitenia macrophyla Jacq (**Me^{t}**)	L	I	U	1	-	-	-	2	-	-	-	A/T^{r}	-	-	-	-	1	-	-	-	19	Gatica *et al.*(2019) Quiala *et al.* (2021)

Theobroma cacao L. **(MI^t)**	I A PE	I	U M	2 2 1	- -	- -	- -	0,2 -	0,1 0,3	- -	- -	A/ C^h A/ G A/ C^h	- 2 -	- -	- -	- -	0,5 -	5 -	- -	100 20 70	Maximova *et al.*(2002) Ajijaha & Hartatib (2019) Montoya *et al.*(2022)
Tilia amorensis Rupr. **(MI^t)**	ZE	I	U	1	-	-	-	-	-	-	-	A/ C^h	1	-	-	-	-	0,1	-	-	72	Kim *et al.*(2006a)
Trifolium repens L. **(F^h)**	ZE	D	U	-	-	-	-	0,05	-	-	-	A/ T^h	-	-	-	-	0,05	-	-	-	100	Maneswaran & Williams (1984;1985)
Vitis latifolia L. **(V^t)**	A	I	U	4	-	-	-	2	-	-	-	A/ T^h	-	-	2	-	-	-	-	-	14	Salunkhe *et al.*(1999)
V. rupestris Scheele **(V^t)**	L	I	U	1	-	-	-	1	-	-	-	A/ T^h	-	-	1	-	-	-	-	-	13	Martinelli *et al.*(1993; 2001)
V. vinifera L. **(V^t)**	ZE I I A PI A	D I I I	U	- 0,8 1 1,1 0,5	- - - - -	- - - - -	- - - - -	0,2 - 2 1 4	- - - - -	- - - - -	- 1c - - -	A/ T^h A/ T^m	- - - 0,5 0,5	- - - - -	- - - - -	- - - - -	0,2 2 1,1 1,1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	21 5 80	Emershad & Ramming (1994) Hao *et al.*, 2022 Capriotii *et al.* (2022) Zhou *et al.*(2014)
Zizyphus jujuba Mill. **(Rh^t)**	C	I	U	1	-	-	0,1* 0,1 b	-	-	-	-	A/ T^h	-	-	-	-	0,2	-	-	-	93	Kim *et al.*(2006b)

FAMILY. (A): Amaranthaceae; **(Al):** Altingiaceae; **(An):** Anacardiaceae; **(Ap):** Apiaceae; **(Ar):** Araliaceae; **(As):** Asteraceae; **(Bi)**: Bixaceae; **(B)**: Brassicaceae; **(BU):** Burceraceae; **(C)**: Caricaceae; **(Cr):** Caryophyllaceae; **(Co**): Convolvulaceae; **(Cl):** Clusiaceae; **(Cu)**: Curcubitaceae; **(E)**: Euphorbiaceae; **(F)**: Fabaceae; **(Fa):** Fagaceae; **(G):** Gentianaceae; **(I):** Iridaceae; **(J):** Juglandaceae; **(L)**: Limnanthaceae; **(La):** Lardizabalaceae; **(Lu):** Lauraceae; **(Li):** Linaceae; **(Ma):** Magnoliaceae; **(MI):** Malvaceae; **(Me):** Meliaceae; **(Mo):** Moraceae; **(M):** Myrtaceae; **(O):** Oleaceae; **(Pa):** Passifloraceae; **(Pe):** Petiveriaceae; **(Pi):** Piperaceae; **(P):** Polygonaceae; **(Pr):** Primulaceae; **(Ra):** Ranunculaceae **(Rh):** Rhamnaceae; **(Ro):** Rosaceae; **(Ru):** Rubiaceae; **(Sa):** Salicaceae; **(St):** Santalaceae; **(So)**: Solanaceae; **(T):** Theaceae; **(V):** Vitaceae. **HABIT.** (t): tree; (h): Herbaceus. **EXPLANT. A**: anther; **C**: Cotyledon; **CO**: Cormo; **ZE**: zygotic embryo; **ZE^m**: zygotic embryo without meristem; **L**: leaf; **I**: Inflorescence or flower; **P**: petiolo; **PE**: Petal; **PI**: Pistils; **M**: meristem; **MM**: male meristem; **MI**: microspores; **N**: nucela; **R**: root; **S**: stem. **REGENERATIVE VIA. D**: direct; **I**: Indirect. **ORIGIN OF THE SOMATIC EMBRYOS. (U)**: Unicellular; (**M**): Multicellular. **SOMATIC EMBRYO. PSE**: primary; **SSE**: secondary. **SYNCHRONIC OF THE SSE.** (**SIN**). **S**: synchronic; **A**: asynchrony. **DIFFERENTIATION TYPE PSE TO SSE. G**; globular; **T**: torpedo; **C**: cotyledonal. **DIFFERENTIATION ZONE PSE TO SSE. r:** root; **h:** hypocotyl; **e:** epicotyl; **mc**: mid-cotyledonary co. **AUXINS. 2,4-D:** 2,4-dichlophenoxyacetic**; PICLORAM:** 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid**; NAA:** 1-naphthaleneacetic acid; **IAA:** indole-acetic acid; **IBA**: Indole-3-butyric acid. **CYTOKININS: AS**: Adenine Sulphate; **BAP**: 6-benzyl-amino purine**; K:** 6-furfuryaminopurinre or Kinetin; **TDZ**: thidiazurom; **2-IP**: 2-isopentenyl adenine; **DPU:** 1,3-Diphenylurea; **Z**: zeatin.

6. Biotechnological applicattions of repetitive somatic embryogenesis.

In general, the applications of somatic embryogenesis are ontogenetic studies, gene expression, molecular genetics, and micropropagation of species of commercial interest, genetically modified or not, with promising characteristics (LOYOLA; OCHOA, 2016). Corresponding to secondary somatic embryogenesis is the massive micropropagation of elite varieties according to the agronomically important characteristic, particularly through Temporary Immersion (TI) systems and the efficient regeneration of transgenic plants from transformed primary somatic embryos.

In relation to the massive multiplication of secondary embryos by IT and the subsequent efficient regeneration, from globular primary somatic embryos, they multiply more than 24 times in secondary embryos in cycles of 1 min of immersion and six h in dryness in *Camellia sinensis* (AKULA; BECKER; BATESON, 2000) or with primary torpedo embryos with cycles of 1 min of immersion and 8 h without medium, developing from 86 to 90% of secondary embryos in *Q. robur* (MALLÓN; COVELO; VIEITEZ, 2012). Accordingly to the system, the mass of primary embryos initiated must be considered, as indicated by Steinmacher *et al*. (2011) and Yang *et al*. (2012b) in *Eleutherococcus senticosus* and *Bactris gasipaes*, respectively, which obtain the highest yield with 100 mg.

Another interesting aspect is obtaining plants with improved characteristics, increasing their ploidy, incubating primary somatic embryos in colchicine. Thus, the 29.9% of polyploid plants without abnormalities and with beneficial agronomic characteristics were regenerated from secondary somatic embryos of *Panax vietnamensis*, incubating primary somatic embryos in the globular stage with 0.3 to 0.5% colchicine for 48 h. The tetraploid plants obtained showed better growth than the diploid plants, as they presented a larger size of the stomata and a lower stomatal density (DIEM, PHONG, TUNG, 2022).

Regarding genetic transformation, few works reported using primary somatic embryos with the subsequent regeneration of transgenic plants resulting from the differentiation of secondary embryos from these. Among the systems used, the main one is the indirect by *Agrobacterium tumefaciens*, followed by the direct ones were Biobalistics and electroporation.

In the first case, in *J. regia*, transforming globular somatic embryos with the nptII gene (pCGN200), 70% of secondary embryos are obtained from these plants with the insert then verified by Southern blot (MCGRANAHAN *et al*., 1988). With the *gus* gene (pCGN7001), only 2.5% of *gus* positive plants are obtained (MCGRANAHAN *et al*., 1993), while with the *badhx* gene (pBI21) that confers tolerance to salt stress, 80% of transformation of globular primary embryos is achieved, regenerating 5.5% transgenic plants, after the *gus* gene test (BOLAGH *et al*., 2020). In *Medicago sativa*, inserting the *nptII* and *gus* genes, 16% of GUS-positive plants are regenerated from secondary embryos differentiated from globular primary embryos transforming with pGA472 (NINKOVIĆ; MILJUŚ;

NEŚKOVIĆ, 1995), or using the plasmid pCambia2301 in primary cotyledonary embryos 90% of secondary embryos are differentiated, of which 15.2% were positive to GUS and molecularly by PCR (LIU *et al*., 2013). Similarly, in *Rosa rugosa*, inserting the *nptII* and *gus* genes (pBI121) in globular primary embryos, 74% of secondary embryos positive for *gus* are achieved, but only 11.4% of these regenerate plants (XING *et al*., 2014), while with *Eriobotrya japonica* with globular primary embryos using pEG121 with the nptII gene, 22% of transformed plants are obtained, regenerated from differentiated secondary embryos (LIN; LI; ZONG, 2021). In *Q. ilex*, the plasmid pK7TA4 carrying the genes *nptII*, *rol*, *gus*, and *cstl*1 is transferred, the latest encoding the antifungal protein "thaumatin", which confers tolerance to the pathogen *Phytophthora cinnamomi*; in primary globular somatic embryos, obtaining from 2.8 to 66.7% of transgenic plants, after the colorimetric evaluation of *gus* and the molecular evaluation by PCR (CANO *et al*., 2020). In *Brassica oleracea*, the hpk1 and bar (pSHX004) genes that confer tolerance to salt stress and herbicide, respectively, were inserted in primary somatic embryos, obtaining 7.33 of transgenic plants, after molecular evaluation by PCR of the presence of both genes, as well as the evaluation in the field where the transformed lines had greater resistance to high concentrations of NaCl and herbicide (PAVLOVIĆ *et al*., 2020). In *Vitis vinifera*, empleando primary torpedo embryos in mid-cotyledonary stage, the pCAMBIA2301 plasmid is transferred with the *nptII,* achieving 80% of regenerated plants molecularly positive by PCR (ZHOU; DAI; CHENG, 2014), while in *Hevea brasiliensis* with the same plasmid and gene*,* achieving 4,06 % of regenerated plants GUS positive using cotyledonary primary somatic embryos (HUANG; LI; LI *et al*. 2015), improving its expression by cocultivation the same type of primary embryos with the bacteria for 84 hours, also verifying molecularly by PCR, according to Udayabhanu *et al*. (2022). In *Q. suber*, in globular and primary torpedo embryos, the pK7TA4 plasmid is transferred with the *nptII*, *gfp*, *rol* and *cstl1* genes, it is the last encoding for an antifungal protein, observing 60% of *gfp*-positive regenerated plants, of which 100 % carried the transgenes and 83.3% over-expressed the cstl1 gene product, when molecularly evaluated by real-time PCR, showing that 38.9% of the transgenic lines obtained were tolerant to the fungus, in *in vitro* assays with the pathogen fungal (CANO; MARTÍNEZ; COUSELO, 2021). In *Passiflora cincinnata*, the plasmid pCAMBIA1304 carrying the *hptII*, gus and nos genes is

transferred into segments of primary cotyledonary somatic embryos, increasing the transformation efficiency to 21.4% by applying 30 s of sonication, when evaluating the presence of the gene by PCR gus (LEMES; PAIM; BARCELOS, 2021b). In *Theobroma cacao*, the hptII and gfp genes are inserted through the plasmid pCAMBIA2300 in cotyledonary segments of secondary somatic embryos, the transgenic frequency being higher (11.6%) with the *Agrobacterium* AGL1 strain and with explants from 4 to 10 mm, by performing the colorimetric evaluation of the green fluorescent protein and molecular PCR of the *nptII* and *gfp* genes (JONES; ZHANG; TUCKER, 2021).

On the other hand, by bombardment, De Guglielmo *et al*. (2010) used torpedo type somatic embryos of *C. arabica* to efficiently transfer the *Cry*-1ac gene (pUBC) that confers resistance to Lepidoptera, at a pressure of 70 psi and 14 cm distance, regenerating by secondary somatic embryogenesis 100% of uniformly transformed plants, after the molecular evaluation of the gene by PCR, Southern blot, as well as by Reverse Transcription-PCR. Likewise, in *C. sinensis*, Furukawa *et al*. (2020) inserted the gene *nptII* and *gus* (pRI201) in primary embryos at a pressure of 80 psi and 6 cm of distance, differentiating secondary embryos positive to GUS, which is 39% became transformed plants. On the other hand, the electroporation method was only reported in leaf, embryogenic callus, and primary somatic embryo (torpedo type) of *C. arabica*, at capacitance of 900 µF and voltages of 375, 625, and 875 V/cm with pCambia3201 with *gus* and *bar* genes. Although this plasmid gives resistance to herbicides, transformation (100%) was found only in primary embryos previously enzymatically treated (1 h in 2% cellulose, 1% macerosime) and electroporated at 375 V/cm, regenerating by cyclic embryogenesis in the liquid medium, 100% *gus* positive plants, verifying molecularly by PCR that the genes were transferred (FERNÁNDEZ; MENÉNDEZ, 2003).

7. Conclusions

So far, secondary somatic embryogenesis has been reported in detail in 148 species (7 Gymnosperms and 141 Angiosperms) by using different explants. The main pathway was found indirectly and asynchronously, of unicellular origin in more than 60% of the cases, regenerating plants in more than 90% of the species. The combination of growth regulators (only auxin, only cytokinin, or

auxin+ cytokinin) for the stage of primary and repetitive embryogenesis varies accordingly to the plant species and explant type. However, the use of growth-regulators free media increases, decreasing the auxins concentration and increasing cytokinins in the phase of secondary embryogenesis. Despite the potential and versatile biotechnological application of cyclic embryogenesis, there are still very few works on it, so the information in this bibliographic review will be of great help for new research in these species and others where this process has not been reported yet.

8. References

AGARWAL, Sandhya; KANWAR, Kamlesh; SHARMA, D.R. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. **Scientia Horticulturae**, v. 102, n. 3, p. 359-368, 2004. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.04.002

AJIJAHA; Nur; HARTATI, Sri Rr. Primary and secondary somatic embryogenesis of cacao: the effect of explant types and plant growth regulators. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 20, n. 2, p. 69-76, 2019. http://dx.doi.org/10.21082/ijas.v20n2.2019.p69-76

AKULA, Anisha; BECKER; D; BATESON, Marion. High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. **Plant Cell Report**, v. 19, n. 12, p. 1140-1145, 2000;. https://doi.org/10.1007/s002990000239

ALI, Naouar; AHMAD, Lamarti. Influence of amino acids on the secondary somatic embryogenesis proliferation process of Moroccan Cork Oak (*Quercus suber* L.). **American Journal of Plant Sciences,** v. 12, n. 4, p. 603-613, 2021. https://doi.org/10.4236/ajps.2021.124040.

ANURADHA, T; KUMAR, K; BALASUBRAMANIAN, Ponnuswami. Cyclic somatic embryogenesis of elite Indian cassava variety H-226. **Indian Journal of Biotechology**, v.14, n. 4, p. 559-565, 2015. http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/34008.

ARTIGAS, María; FERNÁNDEZ, Rafael. Establecimiento del sistema de regeneración por embriogénesis somática de *Azadirachta indica* A. Juss. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 2, p. 73-83, 2015. http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.44200

ARTIGAS, María; FERNÁNDEZ, Rafael. Morpho-anatomical characterization of secondary somatic embryogenesis in *Azadirachta indica* (Meliaceae). **Acta Botánica Mexicana**, v.122, p. 7-20, 2018. http://dx.doi.org/10.21829/abm122.2018.1242

BAKER, Charleen; WETZSTEIN, Hazel. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut, *Arachis hypogaea*. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 2, p. 71-75, 1992. https://doi.org/10.1007/bf00235256

BAKER, Charleen; WETZSTEIN, Hazel. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4-D. **Plant Cell Tissue Organ Culture (PCTO)**, v. 40, p. 249-254, 1995. https://doi.org/10.1007/BF00048131

BAO, Ying; LIU, Guofeng; SHI, Xueping *et al*. Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* 'Samantha'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 109, p. 411-418, 2012. https://doi.org/10.1007/s11240-011-0105-6

BARBOSA, Jéssica; DE ARAÚJO, Inaé; DE OLIVEIRA, Rennan *et al*. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 148, p. 667–686, 2022. https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2

BATES, S; PREECE, J; YOPP, J. Secondary somatic embryogenesis and plantlet conversion of white ash. **HortScience**, v. 28, p. 405, 1993.

BENALI, Naouar; LAMARTI, Ahmed. Secondary Somatic Embryogenesis for Cork Oak (*Quercus Suber* L.): Influence of Sugars. **Intenational Journal Research in Agricultural Sciencce**, v. 6, n. 1, p.18-26, 2019.

BHANSALI, Raj; DRIVER, John; DURZAN, Don. Rapid multiplication of adventitious somatic embryos in peach and nectarine by secondary embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 280-284, 1990. https://doi.org/10.1007/bf00232302

BENELLI, Carla; FABBRI, A; GRASSI, S. *et at*. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). **Journal of Horticultural Science Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 112-119, 2001. https://doi.org/10.1080/14620316.2001.11511336

BLAZQUEZ, Silvia; OLMOS, Enrique; HERNÁNDEZ, José *et al*. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 97, p. 49-57, 2009. https://doi.org/10.1007/s11240-009-9497-y

BOGDANOVIĆ, Milica; CUKOVIĆ, Katarina; SUBOTIĆ, Angelina *et al*. Secondary somatic embryogenesis in *Centaurium erythraea* Rafn. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 199-219, 2021. http://dx.doi.org/10.3390/plants10020199

BOLAGH, Fatemeh; SOLOUKI, Alireza; TOHIDFAR, Masoud *et al*. *Agrobacterium*-mediated transformation of Persian walnut using BADH gene for salt and drought tolerance. **Journal of Horticultural Science Biotechnology**, v. 96, n. 2, p. 1-11, 2020; http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2020.1812446

BORJI, Manel; BOUAMAMA, Badra; CHIBANI, Farhat *et al*. Micromorphology, structural and ultrastructural changes during somatic embryogenesis of a Tunisian oat variety (*Avena sativa* L. var "Meliane"). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 132, n. 4. p. 329-342, 2018. https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-017-1333-1

CADE, Rebecca; WEHNER, Todd; BAZICH, Frank. Somatic Embryos Derived from Cotyledons of Cucumber. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, v. 115, n. 4, p.691-696, 1990. http://dx.doi.org/10.21273/JASHS.115.4.691

CAI, Yanfang; TANG, Lintao; CHEN, Haixia *et al*. Somatic embryogenesis in Rosa chinensis cv. "Parson`s pink China". **Research Square**, 2022. PPR: PPR440286. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1226862/v1

CÁLIĆ, Dušica; DEVRNJA, Nina; MILOJEVIĆ, Jelena. Abscisic Acid Effect on Improving Horse Chestnut Secondary Somatic Embryogenesis. **Hortscience**, v. 47, n. 12, p. 1741–1744, 2012. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.12.1741

CANO, Vanesa; MARTÍNEZ, Teresa, COUSELO, José *et al*. Regeneration of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of *Quercus ilex* L. somatic embryos with the gene CsTL1. **New Forests**, v. 51, p. 1003-1021. 2020. https://doi.org/10.1007/s11056-020-09771-9

CANO, Vanesa; MARTÍNEZ, Teresa, COUSELO, José *et al*. Efficient transformation of somatic embryos and regeneration of cork oak plantlets with a gene (CsTL1) encoding a Chestnut thaumatin-like protein. **Intenational Journal of Molecular Sciences.** 2021; v. 22, n. 4, p. 1757-1780, 2021. https://doi.org/10.3390/ijms22041757

CANTELMO, L; SOARES, B; ROCHA, L. *et al.* Repetitive somatic embryogenesis from leaves of the medicinal plant *Petiveria alliacea* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 115, p. 385-393, 2013. https://doi.org/10.1007/s11240-013-0370-7

CAPRIOTTI, Luca; LIMERA, Cecilia; MEZZETTI, Bruno *et al*. From induction to embryo proliferation: improved somatic embryogenesis protocol in grapevine for Italian cultivars and hybrid *Vitis* rootstocks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC),** 2022. https://doi.org/10.1007/s11240-022-02346-w

CHATURVEDI, Rakhi; RAZDAN, M; BHOJWANI, S. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryo cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Plant Cell Reports**, 2004; v. 22, p. 801-809, 2004. https://doi.org/10.1007/s00299-004-0768-0

CHAUDHARY, Kulbhushan; PRAKASH, Jai. Effect of 2, 4-D and Picloram on Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* var. P-7-9. Plant Tissue Cult Biotechnology, v. 29, n. 1, p. 25-32, 2019. http://dx.doi.org/10.3329/ptcb.v29i1.41976

CHÁVEZ, A; MATA, Martín; OYAMA, Ken *et al*. Induction of somatic embryogenesis and evaluation of genetic stability in regenerated plants of

Magnolia dealbata. **Biologia Plantarum**, v. 64, n. 48, p. 224-233, 2020. http://dx.doi.org/10.32615/bp.2020.006

CHEEMA, GURVINDER. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension and tissue cultures of mature himalayan poplar (*Populus ciliata*). **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 124-127, 1989. https://doi.org/10.1007/BF00716855

CHEN; J; HONG, P. Cellular origin and development of secondary somatic embryos in *Oncidium* leaf cultures. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 2, p. 215-220, 2002. http://dx.doi.org/10.1007/s10535-012-0079-1

CHENGALRAYAN, K; HAZRA, S; GALLO, M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 415-421, 2001. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00439-3

CHUNG, Hsiao-Hang; CHEN, Jen-Tsung; CHANG, Wei. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai pink and subsequent plant regeneration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 6, p. 765–769, 2005. http://dx.doi.org/10.1079/IVP2005702

CHUNG, Hsiao-Hang; CHEN, Jen-Tsung; CHANG, Wei. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium.* **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 2, p. 346-350, 2007. http://dx.doi.org/10.1007/s10535-007-0069-x

CIPRIANO, Jamile; CRUZ, Ana; MANCINI, Karina *et al*. Somatic embryogenesis in *Carica papaya* as affected by auxins and explants, and morphoanatomical-related aspects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 90, n. 1, p. 385-400, 2018. http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820160252

CONGER, B; HANNING, G; GRAY, D. *et al*. Direct Embryogenesis from Mesophyll Cells of Orchardgrass. **Sciense**, v. 221, n. 463, p. 850-851, 1983. https://doi.org/10.1126/science.221.4613.850

ĆOSIĆ, Tatjana; VINTERHALTER, Branca; VINTERHALTER, Dragan *et al*. *In vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos and repetitive somatic embryogenesis in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. gongylodes). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, p. 294-303, 2013. https://doi.org/10.1007/s11627-013-9517-9

DAI, Jin-Ling; TAN, Xiao; ZHAN, Ya-Guang *et al.* Rapid and repetitive plant regeneration of *Aralia elata* Seem. via somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 104, n. 1, p. 125-130, 2011. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9801-x

DAIGNY, G; PAUL, H; SANGWAN, R., *et al*. Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus* × *domestica* Borkh. (cv 'Gloster 69'). **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 153-157, 1996. https://doi.org/10.1007/BF01890857

DAS NEVES, Lucinda; DUQUE Sofia; ALMEIDA Simone *et al*. Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. Narbonensis and *M. truncatula*

Gaertn cv. Jemalong. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 5, p. 398-405, 1999. http://dx.doi.org/10.1007/s002990050593

DATTA, Swapan; DATTA, Karibi; POTRYKUS, Ingo. Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both "Indica" and "Japonica" rice (*Oryza sativa*). **Plant Science**, v. 67, n. 1, p. 83-88, 1990. https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90053-Q

DE GUGLIELMO, Zoraya; ALTOSAAR, Ilimar; ZAIDI, Mohsin *et al*. Transformation of coffee (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) with the cry1ac gene by biolistic, without the use of markers. **Brazilian Journal of Biology**, 2010; v. 70, n. 2, p. 387-393, 2010. http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842010000200022

DHANALAKSHNI, S; LAKSHMANAN, K. *In Vitro* Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Clitoria ternatea*. **Journal Experimental of Botany**, v. 43, n. 247, p. 213-219, 1992. https://doi.org/10.1093/jxb/43.2.213

DIEM, Le Thi; PHONG, Truong Hoai; TUNG Hoang Thanh *et al*. Tetraploid induction through somatic embryogenesis in *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. by colchicine treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 303, p. 111254. 2022 https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111254

DRUART, Ph. Improvement of somatic embryogenesis of the cherry dwarf rootstock Inmil/GM9 by the use of different carbon sources. **Acta Horticulturae**, v. 280, p. 125-129, 1990. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.280.19

DURHAM, Richard; PARROTT, Wayne. Repetitive somatic embryogenesis from peanut cultures in liquid medium. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 3, p. 122-125, 1992. http://dx.doi.org/10.1007/BF00232163

EASTMAN, Ann; WEBSTER, Fiona; PITEL, Jack *et al*. Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca* x engelmannii complex) using culture morphology and isozyme analysis. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 425-430, 1991. https://doi.org/10.1007/BF00232617

EL MAATAQUI, M; ESPAGNAC, H; MICHAUX, N. Histology of Callogenesis and Somatic Embryogenesis Induced in Stem Fragments of Cork Oak (*Quercus suber*) Cultured *in vitro*. **Annales of Botany**, v. 66, n. 2, p. 183-190, 1990. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088014

EMERSHAD, R; RAMMING, D. Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 1, p. 6-12, 1994. https://doi.org/10.1007/bf00233289

ESCALANT, Jean; TEISSON, Claude; COTE, Francois. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 30P, n. 4, p. 181-186, 1994. https://doi.org/10.1007/BF02823029

EUDES, Francois; ACHARYA, Sourya; LAROCHE, André *et al*. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**

(PCTO), v. 73, n. 2, p. 147-157, 2003. http://dx.doi.org/10.1023/A:1022800512708

FAIZY, E; MORADI, A; ASL, A. Controlling Secondary Somatic Embryogenesis in Persian Oak (*Quercus brantii* L.) Using Hormonal Compounds and Media. **Journal of Agricultural Science Technology**, v. 21, n. 3, p. 615-626, 2019. http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2019.21.3.12.5

FANG, Hongcheng; DONG, Yuhui; RUI, Zhou *et al*. Optimization of the induction, germination, plant regeneration and system for somatic embryos in apomictic walnut (*Juglans regia* L.), **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 150, p. 289-297, 2022. https://doi.org/10.1007/s11240-022-02266-9

FEHÉR, Attila; BERNULA, Dóra; GÉMES, Katalin. The Many Ways of Somatic Embryo Initiation. In: Loyola V, Ochoa N (eds.), Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Switzerland: Springer International, p. 23-37, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_3

FENG, X; WOLYN, D. Development of haploid asparagus embryos from liquid cultures of anther-derived calli is enhanced by ancymidol. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 5, p. 281-285, 1993. https://doi.org/10.1007/bf00237136

FEREOL, Leonidas; CHOVELON, V; CAUSSE, Sandrine *et al*. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 3, p. 197-203, 2002. https://doi.org/10.1007/s00299-002-0498-0

FERNÁNDEZ, Barbara; CELESTINO, Cristina; TORIBIO, Mariano. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**,v. 41, n. 2, p. 99-106,1995. https://doi.org/10.1007/BF00051578

FERNÁNDEZ, Sophie; MICHAUX-FERRIERE, Nicole; COUMANS, Marc. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO3. **Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 147-155, 1999. https://doi.org/10.1023/A:1006142504577

FERNÁNDEZ, Rafael; HERMOSO, Luis; MENÉNDEZ, Andrea. Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions *Coffea arabica* cv Catimor. **Interciencia**, v. 30, n. 11, p. 694-698, 2005.

FERNÁNDEZ Rafael; MENÉNDEZ, Andrea. Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes gus and bar. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29-38, 2003.

FURUKAWA, Kazumi; KOIZUMI, Mai; HAYASHI, Wakana *et al*. Pretreatment and posttreatment in the biolistic transformation of tea plant (*Camellia sinensis*) somatic embryos. **Plant Biotechnology**, V. 37, n. 2, p. 195-203, 2020. http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0404a

GARIN, Elizabeth; GRENIER, Emmanuel; DE MARCH, Gehislaine. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 48, p. 83-91, 1997. https://doi.org/10.1023/A:1005729621557

GATICA, Andrés; VARGAS, Kaliana; BENAVIDES, Miguel; *et al*. Cambios morfológicos y bioquímicos durante la embriogénesis somática en caoba, *Sweitenia macrophya* (Meliaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 67, n. 3, p. 406-418, 2019. http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v67i3.34172.

GINGAS, V. Asexual Embryogenesis and Plant Regeneration from Male Catkins of Quercus. **HortScience,** v. 26, n. 9, p. 1217-1218, 1991.

GINGAS, V; Lineberger, R. Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 17, p. 191-203, 1989. https://doi.org/10.1007/BF00046867

GROLL, J; MYCOCK, David; GRAY, Vincent *et al*. Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 65, p. 201-210, 2001. https://doi.org/10.1023/A:1010622424627

GUI, Y; GUO, Z; KE, S., *et al*. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax senticosus*. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 9, p. 514-516, 1991. https://doi.org/10.1007/BF00232108

HACCIUS, B; BHANDARI, N. Delayed histogen differentiation as a common primitive character in all types of non-zygotic embryos. **Phytomorphology,** v. 25, p. 91-94.1975.

HAO, Xinyi; YA, Rong, ZHANG, Tianyue *et al*. Establishment of a rapid and highly effective recycling system for production embryos in "Chardonnay". **Research Square,** 2022; https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1285031/v1

HEIKRUJAMA, Monika; KUMAR, Dinesh; KUMAR, Shashi *et al*. High efficiency cyclic production of secondary somatic embryos and ISSR based assessment of genetic fidelity among the emblings in *Calliandra tweedii* (Benth.). **Scientia Horticulturae**, v. 177, p. 63-70, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.036

HUA, Y; HUANG, T; HUANG, H. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Breeding**, v. 129, n. 2, p. 202-207, 2010. http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01663.x

HUANG, Zhen; XU, Congping; LI, Yun *et al*. Induction of somatic embryogenesis by anther-derived callus culture and plantlet ploidy determination in poplar (*Populus x beijingensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 3, p. 949-959, 2015. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0649-3

HUANG, T.D.; LI, Y.T.; LI, H.S., *et al*. Somatic Embryo, an Alternative target tissue for *Agrobacterium*-mediated Transformation in *Hevea brasiliensis*. **Journal of Rubber Research**, v. 18, n. 3, p. 171–188, 2015.

INPUAY, Komgrit; TE-CHATO, Sompong. Primary and secondary somatic embryos as tool for the propagation and artificial seed production of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 2, p. 597-609, 2012.

JAMES, D; PASSEY, A; DEEMING, C. Adventitious Embryogenesis and the *in vitro* culture of culture of Apple Seed Parts. **Journal of Plant Physiology**, v. 115, n. 3, p. 217-229, 1984. https://doi.org/10.1016/s0176-1617(84)80124-8

JARITEH, M; EBRAHIMZADEH, H; NIKNAM, V., *et al*. Antioxidant enzymes activities during secondary somatic embryogenesis in Persian walnut (*Juglans regia* L.). **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 20, p. 4093-4099, 2011.

JHAA, Timir; JHAB, Sumita; SEN, S. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of an elite Darjeeling tea clone. **Plant Science**, v. 84, n. 2, p. 209-213, 1992. https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90136-A

JIA, Shi; CHUA, Nam. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo culture of *Pharbitis nil*. **Plant Sciences**, v. 87, n. 2, p. 215-223, 1992. https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90153-D

JING, Ruyue; WANG, Peilan; HUANG, Zhen *et al.* Histocytological Study of Somatic Embryogenesis in the Tree *Cinnamomum camphora* L. (Lauraceae). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluc-Napoca**, v. 47, n. 4, p. 1348-1358, 2019. http://dx.doi.org/10.15835/nbha47411655

JONES, Todd; ROST, Thomas. Rost the developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. **Botanical Gazette**, v. 150, n. 1, p. 41-49, 1989. http://dx.doi.org/10.1086/337746

JONES, Jesse, ZHANG, Elaine, TUCKER, Dominicke *et al*. Screening of cultivars for tissue culture response and stablishment of genetic transformation in a high-yielding and disease-resistant cultivar of *Theobroma cacao*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 58, n. 4, pp. 153-145, 2021. https://doi.org/10.1007/s11627-021-10205-0

JUNAID, Aslam; MUJIB, Abdul; SHARMA, Maheshwar *et al*. Growth regulators affect primary and secondary somatic embryogenesis in Madagaskar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) at morphological and biochemical levels. **Plant Growth Regulation**, v. 51, n. 3, p. 271-281, 2007. http://dx.doi.org/10.1007/s10725-007-9171-5

JUNQIANGA, Li; YONGQINGA, Wang; LIHUAB, Lin *et al*. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture in loquat (*Eriobotrya japonica* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 115, n. 4, p. 329-336, 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2007.10.007

KACHHWAHA, Sumita; VARSHNEY, Alok; KOTHARI, Shanker. Somatic embryogenesis and long term high plant regeneration from barley (*Hordeum vulgare* L.) using Picloram. **Cereal Research Communications**, v. 25, n. 2, p. 117-126, 1997. http://dx.doi.org/10.1007/BF03543446

KARAMI, Omid; DELJOU, A; KARIMI, Gona. Secondary somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**,v. 92, n. 3, p. 273-280, 2008. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-007-9332-2

KHALIL, S; CHEAH, Kheng; PEREZ, Eden *et al*. Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 12, p. 1128-1134, 2002. http://dx.doi.org/10.1007/s00299-002-0461-0

KIM, Tae; CHOI, Yong; LEE, Byoung *et al*. Micropropagation of *Tilia amurensis* via repetitive somatic embryogenesis. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 243-248, 2006a. http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2006.33.4.243

KIM, Y; KIM, M; SHIMA, J., *et al*. Somatic Embryogenesis of Two New Panax ginseng Cultivars, YunPoong and ChunPoong. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 283-289, 2010. https://doi.org/10.1134/S1021443710020172

KIM, Yu-Jin; LEE, Ok-Ran; KIM, Kjung-Tack *et al*. High Frequency of Plant Regeneration through Cyclic Secondary Somatic Embryogenesis in *Panax ginseng.* **Journal of Ginseng Research**, v. 36, n. 4, p. 442-448, 2012. https://doi.org/10.5142/jgr.2012.36.4.442

KIM, Y; MOON, H; SON, S. Repetitive somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zizyphus jujuba* Mill. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 3, p. 247-251, 2006b. https://doi.org/10.1079/IVP2006754

KISS, J; HESZKY, L; KISS, E., *et al*. High efficiency adventive embryogenesis on somatic embryos of anther, filament and immature proembryo origin in horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 30, p. 59-64, 1992. https://doi.org/10.1007/BF00040001

KLIMASZEWSKA, K; NOCEDA, C; PELLETIER, G., *et al*. Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pin*aster (Ait.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 45, p. 20–33, 2009. https://doi.org/10.1007/s11627-008-9158-6

KOH, W; LOH, C. Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering in rapid-cycling *Brassica napus*. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1177-1183, 2000. https://doi.org/10.1007/s002990000268

KONG, Lisheng; YEUNG, Edward. Development of white Spruce somatic embryos; II. Continual Shoot meristem development during germination. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 28P, p. 125-131,1992. https://doi.org/10.1007/BF02823060

KRIKORIAN, A; KANN, R. Plantlet Production from Morphogenetically Competent Cell Suspensions of Daylily. **Annals of Botany**, v. 47, n. 5, p. 679-686,1981. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086065

KUMAR, Pradeep; KUMARI, Ranjitha. Effect of Primary and Secondary Somatic Embryogenesis in Safflower (*Carthamus tinctorius* L) at Morphological and Biochemical Levels. **American Eurasian Journal Agricultural Environment Science**, v. 8, n. 6, p. 784-792, 2010.

KUMAR, Vijaya; KUMARI, Ranjitha; CASTAÑO, Enrique. Cyclic somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from callus of safflower. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 429-436, 2008. http://dx.doi.org/10.1007/s10535-008-0087-3

KUMAR, Santosh; NADGAUDA, Rajani. Control of Morphological Aberrations in Somatic Embryogenesis of *Commiphora wightii* (Arnott) Bhandari (Family: Bursaraceae) Through Secondary Somatic Embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B; Biological Sciences**, v. 85, p. 281-290, 2015. https://doi.org/10.1007/s40011-014-0347-2

KUMAR, Vinod; RAMAKRISHNA, A; RAVISHANKAR, G. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, p. 602-607, 2007. https://doi.org/10.1007/s11627-007-9067-0

LEE, Kang; LEE, Jong; SOH, Woong. Effects of ABA on Secondary Embryogenesis from Somatic Embryos Induced from Inflorescence Culture of *Aralia cordata* Thunb. **Journal of Plant Biology**, v. 41, n. 3, p. 187-192, 1998. https://doi.org/10.1007/BF03030252

LELU, Marie; GAUTIER, Florian; ELIÁŠOVÁ, Katerina *et al*. High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, n. 1, p. 137-155, 2018. https://doi.org/10.1007/s11240-017-1318-0

LEMES, Maurecilne; PAIM, Daniela; SALABERT José *et al*. Repetitive somatic embryogenesis from wild passion fruit (*Passiflora cincinata* Mast.) anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 146, n. 3, p. 635-641, 2021a. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02083-6

LEMES, Maurecilne; PAIM, Daniela; BARCELOS, Andreia *et al*. Novel and efficient transformation of wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast) using sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 57, n. 3, p. 380–386, 2021b. https://doi.org/10.1007/s11627-020-10134-4

LI, Xiangqian; KRASNYANSKI, Sergei; KORBAN, Schuyler. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. **Journal of Plant Physiology,** 2002a; v. 159, p. 313-319. http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-00688

LI, L; QU, R. *In vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic

embryogenesis. **Plant Breeding**, v. 121, p. 155-158, 2002b. https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.00684.x

LI, Baochun; WOLYN, David. Abscisic acid and ancymidol promote conversion of somatic embryos to plantles and secondary embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. **In Vitro Cellular & Develomental Biology-Plant**, v. 32, p. n. 4, 223-226, 1996. https://doi.org/10.1007/BF02822691

LIN, Lihua; LI, Junqiang; ZONG, Hua *et al*. Effect of antibiotics on *Agrobacterium*-mediated transformation from anther derived embryos of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. cv. 'Dawuxing. **Journal of Horticultural Science Biotechnology**, v. 96, n. 2, p. 172-182, 2021. https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1814876

LINCY, Adinkudik; REMASHREE, Azhimala; BHASKARAN, Sasikumar. Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Acta Botanica Croatica**, v. 68, n. 1, p. 93-103, 2009.

LITZ, Richard; KNIGHT, Robert; GAZIT, Shmuel. *In vitro* somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. **Scientia Horticulturae**, v. 22, n. 3, p. 233-240, 1984. https://doi.org/10.1016/0304-4238(84)90056-6

LIU, Wennuan; MOORE, Patricia; COLLINS, Glenn. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 28P, p. 153-160, 1992. https://doi.org/10.1007/BF02823065

LIU, Wenting; LIANG, Zongsuo; SHAN, Changjuan *et al*. Genetic transformation and full recovery of alfalfa plants via secondary somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, p. 17-23, 2013. https://doi.org/10.1007/s11627-012-9463-y

LOYOLA, Victor. The History of Somatic Embryogenesis. An Overview. In: Loyola V, Ochoa N (eds.), Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Switzerland: Springer International, p. 9-22, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_2

LOYOLA, Victor; OCHOA, Neftalí. Somatic Embryogenesis. An Overview enesis. An Overview. In: Loyola V, Ochoa N (eds.), Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Switzerland: Springer International, p. 1-8, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_1

LU, Chin; VASIL, Indra. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Freely-suspended Cells and Cell Groups of *Panicum maximum* Jacq. **Annals of Botany**, v. 48, n. 4, p. 543-548, 1981. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086159

LU, Chin; VASIL, Indra. Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea Grass). **American Journal of Botany**, v. 72, n. 12, p. 1908-1913, 1985.

LUPOTTO, E. The Use of Single Somatic Embryo Culture in Propagating and Regenerating Lucerne (*Medicago sativa* L.). **Annals of Botany**, v. 57, n. 1, p. 19-24, 1986. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087089

LUPOTTO, E; LUSARDI, M. Secondary somatic embryogenesis regenerating plantlets of the inbred line B79 of maize (*Zea mayz*) switch from type 1 to type 2 callus effect on the regenerative potential. **Maydica**, v. 33, n. 3, p. 163-177, 1988.

MALIK, Malgorzata. Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 94, p. 337-345, 2008. https://doi.org/10.1007/s11240-008-9415-8

MALIK, Malgorzata; BACH, A. High-yielding repetitive somatic embryogenesis in cultures of *Narcissus* L. "Carlton". **Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus**, v. 16, n. 2, p. 107-112, 2017.

MAHESWARAN, G; WILLIAMS, E. Primary and Secondary Direct Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryos of *Brassica campestris*. **Journal of Plant Physiology**, v. 124, n. 5, p. 455-463, 1986. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80203-6

MALLÓN, Rubén; COVELO, Purificación; VIEITEZ, Ana. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. **Trees**, v. 26, n. 3, p. 731-741, 2012. https://doi.org/10.1007/s00468-011-0639-6

MANDAL, Abdul; GUPTA, Snehasish. Somatic embryogenesis of safflower: influence of auxin and ontogeny of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 72, n. 1, p. 27-31, 2003. https://doi.org/10.1023/A:1021264403398

MANESWARAN, G; WILLIAMS, E. Direct Somatic Embryoid Formation on Immature Embryos of *Trifolium repens*. *T. pratense* and *Medicago sativa*, and Rapid Clonal Propagation of *T. repens.* Annals of Botany, v. 54, n. 2, p. 201-211, 1984. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086784

MANESWARAN, G; WILLIAMS, E. Origin and Development of Somatic Embryoids Formed Directly on Immature Embryos of *Trifolium repens in vitro.* **Annals of Botany**, v. 56, n. 5, p. 619-630, 1985. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087052

MARTINELLI, Lucia; BRAGAGNA, Paola; POLETTI, Valentino *et al*. Somatic embryogenesis from leaf- and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 3, p. 207-210, 1993. https://doi.org/10.1007/BF00237055

MARTINELLI, Lucia; CANDIOLI, E; COSTA, D., *et al*. Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 4, p. 279-284, 2001. http://dx.doi.org/10.1007/s002990100339

MARTÍNEZ, María; SAN JOSÉ, M; VIEITEZ, A., *et al*. Propagation of mature *Quercus ilex* L. (holm oak) trees by somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 131, p. 321-333, 2017. https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-017-1286-4

MAXIMOVA, Siela; ALEMANNO, Larence; YOUNG, Ann *et al*. Eficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 3, p. 252-259, 2002. http://dx.doi.org/10.1079/IVP2001257

MAZRI, Mouaad; NACIRI, Rachida; BELKOURA, Ilham. Maturation and Conversion of Somatic Embryos Derived from Seeds of Olive (*Olea europaea* L.) cv. Dahbia: Occurrence of Secondary Embryogenesis and Adventitious Bud Formation. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1489-1502, 2020. https://doi.org/10.3390/plants9111489

MCGRANAHAN, Gale; LESLIE, Charles; URATSU, Sandra *et al*. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. **Bio/technology,** v. 6, p. 800-804, 1988. https://doi.org/10.1038/nbt0788-800

MCGRANAHAN, Gale; LESLIE, Charles; DANDEKAR, Abhaya *et al*. Transformation of pecan and regeneration of transgenic plants Gale. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 634-638, 1993. https://doi.org/10.1007/BF00232814

MERKLE, Scott; WIECKO, A. Regeneration of *Robinia pseudoacacia* via somatic embryogenesis. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 19, n. 2, p. 285-288, 1989. http://dx.doi.org/10.1139/x89-043

MERKLE, Scott; WIECKO, A. Somatic Embryogenesis in Three Magnolia Species. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 5, p. 858-860,1990. http://dx.doi.org/10.21273/JASHS.115.5.858

MERKLE, Scott; BAILEY, R; PAULEY, B., *et al*. Somatic embryogenesis from tissues of mature sweetgum trees. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 27, n. 6, p. 959-964, 1997. http://dx.doi.org/10.1139/x96-216

MIROSHNICHENKO, Dmitry; CHABAN, Inna; CHERNOBROVKINA, Mariya *et al*. Protocol for efficient regulation of *in vitro* morphogenesis in einkorn (*Triticum monococcum* L.), a recalcitrant diploid wheat species. **PloS One**, v. 12, n. 3, p. e0173533, 2017. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173533

MITROFANOVA, Irina; IVANOVA, Natalia; KUZMINA, Tatyana *et al*. *In Vitro* regeneration of Clematis plants in the Nikita Botanical Garden via somatic embryogenesis and organogenesis. **Frontiers Plants Sciences**, v. 12, p. 541171, 2021. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.541171

MO, Lars; VON ARNOLD, Sara. Origin and Development of Embryogenic Cultures from Seedlings of Norway Spruce (*Picea abies*). **Journal of Plant Physiology**, v. 138, n. 2, p. 223-230, 1991. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80275-0

MO, Lars; VON ARNOLD, Sara; LAGERCRANTZ, U. Morphogenic and genetic stability in longterm embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* {L.} Karst). **Plant Cell Reports**, v. 8, n. 3, p. 375-378, 1989. https://doi.org/10.1007/bf00270072

MONDAL, Tapan; BHATTACHARYA, Amita; SINGH, Paramir. Induction of synchronous secondary somatic embryogenesis in *Camellia sinensis* (L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 7, p. 945-951, 2001. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00179

MONTOYA, Tatiana; HENAO, Ana; DE LA HOZ, Tatiana *et al*. Propagation of IMC67 plants, universal cacao (*Theobroma cacao* L.) rootstock via somatic embryogenesis, **International Journal of fruit science,** v. 22, n. 1, p. 78-94, 2022. https://doi.org/10.1080/15538362.2021.2023067

MOURA, P; VIANA, A; MANTELL, S. *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 35, n. 3, p. 279-286, 1993. https://doi.org/10.1007/BF00037282

MUJIB, Abdul; BANERJEE, Saumitra; MAQSOOD, Mehpara *et al*. Somatic Embryogenesis of Some Member Ornamental Genera of Amaryllidaceae and Allied Families: the Similarities and Differences. The **Open Horticulture Journal**, v. 6, p. 9-18, 2013. http://dx.doi.org/10.2174/1874840620130807001

MURALIDHARAN, E; GUPTA, P; Mascarenhas, A. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 8, n. 1, p. 41-43, 1989. https://doi.org/10.1007/bf00735775

MURTHY, Niranjana; HAHN, E; PAEK, Kee. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L.. **Scientia Horticulturae**, v. 118, n. 2, p. 168-171, 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.037

NADEL, Barry; ALTMAN, Arie; ZIV, Meira. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. Promoting effects of mannitol on somatic embryo development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 18, p. 181-189, 1989. https://doi.org/10.1007/BF00047743

NADEL, Barry; ALTMAN, Arie; ZIV, Meira. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronized cell cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 20, p. 119-124, 1990. https://doi.org/10.1007/BF00114709

NAGMANI, R; BECWAR, M; WANN, S. Single-cell origin and development of somatic embryos in *Picea abies* (L.) Karst. (Norway spruce) and *P. glauca* (Moench) Voss (white spruce). **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 2, p. 157-159, 1987. https://doi.org/10.1007/bf00276677

NAING, Aung; KIM, Chang; YUN, Baek *et al*. Primary and secondary somatic embryogenesis in *Chrysanthemum* cv. Euro. **Plant Cell, Tissue and Organ**

Culture (PCTO), v. 112, n. 3, p. 361-368, 2013. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-012-0243-5

NAIR, Ramakrishnan; GUPTA, Dutta. High-frequency plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 12, p. 699-707, 2006. https://doi.org/10.1007/s00299-005-0016-2

NATARAJAN, Nandhakumar; SUNDARARAJAN, Sathish; RAMALINGAM, Sathishkumar *et al*. Efficient and rapid *in vitro* plantlet regeneration via somatic embryogenesis in ornamental bananas (*Musa* spp.). **Biologia**, v. 75, n. 2, p. 317-326, 2020. http://dx.doi.org/10.2478/s11756-019-00358-0

NEUMANN, Karl; KUMAR, Ashwani; IMANI, Jafargholi. Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology Basics and Application. Switzerland: Springer Nature AG 2009, p. 107-183, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-49098-0_7

NINKOVIĆ, Slavica; MILJUŚ, Jovanka; NEŚKOVIĆ, Mirjana. Genetic transformation of alfalfa somatic embryos and their clonal propagation through repetitive somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 42, p. 255-260, 1995. https://doi.org/10.1007/BF00029996

OGATA, Yumiko; IIZUKA, Misato; NAKAYAMA, Daisuke *et al*. Possible involvement of abscisic acid in the induction of secondary somatic embryogenesis on seed-coat-derived carrot somatic embryos. **Planta**, v. 221, p. 417-423, 2005. https://doi.org/10.1007/s00425-004-1449-5

OTHMANI, Ahmed; BAYOUDH, Chokri; AL-KHAYRI, Jameel *et al*. Cyclic somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). cv Deglet bey (Mnakher) A. **Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology**, v. 51, n. 9, p. 3204-3213, 2018.

PANAIA, Maggie; BUNN, Eric; MCCOMB, J. Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis of *Lepidosperma drummondii* (Cyperaceae) and *Baloskion tetraphyllum* (Restionaceae) for land restoration and horticulture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 3, p. 379-386, 2011. http://dx.doi.org/10.1007/s11627-010-9335-2

PANAIA, Maggie; SENARATNA, T; DIXON, K., *et al*. High-frequency somatic embryogenesis of koala fern (*Baloskion tetraphyllum*, Restionaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 3, p. 303-310, 2004. http://dx.doi.org/10.1079/IVP2004534

PARIMALAN, Rangan; VENUGOPALAN, Akshatha; GIRIDHAR, Parvatam *et al*. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Bixa orellana* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 105, n. 3, p. 317-328, 2010. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9870-x

PARRA, R; AMO, J. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.). **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 3-4, p. 325-330, 1998. https://doi.org/10.1007/s002990050580

PĂUNESCU, Anca. Histological investigation of the secondary somatic embryogenesis of *Alyssum borzaeanum* (Brassicaceae). **Phytologia Balcanica**, v. 14, n. 1, p. 111-117, 2008.

PAVLOVIĆ, Suzana; VINTERHALTER, Branca; ZDRAVKOVIĆ, Snežana *et al*. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 113, n. 3, p. 397-406, 2013. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-012-0279-6

PAVLOVIĆ, Suzana; SAVIĆ, Jelena; MILOJEVIĆ, jelena *et al*. Introduction of the Nicotiana protein kinase (NPK1) gene by combining *Agrobacterium*-mediated transformation and recurrent somatic embryogenesis to enhance salt tolerance in cauliflower. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v.143, n. 3, p. 635-651, 2020. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01948-6

PÉREZ-NÚÑEZ, M; CHAN, J; SÁENZ, L., *et al*. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 37-43, 2006. https://doi.org/10.1079/IVP2005722

PESCE, Patricia; RUGINI, Eddo. Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock 'Colt' (*Prunus avium · P. pseudocerasus*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 79, n. 2, p. 223-232, 2004. https://doi.org/10.1007/s11240-004-0663-y

PINTO, Gloria; PARK, Yill; SILVA, Sónia *et al*. Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 95, n. 1, p. 69-78, 2008. https://doi.org/10.1007/s11240-008-9417-6

PIRES, Rita; CARDOSO, Helia; RIBEIRO, Augusto *et al*. Somatic Embryogenesis from Mature Embryos of *Olea europaea* L. cv. 'Galega Vulgar' and Long-Term Management of Calli Morphogenic Capacity. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 758-772, 2020. http://dx.doi.org/10.3390/plants9060758

PLATA, E; BALLESTER, A; VIEITEZ, A. An anatomical study of secondary embryogenesis in *Camelia reticulata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 27, p. 183-189, 1991. https://doi.org/10.1007/BF02632214

PLATA, E; VIEITEZ, Ana. *In vitro* regeneration of *Camellia reticulata* by somatic embryogenesis. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, n. 6, p. 707-714,1990. https://doi.org/10.1080/00221589.1990.11516112

POLITO, Vito; MEGRANAHAN, Gale; PINNEY, Katherine *et al*. Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Juglans regia* L.): implications for *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 8, n. 4, p. 219-221, 1989. https://doi.org/10.1007/BF00778537

PRABHUDESAI, Vaishali; BHASKARAN, S. A continuous culture system of direct somatic embryogenesis in microspore-derived embryos of *Brassica juncea*. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 5, p. 289-292, 1993. https://doi.org/10.1007/bf00237138

PRETOVA, A; WILLIAMS, E. Zygotic embryos cloning in oilseed (*Brassica napus* L.). **Plant Science**, v. 47, n. 3, p. 195-198, 1986. https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90178-0

PUIDERRAJOLS, Pere; MIR, Gisela; MOLINAS, Marisa. Ultrastructure of Early Secondary Embryogenesis by Multicellular and Unicellular Pathways in Cork Oak (*Quercus suber* L.). **Annals of Botany**, v. 87, n. 2, p. 179-189, 2001. https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1317

QUIALA, Elisa; BARBÓN, Raúl; Mestanza Saúl *et al*. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf of the interspecific hybrid of mahogany (*Swietenia macrophylla King x S.* mahagoni (L.) Jacq.). **Trees,** v. 36, p. 167-178, 2021. https://doi.org/10.1007/s00468-021-02192-x

QUIROZ, Francisco; ROJAS, Rafael; GALAZ, Rosa *et al*. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 86, n. 3, p. 285-301, 2006. https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6

RADOJEVIĆ, Ljiljana. *In Vitro* Induction of Androgenic Plantlets in *Aesculus hippocastanum.* Protoplasma, v. 96, p. 369-374, 1978. https://doi.org/10.1007/BF01287696

RAEMAKERS, C; JACOBSEN, E; VISSER, R. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica, v. 81, p. 93-107, 1995. https://doi.org/10.1007/BF00022463

RAHMOUNI, Safaâ; EL ANSARI, Zineb; BADOC, Alain *et al*. Effect of Amino Acids on Secondary Somatic Embryogenesis of Moroccan Cork Oak (*Quercus suber* L.) Tree. **American Journal of Plant Science**, v. 11, n. 5, p. 626-641, 2020. https://doi.org/10.4236/ajps.2020.115047

RAI, Ravishankar; MCCOMB, J. Direct somatic embryogenesis from mature embryos of sandalwood. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 69, n. 1, p. 65-70, 2002. http://dx.doi.org/10.1023/A:1015037920529

RAMÍREZ, Maribel; DE GARCÍA, Eva. Secondary Somatic Embryogenesis in Banana CIEN-BTA-03 (*Musa* sp. AAAA) and Regeneration of Plants. **Acta Horticulturae**, v. 829, p. 45-50, 2009. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.829.4

RAOMANI, Shiveirou; KUMARIA, Suman; TANDON, Pramod. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of the medicinal plant, *Paris polyphylla* Sm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 118, n. 3, p. 445-455, 2014. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0496-2

RASHID, L; STREET, E. The development of haploid embryoids from anther cultures of *Atropa belladonna* L. **Planta**, v. 113, n. 3, p. 263-270. https://doi.org/10.1007/BF00390513

RASHID, L; STREET, E. Growth, embryogenic potential and stability of a haploid cell culture of *Atropa belladonna*. **Plant Science Letters**, v. 2, n. 2, p. 89-94,1974. https://doi.org/10.1016/0304-4211(74)90063-7

REMOTTI, Patrizio. Primary and secondary embryogenesis from cell suspension cultures of Gladiolus. **Plant Science**, v. 107, n. 2, p. 205-214, 1995. https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04106-5

RUGINI, E; CARICATO, G. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) "Canino" and "Moraiolo". **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 257-260, 1995. https://doi.org/10.1007/bf00233645

RYSCHKA, Sieglinge; RYSCHKA, Ulrich; SCHULZE, Jutta. Anatomical Studies on the Development of Somatic Emhryoids in Wheat and Barley Explants. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 187, n. 1, p. 31-41, 1991. https://doi.org/10.1016/S0015-3796(11)80183-6

SAEED, Taiba; SHAHZAD, Anwar. High frequency plant regeneration in Indian Siris via cyclic somatic embryogenesis with biochemical, histological and SEM investigations. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 623-637, 2015. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.060

SAKER, M. *In vitro* regeneration of onion through repetitive somatic embryogenesis. **Biologia Plantarum**, v. 40, n. 4, p. 499-506, 1997. https://doi.org/10.1023/A:1001788700469

SALUNKHE, C; RAO, P; MHATRE, M. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *Vitis latifolia* L. **Plant Cell Reports**, v.18, n 7-8, p. 670-673, 1999. https://doi.org/10.1007/s002990050640

SALY, Sabine; JOSEPH, Claude; CORBINEAU; Françoise. Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea*) as related to ethylene. **Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 3, p. 287–294, 2002. https://doi.org/10.1023/A:1020856112765

SANÉ, Djibril; ABERLENC, Frederique; GASSAMA, Y., *et al*. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). Annals of Botany, v. 98, n. 2, p. 301-308, 2006. http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcl104

SANGRA, Ankush; SHAHIN, Lubana; DHIR, Sarwan. Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa*) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach. **Plants**, v. 8, n. 8, p. 278-293, 2019. https://doi.org/10.3390/plants8080278

SANTA CATARINA, Claudete; DOS SANTOS, Alessandra; DE ANDRADE, Geraldine *et al*. Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of somatic embryo developmental stage and dehydration.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO), v. 78, p. 55-62, 2004. https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020395.40974.8a

SANTAREM, Eliane; PELISSIER, Bernard; FINER, John. Efect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,** v. 33, n. 1, p. 13-19,1997. http://dx.doi.org/10.1007/s11627-997-0034-6

SELLARS, Rebecca; SOUTHWARD, G; PHILLIPS, Gregory. Adventitious Somatic Embryogenesis from Cultured Immature Zygotic Embryos of Peanut and Soybean. **Crop Science**, v. 30, n. 2, p. 408-414, 1990. https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000020035x

SHAMARI, Magda; RIHAN, Hail; FULLER, Michael. An Effective Protocol for the Production of Primary and Secondary Somatic Embryos in Cauliflower (*Brassica Oleraceae* Var. Botrytis). **Agricultural Research & Technology: Open Access Journal**, v. 14, n. 1, p. 38-46, 2018. http://dx.doi.org/10.19080/ARTOAJ.2018.14.555908

SHI, Xueping; DAI, Xigang; LIU, Guofeng *et al*. Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, p. 117-125, 2010. https://doi.org/10.1007/s11627-009-9272-0

SHUAIYU, Zou; YAO, Xiaohong; ZHONG, Caihong *et al*. Recurrent somatic embryogenesis and development of somatic embryos in *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz (Lardizabalaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 139, n. 3, p. 493-504, 2019. https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-019-01686-4

SINGH, Mithilesh; CHATURVEDI, Rakhi. An Efficient Protocol for Cyclic Somatic Embryogenesis in Neem (*Azadirachta indica* A Juss.). **Proceedings of Internatiotal Conference on Energy and Environment**, v. 1, n. 1, p. 656-658, 2009.

SIVANESAN, Iyyakkannu; SON, Moon; JANA, Sonali *et al*. Secondary somatic embryogenesis in *Croccus vernus* (L.) Hill. **Propagation Ornamental Plants**, v. 12, n. 3, p. 163-170,2012.

ŚLIWIŃSKA, Anita; OLSZOWSKA, O; FURMANOWA, M., *et al*. Rapid multiplication of *Polyscias filicifolia* by secondary somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 44, n. 2, p. 69-77, 2008. http://dx.doi.org/10.1007/s11627-008-9132-3

SMITHA, P; BINOY, K; NAIR, Ashalatha. Enhanced Secondary Somatic Embryogenesis in Suspension Culture of Four Diploid Banana Cultivars from Kerala. International Journal of Fruit Sciences, v. 2, p. 617-626, 2020. https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1753138

SONSTAD, D; CONGER, B. Direct embryogenesis from cultured anthers and pistils of *Dactylis glomerata*. **American Journal of Botany**, v. 73, n. 7, p. 989-992, 1986. https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1986.tb08542.x

SOONTHORNKALUMP, Sutthinut; NAKKANONG, Korakot; MEESAWAT, Upatham. *In vitro* cloning via direct somatic embryogenesis and genetic stability assessment of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Stein: the endangered Venus's slipper orchid. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, p. 265-276, 2019. https://doi.org/10.1007/s11627-019-09981-7

SOUTHWORTH, Darlene; KWIATKOWSKI, Stephen. Somatic embryogenesis from immature embryos in meadowfoam (*Limnanthes alba*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 24, p. 193-198,1991. https://doi.org/10.1007/BF00033476

STEINMACHER, Douglas; GUERRA, Miguel; SAARE, K., *et al*. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1463-1475, 2011. http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr033

STEINMACHER, Douglas; KROHN, Nadia; DANTAS, Adriana *et al*. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 699–709, 2007. http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm153

SZABADOS, László; HOYOS, Rodrigo; ROCA, William. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 3, p. 248-251, 1987. http://dx.doi.org/10.1007/BF00268492

SZEWCZYK, Bożena; PAWŁOWSKA, Bożena. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from seedlings of *Hepatica nobilis* Schreb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 120, n. 3, p. 1203-1207, 2015. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0661-7

TANG, Hauru; REN, Zhenglong; KRCZAL, Gabi. Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars (*Prunus cerasus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 83, n. 2, p. 109-126, 2000. http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00073-4

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

TEJAVATHI, D; SITA, G; SUNITA, A. Somatic embryogenesis in Flax. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 63, n. 2, p. 155-159, 2000. https://doi.org/10.1023/A:1006469900025

TENNING, Paul; WREMERTH, E; KJARSGAARD, Ulla *et al*. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Science, v. 81, n. 1, p. 103-109, 1992. http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(92)90029-L

THENGANE, S; DEODHAR, S; BHOSLE, S., *et al*. Repetitive somatic embryogenesis and plant regeneration in *Garcinia indica* Choiss. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 3, p. 256-261, 2006. https://doi.org/10.1079/IVP2006763

THOMAS, Emry; HOFFMANN, Franz; POTRYKUS, Ingo *et al*. Protoplast Regeneration and Stem Embryogenesis of Haploid Androgenetic Rape. **Molecular and General Genetics**, v. 145, p. 245-247, 1976. https://doi.org/10.1007/BF00325819

TOKUYI, Yoshihiko; MIZUE, Yuka; MASUDA, Hiroshi. Effects of methyljasmonate and concanavalin A on embryogenesis and the induction of secondary somatic embryos of carrot. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 9, p. 1675-1678, 1995. https://doi.org/10.1271/bbb.59.1675

TRIGIANO, R; GRAY, D; CONGER, B., *et al*. Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. **Botanica Gazette**, v. 150, n. 1, p. 72-77, 1989.

TROCH, Veronique; WERBROUCK, Stefaan; GEELEN, Danny *et al*. Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 98, n. 1, p. 115-123, 2009. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-009-9544-8

TULECKE, Walt; MCGRANAHAN, Gale. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. **Plant Science**, v. 40, n. 1, p. 57-63, 1985. https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90163-3

UDAYABHANU, Jinu; HUANG, Tiandai; XIN, Shichao *et al*. Optimization of the Transformation protocol for increased efficiency of genetic Transformation in *Hevea brasiliensis*, **Plants,** v. 11, n. 8. p. 1067-1080, 2022. https://doi.org/10.3390/plants11081067

VASIC, Dragana; ALIBERT, G; SKORIC, D. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 2, p. 121-125, 2001. https://doi.org/10.1007/s002990000291

VASIL, Vimla; VASIL, Indra. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Suspension Cultures of Pearl Millet (*Pennisetum americanum*). **Annals of Botany**, v. 47, n. 5, p. 669-678, 1981. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086064

VASIL, Vimla; VASIL, Indra. The ontogeny of somatic embryos of *Penisetum americanum* (L.) K. Schum. I. in cultured inmature embryos. Botanica Gazette, v. 143, n. 4, p. 454-465, 1982.

VIEITEZ, Ana; BARCIELA, Jesus. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 21, p. 267-274, 1990. https://doi.org/10.1007/BF00047620

VIEITEZ, Javier; BALLESTER, Antonio; VIEITEZ, Ana. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica*. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 12, p. 609-613, 1992. https://doi.org/10.1007/BF00236383

VON ARNOLD, Sara. Improved Efficiency of Somatic Embryogenesis in Mature Embryos of *Picea abies* (L.) Karst. **Journal of Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 233-244, 1987. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80237-7

VOOKOVÁ, B; MATUSOVÁ, R; KORMUTÁK, A. Secondary somatic Embryogenesis in *Abies mumidica*. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 4, p. 513-517, 2003. https://doi.org/10.1023/A:1024899124774

VOOKOVÁ, B; KORMUTÁK, A. Comparison of induction frequency, maturation capacity and germination of *Abies numidica* during secondary somatic embryogenesis. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 4, p. 785-788, 2006. http://dx.doi.org/10.1007/s10535-006-0132-z

WALTHER, Madlen; WAGNER, Isabel; RASCHKE, Juliane *et al*. Abscisic acid induces somatic embryogenesis and enables the capture of high-value genotypes in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* [MIRB] Franco). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 148, p. 45-59, 2022. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02159-3

WANG, T.D.; HUANG, T.D.; HUANG, H.S *et al*. Origin of Secondary Somatic Embryos and stability genetic of the Regenerated Plants in *Hevea brasiliensis*, **Journal of Rubber Research**, v. 20, n. 2, p. 101-116, 2017. https://doi.org/10.1007/BF03449145

WIJESEKARAA, K; IQBAL, M. Absence of meristems in androgenic embryos of *Datura metel* (L.) induces secondary embryogenesis *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 287-294, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.007

WILLIAMS, E; MAHESWARAN, G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group**. Annals of Botany**, v. 57, n. 4, p. 443-462, 1986. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127

WÓJCIKOWSKA, Barbara; GAJ, Malgorzata. Somatic Embryogenesis in Arabidopsis. In: Loyola V, Ochoa N (eds.), Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Switzerland: Springer International, p. 185-199, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_11

WONGTIEM, P; COURTOIS, D; FLORIN, B., *et al*. Effects of cytokinins on secondary somatic embryogenesis of selected clone Rayong 9 of *Manihot esculenta* Crantz for ethanol production. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 9, p. 1600-1608, 2011.

WU, Bihua; ZHENG, Youliang; LUO, Jianming. Secondary somatic embryo production from somatic embryo *in vitro* of bread wheat (*Triticum aestivum*). **Southwest China Journal Agricultural Science**, v. 18, n. 4, p. 373-377, 2005.

XING, Wen; BAO, Yin; LUO, Ping *et al*. An efficient system to produce transgenic plants via cyclic leave-originated secondary somatic embryogenesis in *Rosa rugosa.* **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 8, p. 2013-2023, 2014. http://dx.doi.org/10.1007/s11738-014-1578-9

XING, Z; SHEN, H; ZHAO, L., *et al*. Somatic cell embryogenesis *Acanthopanax senticosus*. **China Trad Herb Drugs**, v. 37, n. 5, p. 769-772, 2006. (ABSTRACT)

YAN, Juan; WANG, Yongqing; LI, Junqiang *et al*. Morphological and histological observations on the induction of anther calluses and embryos in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). **African Journal Agricultural Research**, v. 7, n.1, p. 123-127, 2012.

YANG, Ling; WANG, Jianan; BIAN, Lei *et al*. Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in mountain ash (*Sorbus pohuashanensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 111, n. 2, p. 173-182, 2012a. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-012-0181-2

YANG, Jingli; WU, Songquan; LI, Chenghao. High Efficiency Secondary Somatic Embryogenesis in *Hovenia dulcis* Thunb. through Solid and Liquid Cultures. **Scient World Journal**, v. 2013, n. 2, p. 1-6, 2013. http://dx.doi.org/10.1155/2013/718754

YANG, Jingli; ZHOU, Chenguang; LIU, Lihui *et al*. High conversion frequency of germinated somatic embryos of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus* Maxim) using a bubble column bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 110, p. 289-298, 2012b. https://doi.org/10.1007/s11240-012-0150-9

YOU, Cui; FAN, Ting; GONG, Xue *et al*. high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 107, n. 2, p. 233-242, 2011. https://doi.org/10.1007/s11240-011-9974-y

ZDRAVKOVIĆ, Snežana; CALIĆ, Dusica; UZELAC, Branca *et al*. Secondary somatic embryogenesis versus caulogenesis from somatic embryos of *Aesculus carnea* Hayne.: developmental stage impact. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 94, n. 2, p. 225-231, 2008. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9399-4

ZEGZOUTI, Redouane; ARNOULD, Marie; FAVRE, Jean. Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Quercus robur* L. **Annals of forest Science**, v. 58, n. 6, p. 681-690, 2001.

ZHANG, CI; CHEN, Dong; KUBALAKOVA, Marie *et al*. Efficient somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 93, n. 2, p. 209-221, 2008. http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9364-2

ZHENG, Qi; DESSAI, Ananta; PRAKASH, Channapatna. Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 6, p. 381-385, 1996. https://doi.org/10.1007/bf00232059

ZHOU, Chenguang; LIU, Likun; LI, Chenghao. Microarray Analysis of Siberian Ginseng Cyclic Somatic Embryogenesis Culture Systems Provides Insight into Molecular Mechanisms of Embryogenic Cell Cluster Generation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p 1-13, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094959

ZHOU, Qi; DAI, Lingmin; CHENG, Siyan *et al*. A circulatory system useful both for long-term somatic embryogenesis and genetic transformation in *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)**, v. 118, n. 1, p. 157-168, 2014. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0471-y

ZIV, Meira; GADASI, Geula. Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by active charcoal in solid/liquid double-layer cultures. **Plant Science**, v. 47, n. 2, p. 115-122, 1986. https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90058-0

Autores

Rafael Fernández Da Silva[1,*], María Daniela Artigas Ramírez[2], Zoraya De Guglielmo Cróquer[3]

1. University of Carabobo, Faculty Experimental of Science and Technology, Department of Biology, Center of Applied Biotechnology Center (CBA), Valencia, Venezuela.
2. María Daniela Artigas Ramírez, Tokyo University of Agriculture and technology (TUAT), United Graduate School of Agricultural Science, Department of Biological Production Science, Tokyo, Japan.
3. Zoraya De Guglielmo Cróquer, Molecular Genetic Laboratory, Oncology and Hematology Institute, MPPS, Caracas, Venezuela.

* corresponding author: rafaelfer21031970@gmail.com

CAPÍTULO 2

Uso de bioestimulantes na produção agrícola

Luan Martin Arejano, Rafael Miritz Bartz, Thalia Strelov dos Santos, Guilherme Hirsch Ramos, Gizele Ingrid Gadotti, Maurizio Silveira Quadro

https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-08-4.c2

Resumo

O presente estudo tem como objetivo observar e analisar resultados da aplicação de bioestimulantes na produção agrícola de diversas culturas, através de revisão bibliográfica extensiva. Com a evolução da produção agrícola nas últimas décadas e a explosão no crescimento populacional mundial, há a constante demanda por métodos mais eficientes de produção alimentícia e menos impactantes sobre o meio ambiente e a sanidade humana e animal, dando o termo conhecido como "agricultura sustentável", no qual é possível produzir mais com menos recursos. Os bioestimulantes promovem a melhora da floração, do crescimento das plantas, da frutificação, da produtividade das culturas e uma maior eficiência do uso de nutrientes, além de serem capazes de melhorar a tolerância da planta contra uma ampla gama de estresses abióticos. Estas substâncias podem ser aplicadas através do tratamento de sementes, por meio de sulco, na forma localizada no colo da planta, e até mesmo por pulverização foliar. As diferentes aplicações promovem respostas favoráveis das plantas em diversos processos metabólicos, uma vez que são constituídos por reguladores vegetais ou sintéticos, com vitaminas e micronutrientes, podendo ser divididos em quatro grupos principais: biorreguladores, aminoácidos, substâncias húmicas e extrato de algas. O mercado de bioestimulantes tem evoluído, e este crescimento é atribuído à implantação de práticas sustentáveis na agricultura, a fim de limitar o uso de químicos prejudiciais, promovendo uma menor toxicidade tanto para o ambiente como para a saúde humana. Dessa forma, a utilização de bioestimulantes se torna uma alternativa sustentável para uma produção agrícola mais eficiente. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para comprovar seus benefícios na aplicação em diversas culturas. Por conta disso, existe o interesse de incrementar esse setor, pelo qual este estudo visualiza como inovador e diferencial.

Palavras-chaves: agricultura, bioestimulantes, eficiência, sustentabilidade.

Rafael Fernández Da Silva (Org.) © 2022 Mérida Publishers CC-BY 4.0

1. Introdução

A produção agrícola está em constante evolução a fim de suprir o aumento da produtividade necessária para alimentar a crescente população global concomitante ao aumento da eficiência do uso dos recursos naturais, para que haja a redução dos impactos tanto para o meio ambiente como para a saúde humana (ROUPHAEL, COLLA; 2020). De acordo com o *Departament of Economic and Social Affairs - Populations Dynamics* (UNITED NATIONS, 2019), a estimativa é que a população mundial alcance 9,6 bilhões de pessoas até o ano de 2050, o que representa um aumento de 18% da população atual. Além disso, as alterações climáticas tem-se intensificado ao longo dos anos, principalmente em decorrência do aquecimento global, que resulta em limitações na produção de alimentos, em que as perdas em produtividade por conta de estresses abióticos podem atingir até 70% da produção (GOMEZ-ZAVAGLIA; MEJUTO; SIMAL-GANDRA, 2020; YAKHIN et al., 2017).

Nesse cenário, manter a produção das culturas para que haja suprimento de alimentos à toda população sem a necessidade da ampliação da área cultivada é necessário a utilização de insumos como fertilizantes e pesticidas, que desempenham um papel crucial no aumento do rendimento e produtividade contínua ao longo das estações, o que promove uma maior segurança ao produtor na produção. Atualmente, a adição de nutrientes no solo representa grande parte dos investimentos dos produtores (ROUPHAEL, COLLA; 2020; MARSCHNER, 2012).

O Brasil possui forte dependência de fertilizantes como potássio (K), nitrogênio (N) e fósforo (P), que são provenientes, principalmente, do mercado externo. Nos últimos três anos, o país importou cerca de 20,2 milhões de toneladas de fertilizantes. Esta dependência acarreta importantes consequências políticas e econômicas para o país, já que a produção agrícola é responsável por R$ 1,2 bilhões e 21,46 % do PIB brasileiro (ZANDONADI, 2016).

Além disso, o uso de sementes de alta qualidade também é um dos parâmetros para que o produtor obtenha sucesso na produção, de forma a garantir boa germinação e emergência das plântulas (Lauxen et al, 2010). Para isso, o uso de produtos para a incorporação de aditivos às sementes intensificou-se a cada ano, sendo a principal características desses aditivos, a possibilidade de a semente conseguir germinar mesmo em condições edafoclimáticas

desfavoráveis ou ser atingidas por problemas acarretados por patógenos (SILVA, 2016).

O desenvolvimento de metodologias e produtos para o manejo e controle de fungos e bactérias nas plantas tornou-se uma necessidade da agricultura moderna, sendo fundamental a diminuição do uso de práticas que alteram e reduzem a biodiversidade (STADNIK; MARASCHIN, 2004). Diferentes inovações tecnológicas foram propostas nas últimas três décadas para promover a redução significativa de agroquímicos sintéticos e aumentar a sustentabilidade da produção agrícola, dentre essas inovações encontra-se o uso de bioestimulantes, que são produtos promissores com vistas à mitigação de tais problemas (ROUPHAEL, COLLA; 2020).

Os bioestimulantes promovem a melhora da floração, do crescimento das plantas, a frutificação, a produtividade das culturas e uma maior eficiência do uso de nutrientes, além de serem capazes de melhorar a tolerância da planta contra uma ampla gama de estresses abióticos (ROUPHAEL, COLLA; 2020). A presença de extratos naturais confere às plantas benefícios fisiológicos relacionados ao balanço hormonal e osmoproteção, que atua no interior das células vegetais, realizando a proteção contra a desidratação das plantas, e mantendo suas atividades metabólicas em níveis adequados, mesmo em situações adversas (CAVALCANTE et al., 2020).

Os bioestimulantes podem ser aplicados através do tratamento de sementes, por meio de sulco, na forma localizada no colo da planta, e até mesmo por pulverização foliar. As diferentes aplicações promovem respostas favoráveis das plantas em diversos processos metabólicos (RAMOS et al., 2015). Dessa forma, os bioestimulantes são constituídos por reguladores vegetais ou sintéticos, com vitaminas e micronutrientes, podendo ser divididos em três grupos principais: aminoácidos, substâncias húmicas e extrato de algas (DU JARDIN, 2015). Segundo Macedo et al. (2015), existe uma grande variedade de bioestimulantes no Brasil, dentre os produtos mais estudados, encontram-se o Stimulate, Promalin e GA+2,4-D, que são avaliados em diversos trabalhos em associação com biorreguladores nas mais variadas culturas.

A utilização destes produtos biológicos tem-se intensificado no Brasil. De acordo com a pesquisa divulgada pela *Business Intelligence* Panel Safra 2019-20, realizada pela Spark Inteligência Estratégica, os produtos biológicos

movimentam cerca de R$ 930 milhões, o que representa 2,5% do faturamento do setor de proteção de cultivos no Brasil. Em 2018, o mercado de bioestimulantes ultrapassou US $ 2,3 bilhões, e a estimativa é que esse mercado atinja R$ 3,7 bilhões no país até o ano de 2030.

O mercado de bioestimulantes tem evoluído, e este crescimento é atribuído à implantação de práticas sustentáveis na agricultura, a fim de limitar o uso de químicos prejudiciais, promovendo uma menor toxicidade tanto para o ambiente como para a saúde humana. Em relação aos cultivos, em 2016, o segmento que obteve maior adoção de bioestimulantes foi a cultura de cana-de-açúcar, algodão e milho. Já em questão do método de aplicação, o segmento foliar obteve maior participação no mercado, em função da eficiência promovida através de uma aplicação mais simples e com absorção mais rápida (GOTTEMS, 2017).

Dessa forma, a utilização de bioestimulantes torna-se uma alternativa sustentável para a produção de uma agricultura mais eficiente tanto em relação a produtividade, como também para a segurança do meio ambiente. Mesmo sendo uma técnica benéfica, sua utilização ainda é pouca divulgada, sendo necessária a realização de pesquisas que possam comprovar sua utilização nas mais diversas culturas. Por conta disso, o presente estudo tem como objetivo a realização de uma pesquisa bibliográfica a fim de buscar informações sobre a utilização dos bioestimulantes no setor agrícola.

2. Bioestimulantes

Desde que se iniciaram os estudos e pesquisas sobre os bioestimulantes, diversas foram as definições empregadas pelos autores. De acordo com a definição de Yakhin et al. (2017), bioestimulantes não necessitam exclusivamente possuir nutrientes vegetais, reguladores de crescimento ou compostos protetores de plantas, bastando apenas ter um efeito positivo na produtividade da planta, através de propriedades novas ou emergentes do complexo de constituintes, desde que sejam biológicos.

A fim de regularizar e apresentar uma definição aceitável, a União Europeia - UE (UE, 2019) nomeou os bioestimulantes como um produto fertilizante cuja função é estimular os processos de nutrição das plantas,

independentemente do teor de nutrientes do produto, com o único objetivo de melhorar pelo menos uma das seguintes características das plantas ou da sua rizosfera: eficiência na utilização dos nutrientes; tolerância ao estresse abiótico; características de qualidade, ou disponibilidade dos nutrientes no solo ou na rizosfera. No mesmo regulamento da UE são impostas limitações de contaminantes que podem vir a estar presentes em bioestimulantes fabricados, alguns deles sendo chumbo, níquel, mercúrio e arsênio inorgânico.

Bioestimulantes ainda foram ditos como sendo a mistura de dois ou mais reguladores vegetais ou de reguladores vegetais com outras substâncias, sendo elas, aminoácidos, nutrientes e vitaminas. Com essa mistura de componentes, dependendo da sua composição, concentração e proporção, podem vir a influenciar o crescimento vegetal, através da estimulação da divisão celular, alongamento de células e no aumento de absorção e a utilização de água e de nutrientes (VIEIRA, 2001).

3. Tipos de Bioestimulantes

Os bioestimulantes surgiram como uma nova e potencial categoria de insumos agrícolas, complementando agroquímicos, incluindo fertilizantes e pesticidas sintéticos. Devido às matrizes complexas contendo diferentes grupos de moléculas bioativas e sinalizadoras, é importante caracterizar os componentes bioativos e elucidar os mecanismos de estimulação molecular e fisiológica, sendo este um interesse para a comunidade científica e empresas comerciais (ROUPHAEL et al., 2018).

Os bioestimulantes podem ser sintéticos ou naturais, que são compostos por substâncias como hormônios vegetais, macro e micronutrientes, aminoácidos, proteínas e microorganismos que afetam a fisiologia das plantas quando aplicados em determinadas quantidades (CALVO et al., 2014). Segundo Du Jardin (2015), os bioestimulantes podem ser classificados em três grupos principais conforme sua composição: extratos de algas, proteínas hidrolisadas (peptídeos e aminoácidos livres) e substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos).

3.1. Extratos de algas

A utilização de extratos de algas tem crescido nos últimos anos, por ser uma alternativa eficiente de fertilizante capaz de melhorar o desempenho das culturas agrícolas (KUMAR; SAHOO, 2011). Sua composição constitui-se de uma mescla de compostos orgânicos e inorgânicos que contém materiais de origem de carboidratos, minerais, osmólitos, metabólitos secundários, aminoácidos, vitaminas e hormônios de crescimento vegetal (BATTACHARYYA et al., 2015). Anualmente, são utilizados como bioestimulantes na agricultura uma parcela considerável dos produtos derivados dos mais de 15 milhões de toneladas métricas de algas marinhas colhidas, sendo contabilizados cerca de 25 produtos comercializados até o momento (CARVALHO, 2013).

Os extratos de algas podem ser formados a partir de hidrólise alcalina ou ácida e por extração aquosa. Os extratos de algas formados a partir da alga *Ascophyllum nodosum*, sendo a mais utilizada industrialmente, são formados a partir da mistura da biomassa da alga com uma solução de hidróxido de sódio ou de potássio, em temperaturas de 70 a 100 °C, fazendo com que ocorra o rompimento dos complexos polissacarídeos e surja oligômeros menores e de baixo peso molecular. Segundo Craigie (2011), a hidrólise alcalina tem o potencial de gerar novos compostos que antes não estavam presentes, a partir da interação química entre o hidróxido escolhido e a composição da macroalga, gerando ácidos monocarboxílicos e dicarboxílicos. Na hidrólise ácida é utilizado ácido sulfúrico ou clorídrico, em temperaturas de 40 a 50°C, por 30 minutos (SHARMA et al., 2014). De acordo com Ale et al. (2012), a hidrólise ácida é responsável por extrair os polissacarídeos sulfatados que contém fucose. De acordo com Sharma et al. (2014), o método de extração aquosa, corresponde a hidratação de uma farinha de algas marinhas desidratadas, onde estão os compostos dos bioestimulantes que serão recolhidas em seguida, para a separação, ocorre métodos de filtração para selecionar os compostos de interesse para o bioestimulante final.

Os extratos de algas possibilitam alta resistência ao estresse osmótico das plantas, além de reduzir a degradação de proteínas, evitando a oxidação dos cloroplastos e um atraso na senescência foliar que prolonga a atividade fotossintética da planta. Além disso, também atuam na absorção de nutrientes quando aplicados sob condições de crescimento abaixo do ideal ou sob estresse

ambiental (CROUCH; VAN STADEN, 1994; JANNIN et al., 2013). Produtos obtidos a partir do extrato da alga *Ascophyllum nodosum (L.)* tem sido utilizado como bioestimulante em diversas culturas, sendo frequentemente usada na comunidade Europeia através de aplicação via foliar ou diretamente no solo (UGARTE et al., 2006). O seu extrato possui a propriedade de estimular o crescimento vegetal devido à sua composição rica em macro e micronutrientes, carboidratos, aminoácidos e hormônios vegetais (ABREU et al., 2008).

Os hormônios vegetais são moléculas sintetizadas em pequenas concentrações pelos vegetais, que são capazes de produzirem mudanças metabólicas na célula. Dentre os fatores que regulam a germinação, encontram-se os hormônios vegetais citocininas, giberelinas e auxina (TAIZ; ZEIGER, 2004). A citocinina possui a capacidade de atrasar a senescência foliar das plantas, além de realizar a divisão celular e promover a formação de gemas laterais e desenvolvimento radicular. A giberelina realiza o alongamento celular, estimulando a divisão da célula além de induzir a germinação das sementes. E a auxina estimula o crescimento vegetal, atuando na alteração da parede celular, o que proporciona a expansão e diferenciação da célula.

Nas algas, as citocininas estão presentes na sua composição, sendo essa a razão de promoverem a divisão celular. Além disso, o extrato de algas pode estimular a atividade de síntese da fitoalexina capsidiol e peroxidases em plantas, aumentando a sua resistência às doenças (ABREU et al. 2008). Os benefícios apresentados dos extratos de algas são dependentes da atuação de diversos fatores como a dose empregada, o modo e a frequência de aplicação, tipo de alga utilizada e as condições na qual foi coletada, também a nutrição utilizada na cultura deve ser levada em conta, bem como a espécie e cultivar na qual foram aplicados os produtos, o que explica os resultados divergentes encontrados nos trabalhos (CASTRO, 2001).

Em análise, Fernandes (2019) fez uma avaliação de doses de bioestimulante à base de extrato de algas e silício e sua influência em arroz, com e sem a presença de *Pyricularia grisea* e verificou que com o inóculo e com a aplicação de doses de bioestimulantes houve maior massa de matéria seca de parte aérea. Ainda temos o *Trichoderma* que age como um bioestimulante, propiciando um desenvolvimento melhor das raízes mediante a geração de

fitohormônios, fazendo com que a planta eleve a massa de raízes e melhore sua absorção de nutrientes e água (Harman et al., 2004).

Kocira et al. (2013) realizaram um experimento de aplicação de extrato de *Ecklonia maxima* em feijões (*Phaseolus vulgaris* L.), em que qualquer uma das aplicações do extrato, seja 0,2% ou 0,4%, fazia com que a massa das sementes e número de vagens superasse o grupo de controle, que não teve aplicação do extrato. Já Seif et al. (2016) realizaram estudos sobre a aplicação foliar de extrato de algas sobre vagens, para verificar seu crescimento e produção. Foram utilizados extratos de algas marinhas (3 mL/L), algas de água doce (1 mL/L), uma mistura entre ambos os extratos e controle (água destilada). A aplicação de qualquer tipo de extrato resultou em melhores parâmetros do que o grupo de controle, com a superior sendo a mistura de extratos, seguido pelo extrato de alga marinha.

Ainda Garcia-Gonzalez & Sommerfeld (2016) mostram na forma de células vivas, extratos celulares e biomassa seca, a aplicabilidade da microalga *Acutodesmus dimorphus* em plantas de um tomateiro. No estudo, a aplicação do bioestimulante foi feita a partir de tratamento de sementes, aspersão foliar e biofertilizante. Se verificou que todas as formas de aplicação incitaram a germinação, crescimento e rendimento nos tomateiros.

3.2. Proteínas hidrolisadas

As proteínas hidrolisadas incluem a síntese industrial de aminoácidos através de hidrólise química ou enzimática, ou até mesmo de ambas, de subprodutos agroindustriais de origem animal ou vegetal e biomassa de culturas (CAVANI et al., 2006). Os aminoácidos estão presentes em diferentes composições, sendo livres em oligopeptídeos de cadeia curta, até 10 aminoácidos e em polipeptídeos de cadeia longa com mais de 10 aminoácidos. Com a união dos aminoácidos, se formam as proteínas e dependendo da quantidade e da sua organização é determinada as propriedades fisiológicas e biológicas dos bioestimulantes. Através de reações enzimáticas através de processos de aminação e transaminação, as plantas sintetizam os aminoácidos. A aminação é feita por sais de amônio absorvidos do solo e ácidos orgânicos e a transaminação é a formação de novos aminoácidos a partir de alguns pré-existentes (SABORIO, 2002).

Para a produção do bioestimulante de proteínas hidrolisadas são utilizadas a hidrólise química, tanto a ácida como a alcalina, térmica e enzimática (COLLA et al., 2015; DU JARDIN, 2015; HALPERN et al., 2015). Os processos fisiológicos nas plantas são regulados por aminoácidos livres de cadeia curta, que podem atuar como agentes antiestresse, fonte de nitrogênio e precursores de hormônios, além de atuarem como aditivos com inseticidas e fungicidas e como agentes latentes (RAI, 2002; MAEDA; DUDAREVA, 2012).

A aplicação dos nutrientes em conjunto com os aminoácidos torna-se mais eficiente durante o processo de sua assimilação e incorporação nos tecidos vegetais da planta, em que nutrientes quelatos com aminoácidos formam moléculas eletricamente neutras e muito pequenas que aceleram sua absorção e transporte dentro da planta (ASHMEAD, 1986). A assimilação dos aminoácidos nas plantas é realizada através da sua incorporação ao metabolismo vegetal, como se fossem sintetizados pela planta sem haver gasto energético, o que melhora a nutrição das culturas, principalmente nas fases críticas de desenvolvimento da planta (JONES; KIELLAND, 2002; TEJADA et al, 2016).

Francesca et al. (2022) utilizaram bioestimulantes à base de proteínas hidrolizadas para identificar as respostas fisiológicas de dois tipos de fenótipo de tomate que mais se adaptam a situações de estresse abiótico. Puderam identificar que os aminoácidos livres auxiliam no crescimento das plantas tratadas e aumentou suas características fotossintéticas e fotoquímicas, supondo uma relação disso com a presença de glicina betaína e ácido aspártico na proteína hidrolisada. Por fim, o estudo demonstrou que a aplicação do bioestimulante diminuiu as respostas negativas pelo estresse, mostrando como esse tipo de bioestimulante pode ser utilizado para a proteção da cultura contra o meio ambiente.

Já Agliassa et al. (2021) foi capaz de ver pontos similares na cultura do pimentão (Capsicuum anuum L.), em que a aplicação de bioestimulante à base de proteínas hidrolisadas promoveu uma recuperação mais rápida das plantas tratadas após estresses abióticos, além de um crescimento acelerado. Ertani et al. (2013) utilizou um bioestimulante de proteínas hidrolisadas de alfafa em plantas de milho (*Zea mays* L.), também sofrendo algum tipo de estresse, sendo nesse caso salino. A utilização do bioestimulante promoveu a biomassa vegetal, mesmo sobre o estresse, provavelmente por conta da resposta do organismo às

moléculas presentes no bioestimulante que promoveram os sistemas antioxidante e de metabolismo de nitrogênio.

3.3. Substâncias Húmicas

As substâncias húmicas são componentes orgânicos quebrados formados pela decomposição de plantas e outros processos biológicos e podem ser encontradas em qualquer ambiente, seja terrestre ou aquático. Possuem várias utilidades devido a seus grupos funcionais e podem ser divididas em três tipos de acordo com sua solubilidade na água, sendo estes ácido fúlvico, ácido húmico e humina (MOTOJIMA et al., 2012). Mesmo sendo possível aplicar tais substâncias em operações agrícolas, os meios onde são encontrados, como lodo de esgoto por exemplo, podem ser extremamente tóxicos e contaminantes ao solo e água se aplicados diretamente, devendo então passar por tratamento para separação dos componentes e uma utilização correta das substâncias húmicas, assim também aumentando a valorização do tratamento de lodo de esgoto (MICHALSKA et al., 2022). A extração de substâncias húmicas normalmente é feita a partir de matérias-primas como carvão ou turfa, que são limitados e sua extração é extremamente regulamentada (CRISTINA et al., 2020). Tendo-se aberta a opção de utilizar lodo de esgoto, uma substância inevitável e poluente e que a retirada de substâncias húmicas é recomendada para o tratamento de águas residuais, se torna mais atraente a aplicação dessas substâncias em vários setores.

As substâncias húmicas são extraídas da vermicompostagem que é derivada da decomposição física, química e biológica de restos de alimentos, folhas secas, serragem e outras matérias orgânicas que, com o auxílio de minhocas, aceleram o processo de decomposição e humificação, resultando em um composto sólido (vermicomposto) e composto líquido (chorume) (AGUIAR et al., 2013). O vermicomposto é rico em nutrientes como: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio que, quando adicionados no solo, estimulam o crescimento das plantas. Além disso, estes compostos melhoram as propriedades físicas do solo, bem como o uso da água, conferindo uma maior proteção da planta contra doenças pela supressão de microrganismos patogênicos e, ainda, aumentam a atividade e diversidade biológica (FRACCHIA et al., 2006; ALBIACH et al., 2001).

A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), propõe o fracionamento químico das substâncias húmicas, o qual leva às frações que o compõem: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e huminas. Após o fracionamento químico, os ácidos fúlvicos e húmicos são as duas substâncias húmicas mais estudadas (BENITES et al., 2003). Os ácidos húmicos apresentam maior concentração de cálcio (C) e menos oxigênio (O) do que os ácidos fúlvicos, o que implica em uma maior polimerização do ácido húmico do que o ácido fúlvico, em que este contém mais agrupamento funcionais ácidos, por unidade de massa (SCHNITZER; KHAN, 1972). Esses efeitos das substâncias húmicas, principalmente da fração bioativa dos ácidos húmicos, têm despertado interesse das empresas e produtores rurais para uso no manejo de sistemas agrícolas (BALDOTTO, 2006). Yang & Li (2016) verificaram uma extração de 24% de substâncias húmicas de efluente termicamente tratado a partir do uso de cloreto férrico e sua aplicação em sementes de soja melhorou a absorção de nutrientes, reduzindo o tempo de germinação e aumentando o tamanho das raízes.

Silva et al., (2011) realizaram um trabalho de pesquisa sobre a promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas e tinha como objetivo avaliar a bioatividade das substâncias húmicas alcalino solúveis, ácidos húmicos e fúlvicos com matéria orgânica. Constataram que tanto os ácidos húmicos como as substâncias húmicas alcalinas solúveis foram eficazes em propiciar o surgimento de pelos radiculares das plantas recém-nascidas do tomateiro. Além disso, os ácidos húmicos demonstraram ter maior indução de raízes laterais na etapa incipiente do desenvolvimento do tomateiro com menor concentração.

Em outro estudo, Azcona et al. (2011) concluíram que a utilização de extratos húmicos líquidos derivados de lodo de esgoto em pimentas aumentou exponencialmente a altura, matéria seca e área foliar. Ademais, também acelerou o amadurecimento e florescimento de 12 a 14 dias antes do previsto. Isso mostra que a adição de substâncias húmicas à produção agrícola pode ser viável, desde que a sua extração e dosagem sejam adequadas para a cultura. E não somente plantas, mas também pode ser benéfica na alimentação animal: KHOLIF et al. (2021) identificaram que suplementação de humatos, que contêm todos os tipos de substâncias húmicas, em doses de 40 g por dia às vacas lactantes aumentou a digestão de nutrientes, fermentação ruminal e produção

de leite. Algo em comum visto nos estudos foi que a adição de substâncias húmicas forneceu uma maior capacidade aos organismos de absorção de nutrientes, assim melhorando suas produções.

4. O uso agrícola de bioestimulantes

A agricultura é uma atividade que está sempre se moldando e buscando alternativas que promovam com eficiência e qualidade a produtividade das culturas, pois se justifica esses novos caminhos com as práticas agrícolas que estão se desenvolvendo cada vez mais devido às condições da cultura, genótipos e a engenharia inteligente presente em campo.

Os bioestimulantes são utilizados extensivamente na agricultura, como é mostrado em diversas pesquisas, para o crescimento do desenvolvimento vegetal. O aproveitamento de compostos biológicos com suplemento de organismos naturais apresenta uma evolução com o passar dos anos nas operações agrícolas. Produtos oriundos de forma natural, como por exemplo o extrato da biomassa de algas marinhas está sendo muito utilizado na agricultura como bioestimulantes, bem como na Europa vem sendo usado de forma assídua em produtos comerciais (MASNY et al., 2004).

Como sabemos, a maior parte da matéria orgânica e resíduos dos solos é integrada por substâncias húmicas, e consequentemente essas substâncias estão se mostrando com grande importância para a agricultura, pois exibem uma habilidade de fornecimento de nutrientes às culturas, operam na contenção de cátions, retém a água, na aeração, confiscam compostos tóxicos e micronutrientes, além disso atuam na manutenção e aperfeiçoamento microbiano fazendo com que haja mais produtividade agrícola (ZANDONADI et al., 2014). Os resultados apurados nos últimos anos geram interesse em produtos à base de substâncias húmicas e na aplicação de culturas como o milho e a soja (SILVA et al., 2011).

Dessa forma, a Tabela 1 apresenta os efeitos do tratamento com bioestimulantes comerciais derivados de substâncias húmicas, extratos de alga e aminoácidos e proteínas hidrolisadas, relacionando-se os efeitos obtidos com as culturas e formas de aplicação do bioestimulante.

Tabela 1. Efeitos do tratamento de bioestimulantes em diferentes culturas.

Bioestimulante Comercial	Aplicação	Efeitos relatados	Cultura	Referência
Stimulate®	Foliar	Promoveu um aumento da produtividade em 37% em relação a testemunha	Soja	BERTOLIN et al. (2010)
	Embebição em Sementes	Aumento de produtividade e de massa seca em 25,1% e 35,8% respectivamente	Feijão	VIEIRA (2001)
Acadian®	Foliar	Aumento do peso, tamanho e firmeza dos frutos, além de maior rendimento	Uva	NORRIE et al. (2002)
Nobrico Super CoMo®	Embebição em sementes	Promoveu 11% de aumento da produtividade em relação à testemunha, além de maiores sementes por planta	Soja	HERMES (2015)
AZAL5	Diretamente no solo	Promoveu crescimento da planta e absorção de nutrientes	Canola	JANNIN et al. (2013)
	Embebição em sementes e foliar	Estimulou a germinação em 16-19%, e promoveu aumento do peso da	Milho	KULKARNI et al. (2019)

		parte aérea		
Seasol	Diretamente no solo	Aumento da resposta de crescimento das raízes	Morango	MATTNER et al. (2018)
Rygex	Foliar	Aumento do crescimento da planta e qualidade dos frutos	Tomate	DI STASIO et al. (2018)
Humifarm®	Foliar	Apresentou incrementos de produtividade (ganho de 8 sacas a mais por hectare) e superioridade nos percentuais de peneiras comparativamente ao tratamento controle	Café	SANDY et al. (2017)
Substância Húmica	Foliar	Aumento do tamanho das folhas	Alface	(MEIRELLES; BALDOTTO; BALDOTTO, 2017)

De acordo com o encontrado na literatura, o uso de bioestimulantes na agricultura é promissor e ainda deve ser explorado, principalmente em relação à sua atuação na escala celular das plantas e solo. Os bioestimulantes já apresentam inúmeros benefícios, com destaque para o aumento do crescimento e peso das plantas, aumento da produtividade e aumento do crescimento das raízes. Ademais, são necessárias pesquisas que disponham de ferramentas

para contribuir com o entendimento da melhor aplicação dos bioestimulantes, como a melhor época de aplicação e método mais eficiente.

5. Referências

ABREU, G. F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p 78-82, 2008.

AGLIASSA, C. *et al*. A new protein hydrolysate-based biostimulant applied by fertigation promotes relief from drought stress in *Capsicum annuum* L.. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 1076-1086, 2021.

AGUIAR, N.O. *et al*. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. Plant Soil 362, p. 161–174, 2013. https://doi.org/10.1007/s11104-012-1277-5

ALBIACH, R. *et al.* Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. Bioresour. Technol. v. 77, p. 109–114, 2001.

ASHMEAD, H. D. The absorption mechanism of amino acid chelates by plant cells. In: Ashmead, H. D. Foliar feeding of plants with amino acid chelates. **Noyes publications**, park ridge, NY. p. 219-235, 1986.

AZCONA, I. *et al.* Growth and development of pepper are affected by humic substances derived from composted sludge. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 174, n. 6, p. 916–924, 2011.

BALDOTTO, M. A. Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Campos dos Goytacazes, p. 100, 2006.

BATTACHARRYA, D. et al. 2015. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. Sci. Hortic.1(196):39-48. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.012.

BENITES, V.M.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A. Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo. Comunicado Técnico 16, EMBRAPA Solos, Rio de Janeiro. p. 7, 2003.

BERTOLIN, D. C. et al. Aumento da produtividade de soja com a aplicação de bioestimulantes. **Bragantia**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 339-347, 2010. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052010000200011.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOPPER, J.W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant Soil**. v. 1-2, n. 383, p. 3-41, 2014.

CARVALHO, M.E.A. Efeitos do extrato de *Ascopyllum nodosum* sobre o desenvolvimento e produção de cultivos. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado)-

Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2013.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical. Guaíba: Agropecuária, p. 132, 2001.

CAVALCANTE, W. S. et al. Eficiência dos bioestimulantes no manejo do déficit hídrico na cultura da soja. **IRRIGA**, v. 25, n. 4, p. 754-763, 2020.

CAVANI, L. *et al*. Photosensitizing properties of protein hydrolysate-based fertilizers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 24, p. 9160-9167, 2006.

COLLA, G. *et al.* (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. Sci. Hortic. 96, 28–38. doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.037.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, 2011.

CRISTINA, G. *et al*. Recovery of humic acids from anaerobic sewage sludge: Extraction, characterization and encapsulation in alginate beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 277-285, 2020.

CROUCH, I. J., VAN-STADEN, J. 1994. Evidence for rooting factors in a seaweed concentrate prepared from *Ecklonia maxima*. J. Plant Physiol.3(137):319-322

Department of Economic and Social Affairs – Populations Dynamics (United Nations). World Population Prospects 2019. https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/POP/TOT/900. Acesso em: 23 abr. 2022.

DI STASIO, E. et al. *Ascophyllum nodosum* based algal extracts act as enhancers of growth, fruit quality, and adaptation to stress in salinized tomato plants. J. Appl. Phycol., v. 30, p. 2675–2686, 2018.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, n. 1, p. 3-14, 2015.

ERTANI, A. *et al*. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant Soil**, v. 364, p. 145–158. 2013.

FERNANDES, Slloane do Valle Nogueira. **APLICAÇÃO FOLIAR DE DOSES DE BIOESTIMULANTE EM ARROZ INUNDADO**. 2019. 24 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Instituto de Ciências Agrárias, I Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-Mg, 2019.

FRACCHIA, L.; DOHRMANN, A. B.; MARTINOTTI, M. G.; TEBBE, C. C. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl Microbiol Biotechnol. 71:942–952. 2006. https://doi. org/10.1007/s00253-005-0228-y

FRANCESCA, S. *et al.* Phenotyping to dissect the biostimulant action of a protein hydrolysate in tomato plants under combined abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 179, p. 32-43, 2022.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1051–1061, 2016.

GOMEZ-ZAVAGLIA, A.; MEJUTO, J. C.; SIMAL-GANDARA, J. Mitigation of emerging implications of climate change on food production systems. **Food Research International**, v. 134, 2020. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109256.

GOTTEMS, L. Mercado de bioestimulantes deve chegar a US$ 3,29 bi em 2022. 2017. https://www.agrolink.com.br/noticias/mercado-de-bioestimulantes-deve-chegar-a-us--3-29-bi-em-2022_400842.html. Acesso em: 23 abr. 2022.

HALPERN, M., *et al.* The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. **Adv. Agron.** v. 130, p. 141–174. DOI: 10.3389/fpls.2017.00597, 2015.

HARMAN, G.E. *et al*. Trichoderma species- opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviewer**, 2: p.43-56, 2004.

HERMES, Estefani Cristiani Koner; NUNES, Joselito; NUNES, Joseli Viviane Ditzel Nunes. Influência do bioestimulante no enraizamento e produtividade da soja. Cultivando o Saber. **Anais**, v.8, 2015.

JANNIN, L. *et al*. 2013. *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Seaweed extract: microarray analysis and physiological characterization of N, C, and S metabolisms J. **Plant Growth Regul.** 1(32):31-52.

JANNIN, L. et al. *Brassica napus* Growth is Promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms. Journal of Plant Growth Regulation, v. 32, n. 1, p. 31–52, 2013.

JONES, D. L., KIELLAND, K. Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils. **Soil biol. Biochem**. v. 2, n. 34, p. 209-219, 2002.

KHOLIF, A. E. *et al.* Humic substances in the diet of lactating cows enhanced feed utilization, altered ruminal fermentation, and improved milk yield and fatty acid profile. **Livestock Science**, v. 253, 2021.

KOCIRA, A.; KORNAS, R.; KOCIRA, S. Effect assessment of kelpak sl on the bean yield (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Central European Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 67-76, 2013.

KULKARNI, M. G. et al. Bioactive molecules derived from smoke and seaweed *Ecklonia maxima* showing phytohormone-like activity in *Spinacia oleracea* L. New Biotechnology, v. 48, p. 83-89, 2019.

KUMAR, G.; SAHOO, D. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold.Journal of Applied Phycology,v.23,n.2,p251-255,2011.https://doi.org/10.1007/s10811-011-9660-9.

LAUXEN, L. R.;VILLELA, F. A.; SOARES, R. C. Desempenho fisiológico de sementes de algodão tratadas com tiametoxam. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 61-68, 2010.

MACEDO, W. R.; CAMARGO & CASTRO, P.R. Biorreguladores, bioestimulantes e bioativadores na agricultura tropical. In: VISOTTO, L. E. et al. **Avanços tecnológicos aplicados à pesquisa na produção vegetal.** Universidade Federal de Viçosa, 2015.

MAEDA, H., DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acids biosynthesis in plants. Annu. Rev. Plant biol. 2012. 1(63):73-105. Doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105439.

MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plant**s. 3. ed. Austrália: Elsevier, p. 651, 2012.

MASNY, A.; BASAK, A.; ZURAWICZ, E. Effects of foliar application of KELPAK S. L. and GOEMAR B.M. Preparations on yield and fruit quality in two strawberry cultivars. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 12, p. 23-27, 2004.

MATTNER, S.W.; MILINKOVIC, M.; ARIOLO, T. Increased growth response of strawberry roots to a commercial extract from Durvillaea potatorum and Ascophyllum nodosum. J Appl Phycol, v. 30, p. 2943–2951, 2018.

MEIRELLES, Ana Flávia Mairinck; BALDOTTO, Marihus Altoé; BALDOTTO, Lílian Estrela Borges. Produtividade da alface (*Lactuca sativa* L.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas, em condições de campo. **Revista Ceres**, [S.L.], v. 64, n. 5, p. 553-556, out. 2017. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201764050014.

MICHALSKA, J. *et al.* Characterization of humic substances recovered from the sewage sludge and validity of their removal from this waste. **EFB Bioeconomy Journal**, v. 2, 2022.

MOTOJIMA, H. *et al.* Amelioration effect of humic acid extracted from solubilized excess sludge on saline-alkali soil. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 14, n. 3, p. 169–180, 2012.

NORRIE, J.; BRANSON, T.; KEATHLEY, P. E. Marine plant extracts impact on grape yield and quality. Acta Horticulturae, v. 594, p. 315–319, 2002.

RAI, V. K. Role of amino acids in plant responses to stresses. Biol. Plant. 4(45):481-487. SAS Institute. 2002. The SAS system for Windows user's guide. Release 9.4. SAS Institute, Cary, NC. 2002.

RAMOS, A. R. et al. Bioestimulante no condicionamento fisiológico e tratamento de sementes de feijão. **Revista Biociências**, v. 21, n. 1, p. 76-88, 2015.

ROUPHAEL, Y. et al. High-Throughput Plant Phenotyping for Developing Novel Biostimulants: from lab to field or from field to lab?. **Frontiers In Plant Science**, v. 9, 2018. http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01197.

ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Editorial: biostimulants in agriculture. **Frontiers In Plant Science**, v. 11, 2020. http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00040.

SABORIO, F. Bioestimulantes en fertilización foliar. MELÉNDEZ, G.; MOLINA, E. **Fertilización Foliar: Principios y Aplicaciones**. Costa Rica: Asociación Costarricense de La Ciencia Del suelo, p. 107 - 124, 2002.

SANDY, E. C. et al. Avaliação da resposta e dose ideal do produto Triplus, a base de cobalto, molibidênio e níquel, na cultura do café arábica (*Coffea arabica* L.). SBI Café, Biblioteca do café. **Anais**... Congresso Brasileiro de Pesquisa Cafeeiras, Poços de Caldas, v.47, 2017.

SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. Humic substances in the environment New York, Marcel Dekker. p. 327, 1972.

SEIF, Y. I. A. *et al*. Response of snap bean growth and seed yield to seed size, plant density and foliar application with algae extract. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 2, p. 187-199, 2016.

SHARMA, H. S. S. et al. Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 465–490, 2014.

SILVA, A. C. *et al*. Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 35, n. 5, p. 1609-1617, 2011

SILVA, I. W. da. Avaliação de microrganismos promotores de crescimento no tratamento de sementes de soja (*Glycine max L.*). Trabalho de Conclusão de Curso. Ijuí: Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul; 2016.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, v. 1, p. 293, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p

TEJADA, M. *et al.* Use of biofertilizers obtained from sewage sludges on maize yield. **Eur. J. Agron.**, v. 1, n. 78, p. 13-19, 2016.

UE (2019). Regulation of the european parliament and of the council laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2019:170:TOC. Acesso em: 25 de abril de 2022.

UGARTE, R. A.; SHARP, G.; MOORE, B. Changes in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Plant morphology and biomass produced by cutter rake harvests in southern New Brunswick, Canada. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, n. 3-5, p.351-359, 2006.https://doi.org/10.1007/s10811-006-9044-8VIEIRA

VIEIRA, E. L. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.). 2001. 140 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, 2001.

YAKHIN, O. I.; LUBYANOV, A. A.; YAKHIN, I. A.; BROWN, P. H. Biostimulants in Plant Science: a global perspective. **Frontiers In Plant Science**, v. 7, 2017. http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.02049.

YANG, Y.; LI, H. Recovering humic substances from the dewatering effluent of thermally treated sludge and its performance as an organic fertilizer. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 10, n. 3, p. 578–584, 2016.

ZANDONADI, D. B. *et al*. Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 1, p. 14-20, 2014.

ZANDONADI, D. B. Bioestimulantes e produção de hortaliças. 2016. https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/14218786/bioestimulantes-e-producao-de-hortalicas. Acesso em: 23 abr. 2022.

Autores

Luan Martin Arejano*, Rafael Miritz Bartz, Thalia Strelov dos Santos, Guilherme Hirsch Ramos, Gizele Ingrid Gadotti, Maurizio Silveira Quadro

Universidade Federal de Pelotas, Rua Dona Mariana, 13 - Porto, 96010-450, Pelotas - RS, Brasil.

* Autor de correspondência: luanarejano@outlook.com

CAPÍTULO 3

Bioprodutos a base de *Bacillus* na agricultura: situação atual e perspectivas

Vicente Guilherme Handte, Valéria Ortaça Portela, Lisiane Sobucki, Bruno Cherobini Piovesan, Mônica Dickow Pozzobon, Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-08-4.c3

Resumo
Os efeitos nocivos no ambiente e nos seres humanos dos pesticidas e adubos sintéticos utilizados na agricultura têm estimulado a adoção de métodos menos agressivos de proteção e nutrição de plantas. Uma alternativa para reduzir ou substituir o uso destes produtos sintéticos é o uso de microrganismos, os quais apresentam menores impactos se comparados aos produtos químicos. Atualmente há registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento muitos produtos microbiológicos/bioprodutos, entre eles 38 acaricidas, 5 bactericidas, 66 fungicidas, 242 inseticidas e 46 nematicidas. Alguns desses são utilizados também como inoculantes e/ou estimuladores do crescimento de plantas. O gênero de bactérias *Bacillus* é o princípio ativo de muitos destes bioprodutos. Este gênero é constituído de bactérias Gram positivas, pertencentes ao filo *Firmicutes*. Além de apresentar multiplicidade de mecanismos de importância agrícola, se difere de muitos gêneros de bactérias por formar endósporos. As espécies de *Bacillus* possuem um papel importante no controle biológico. Além disso, algumas destas bactérias estimulam o crescimento vegetal pela melhoria da nutrição, solubilização de fosfato e liberação de hormônio vegetais. Atualmente, diversas instituições públicas e privadas estão investindo no desenvolvimento de bioprodutos com o gênero *Bacillus*, demandando mais pesquisas e informações sobre estas bactérias. Neste capítulo será apresentado uma visão geral sobre os bioprodutos agrícolas brasileiros que possuem as bactérias do gênero *Bacillus* como princípio ativo, sua aplicação e perspectivas na agricultura.

Palavras-chaves: produtos biológicos controle biológico, nutrição de plantas, sustentabilidade.

1. Introdução

O Brasil é um país com grande potencial de produção agrícola devido a sua extensão territorial e variedade de paisagens e clima. O agronegócio representa 26,6% do PIB no país e tem grande participação na produção global de alimentos, produzindo e exportando *commodities* agrícolas (CEPEA, 2021). No entanto, a produção agrícola brasileira, em sua maioria, é dependente da

Rafael Fernández Da Silva (Org.) © 2022 Mérida Publishers CC-BY 4.0

aplicação de pesticidas sintéticos em todas as etapas da produção, sendo este o principal método de controle fitossanitário.

Porém, o controle químico de insetos, pragas e doenças possui custo elevado e causa impactos negativos ao ambiente e aos seres humanos (DEMARTELAERE *et al*., 2021). Por isto, nos últimos anos percebe-se o aumento da preocupação da sociedade com aspectos relacionados à poluição, preservação e recuperação ambiental, e com a contaminação dos alimentos. Há crescente demanda por produtos sem a utilização de pesticidas sintéticos e consequentemente sem a presença de resíduos desses produtos. Assim, o novo direcionamento da produção agrícola é desenvolver práticas de menor impacto ambiental no controle fitossanitário, de forma a reduzir ou substituir a utilização de pesticidas sintéticos (KHAN *et al*., 2019). Este direcionamento influenciou o crescimento e a valorização da agricultura orgânica, assim como aumentou a utilização de bioprodutos na agricultura convencional, o que incentivou o crescimento de pesquisas, tanto por instituições públicas quanto privadas, no desenvolvimento de novos bioprodutos.

Neste capítulo será apresentado uma visão geral sobre os bioprodutos agrícolas brasileiros que possuem as bactérias do gênero *Bacillus* como princípio ativo, sua aplicação e perspectivas na agricultura.

2. Histórico do Controle Biológico no Brasil

O controle biológico utiliza inimigos naturais, como microrganismos, parasitoides e predadores, para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas que prejudicam os cultivos agrícolas (BAKER *et al*., 2020). O uso do controle biológico ocorre há séculos. Alguns registros da China do século III a.C. demonstram que já se utilizavam formigas da espécie *Oecophylla smaragdina* para controlar pragas em pomares de citros (BOSCH; MESSENGER; GUTTIERREZ, 1982). Relatos mais consistentes ocorreram a partir de 1888, quando houve o aumento do número de programas de controle biológico no mundo, impulsionados pelo marcante caso de sucesso ocorrido na Califórnia, onde foi realizado o controle do pulgão branco (*Icerya purchasi*) por joaninhas (*Rodolia cardinalis*) no cultivo de citros (PARRA *et al*., 2002).

O histórico do controle biológico no Brasil é relativamente recente. Segundo o Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA), os primeiros

inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* registrados no Brasil datam de 1991. Naquela época não havia regulamentações específicas para avaliação de produtos biológicos. Os primeiros microrganismos de controle foram submetidos aos mesmos testes requeridos para os pesticidas sintéticos, como por exemplo, com pesquisas de longo tempo para avaliar a carcinogenicidade em humanos. Porém, em seguida verificou-se que os testes indicados para avaliação da segurança de pesticidas sintéticos não poderiam ser aplicados diretamente para agentes microbiológicos. Os testes toxicológicos convencionais de pesticidas sintéticos assumem que a medida do efeito biológico pode ser avaliada quando a dose administrada é suficientemente alta (OLIVEIRA-FILHO, 2005). No entanto, quando se utilizam produtos de base biológica, a quantidade de material necessária para produzir mortes teria que ser muito elevada, o que não apresenta aplicabilidade prática. Somado a isso, as avaliações de segurança para pesticidas sintéticos assumem que o conhecimento da estrutura química ou de compostos relacionados podem fornecer informações acerca do perigo potencial. Enquanto que para produtos biológicos, uma grande disparidade com relação à virulência e à patogenicidade pode ocorrer entre microrganismos do mesmo gênero ou até espécie (SIMÃO *et al*., 2022).

Devido à dificuldade de padronização de testes e parâmetros para registro de bioprodutos, foi necessário estabelecer diretrizes específicas para sua avaliação. Em 1997, o IBAMA publicou os critérios e procedimentos para efeito de registro e avaliação ambiental de agentes microbianos empregados na defesa fitossanitária. Em 2007, foi criada a Associação Brasileira de Empresas de Controle Biológico (ABCbio) e em 2008 foi registrado o primeiro fungicida biológico. Em 2009, com a publicação do Decreto 6.913 de 23 de Julho de 2009 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009), foi estabelecida uma tramitação própria e prioritária dos processos de análise que compõem o registro de produtos comerciais permitidos para uso na agricultura orgânica. Em 2012 foi aprovada a ATO nº 29 estendendo para todas as culturas o registro dos produtos biológicos. Em 2014 ocorreu a aprovação do ATO nº 06 estendendo para todas as culturas o registro de um produto formulado a base de microrganismos. Atualmente há registrados 401 produtos comerciais contendo agentes de controle biológico (MAPA, 2022).

O controle biológico é uma alternativa aos produtos químicos na agricultura, principalmente quando utilizado juntamente com técnicas relacionadas ao Manejo Integrado de Pragas (MIP). Este manejo busca o monitoramento permanente da lavoura a fim de avaliar periodicamente as populações das pragas e consequente a tomada de decisões (BATISTA *et al*., 2020). Atualmente quatro tipos de controle biológico são conhecidos: natural, conservação, clássico e aumentativo (VAN LENTEREN *et al*., 2018). No controle natural, as pragas são reduzidas por organismos benéficos de ocorrência natural no ambiente. O controle de conservação consiste em ações humanas que protegem e estimulam o desempenho dos inimigos naturais no ambiente. No clássico, os inimigos naturais são coletados em uma área de ocorrência da praga e liberado nas áreas onde a praga está presente e sem inimigos naturais. Já no aumentativo (inundativo), os inimigos naturais são criados em massa em laboratório e aplicados em grande número, para controle imediato nas lavouras com um curto ciclo de produção ou para controle de pragas durante vários ciclos nas lavouras. Parra *et al*. (2002) destaca o controle biológico como um fenômeno natural de regulação da população de plantas ou animais por inimigos naturais.

3. Desenvolvimento de bioprodutos

O controle biológico está em forte crescimento em escala comercial e demanda mais pesquisas e inovações para a formulação de novos produtos, que facilitem os métodos de aplicação e incrementem novas tecnologias de controle. A bioprospecção de microrganismos é a primeira etapa no desenvolvimento de novos bioprodutos. É através dela que são obtidos novos microrganismos e moléculas utilizadas no controle biológico. O Brasil possui grande biodiversidade, o que confere um grande potencial de bioprospecção e um vasto horizonte no desenvolvimento de produtos para o uso no controle biológico (NOGUEIRA; CARQUEIRA; SOARES, 2010). Os microrganismos podem ser utilizados como princípios ativos dos bioprodutos ou podem ser utilizados em processos industriais, servindo como fonte de compostos ativos (YANG *et al*., 2014). As bactérias e fungos são os organismos de maior interesse em estudos biotecnológicos, pois ocorrem em abundância na natureza e podem ser cultivados em meios baratos para produção em massa na indústria.

O processo de bioprospecção pressupõe uma série de etapas, entre elas o isolamento, a seleção e a identificação. O isolamento, envolve a retirada do microrganismo do ambiente natural e a obtenção da cultura pura (isolado), seguido da manutenção desta em uma condição controlada, de modo que se mantenha viável e possibilite o estudo e desenvolvimento de produtos de interesse econômico (ABREU; TUTUNJI, 2004).

Uma das principais dificuldades da bioprospecção de novos microrganismos é a sua manutenção em laboratório, visto que o tempo desde o isolamento até o desenvolvimento do produto final é longo e é necessário que o isolado se mantenha viável e geneticamente estável, sem perder a sua funcionalidade (ABREU; TUTUNJI, 2004). Essa dificuldade ocorre principalmente porque a maioria dos meios de cultura utilizados no cultivo de microrganismos não é otimizado. A manutenção do microrganismo por repicagens contínuas pode resultar, a longo prazo, na redução da sua capacidade biotecnológica. Por isso, diferentes estratégias têm sido empregadas para manter os bancos de microrganismos viáveis por longos períodos de tempo (UNFER *et al*., 2019). Além disso, os bioprodutos apresentam menor vida útil que produtos sintéticos, demandando pesquisas com a utilização de biopolímeros e outras fontes de conservação, visando ampliar a sua vida de prateleira.

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são caracterizadas pelo forma de bastonetes, Gram-positivas, obrigatoriamente ou facultativamente aeróbias, catalase positivas, produtoras de endósporos (esporos internos à bactéria) e de muitas enzimas, algumas tóxicas. Estes micorganismo possui grande diversidade quanto ao uso bitecnologico, pela produção de substâncias bioativas que podem ser utilizadas na agricultura como os biossurfactantes, bioherbicidas, biobactericidas, bionematicidas, biofungicidas, bioinseticidas e promoção de crescimento em plantas.

3.1. Biossurfactantes

Os biossurfactantes são produtos de origem biológica, geralmente metabólitos de microrganismos, que possuem em sua estrutura moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas. Essa característica anfifílica contribui para que esses possuam capacidade de reduzir as tensões superficiais e tensões interfaciais de

outros produtos, atuando de forma semelhante a adjuvantes sintéticos (VARJANI; UPASANI, 2017; GOSWAMI; DEKA, 2019;). Os biossurfactantes são muito estudados por terem diversas aplicações, como na agricultura, na indústria de cosméticos e na alimentícia, em programas de biorremediação para aumentar a biodisponibilidade dos poluentes e como adjuvantes agrícolas. Eles são classificados de acordo com sua natureza iônica, tipo e tamanho (VECINO *et al*., 2015). Os biossurfactantes têm vantagens em comparação com adjuvantes à base de petróleo pois têm uma maior biodegradabilidade e menor toxicidade, sendo ecologicamente corretos (LIU *et al*., 2021).

A utilização de bactérias do gênero *Bacillus* para a produção de biossurfactantes já é reconhecida, sendo os lipopeptídeos os de maior destaque. Um destes compostos é a surfactina, que é um biossurfactante muito conhecido e estudado, produzido por *Bacillus subtilis* (FIECHTER, 1992). Tem característica aniônica, possui a capacidade de reduzir a tensão superficial de 72 para 30 mN/m em concentrações tão baixas quanto 0,005% (BANAT *et al*., 2000). Outros biossurfactantes produzidos por *Bacillus* estão sendo frequemente relatados na literatura. No estudo realizado por Goswami & Deka (2019) foi descrito o primeiro biossurfactante produzido por *B. altitudinis*. De acordo com o estudo, além das propriedades como surfactante, a molécula demonstrou efeitos biofungicidas, inibindo o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* em 43% e de *Sclerotinia sclerotiorum* em 41%. A cepa 2A de *B. pumilus* também demonstrou habilidades de produzir biossurfactantes. Utilizando malte como fonte de carbono no meio de cultura, o que além de ser ecologicamente correto, é também um substrato barato e de fácil aquisição, o biossurfactante glicolipídio se manteve constante e viável a baixas e altas temperaturas. Resultados constataram que o produto reduziu a tensão superficial da água de 72 para 47,7 mN/m e obteve índice de emulsão de 69,11%. Além disso, os glicolipídeos produzidos pelo *B. pumilus* 2A melhoram significativamente o crescimento de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Raphanus sativus* L. (rabanete), *Beta vulgaris* L. (beterraba) (MARCHUT *et al*., 2021).

Um potencial biossurfactante produzido pela cepa ZDY2 de *B. aryabhattai* foi estudado por Yaraguppi *et al*. (2020). O biossurfactante obteve estabilidade até 100°C, em pH entre 5-10 e na presença de concentração de NaCl até 8%. Ademais, o biossurfactante demonstrou atividade antimicrobiana contra

Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus e Candida tropicalis. Dos 7 isolados *de B. tequilensis* testados como produtores de biossurfactantes, a cepa MK 729017 foi a que demonstrou melhor desempenho. O biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial em 30 mN/m e com um índice de emulsificação de 66%. Esse biossurfactante foi identificado como sendo lipopeptídeo e demonstrou alta estabilidade térmica (DATTA; TIWARI; PANDEY, 2020).

3.2. Biobactericidas

Os biobactericidas têm sido cada vez mais utilizados contra doenças de plantas. No Brasil, de acordo com o MAPA, existem 5 biobactericidas registrados, todos produzidos à base de *Bacillus*. Dos 5 produtos, 4 são de *B. subtilis* e um de *B. amyloliquefaciens*. Os alvos bacterianos desses produtos são a *Xanthomonas vesicatoria* (mancha bacteriana), *Pseudomonas syringae* (pinta bacteriana do tomateiro), *Xanthomonas citri* subsp. citri (Cancro cítrico), *Pseudomonas syringae* pv. garcae (mancha-aureolada) e *Streptomyces scabies* (Sarna comum). Nos Estados Unidos outras duas espécies de *Bacillus* também são utilizadas como biobactericidas, o *B. mycoides* para controle de *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. e *Erwinia amylovora* (fogo bacteriano) e o *B. pumilus* para o controle de *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp. (DIMOPOULOU *et al*., 2021).

Apesar de apenas duas espécies de *Bacillus* serem utilizadas no Brasil para o controle de bactérias, mais estudos estão sendo realizados com novas espécies. Baharudin *et al.* (2021) testaram 5 diferentes cepas de *B. velezensis* (PD9, B7, PU1, BP1 e L9) contra *Staphylococcus aureus*, a bactéria causadora de uma das principais doenças em abelhas. O extrato bacteriano da cepa PD9 foi o que obteve melhores resultados antibacterianos, além de apresentar estabilidade em uma grande amplitude de temperatura e pH.

Em um experimento de casa de vegetação, foi avaliado a eficiência da cepa FJAT-46737 de *B. velezensis* contra *Ralstonia solanacearum* (murcha bacteriana). A eficácia de biocontrole da cepa FJAT-46737 contra a murcha bacteriana do tomateiro chegou a 66%. No mesmo experimento, os autores constataram que os mecanismos antagônicos dessa cepa são derivados da secreção de lipopeptídeos (CHEN *et al*., 2020). Outras espécies também

produzem lipopeptídeos, como *B. methylotrophicus*, *B. licheniformis*, além dos *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* (AKPA *et al*., 2001; PECCI *et al*., 2010; JEMIL *et al*., 2017; CHEN *et al*., 2019).

Jin *et al*. (2021) relataram atividade antimicrobiana da cepa HN-5 de *B. licheniformis* contra a bactéria *Pantoea ananatis*. Essa bactéria causa apodrecimento na bainha das plantas de arroz, que afeta severamente a cultura. Ademais, essa bactéria também causa a doença chamada mancha branca no milho (SAUER *et al*., 2015). De acordo com os autores, a cepa HN-5 produz uma substância chamada Bacitracin A, que é um antibiótico peptídico não ribossomal com forte atividade antibacteriana. Essa substância demonstrou ser eficaz contra o patógeno, causando extravasamento celular e alterações na permeabilidade das membranas, evidenciando o uso potencial dessa substância no controle de *P. ananatis.*

A sarna da batata, causada pelo gênero de bactéria *Streptomyces* spp., é uma das doenças que mais causam perdas econômicas na cultura, tendo impactos negativos nas plantações no mundo inteiro. Um estudo realizado por Li *et al*. (2019), demonstrou que a cepa AMCC 101304 de *B. altitudinis* pode ser eficiente no controle dessa doença. Experimentos em potes, conduzidos na primavera e no outono demonstraram o biocontrole da sarna da batata em ambas as estações do ano. Na primavera a eficiência do *B. altitudinis* foi de 76% e no outono de 66% (LI *et al*., 2019).

3.3. Bionematicidas

A maioria dos nematoides do solo não causa danos às plantas. São denominados de não fitoparasitas ou de vida livre, e se alimentam de fungos, bactérias, outros nematoides, protozoários e da matéria orgânica em decomposição. Entretanto, existem espécies que são parasitas de plantas (MOURA; FRANZENER, 2017), são denominados de fitonematoides e causam perdas consideráveis em diversas culturas agrícolas em todo o mundo, com prejuízos econômicos estimados entre 78 bilhões a 125 bilhões de dólares por ano (GAO *et al*., 2016; LOPES; FERRAZ, 2016).

Os bionematicidas são eficazes no controle de diferentes espécies de nematoides e são ecologicamente corretos (ENGELBRECHT *et al*., 2018; GAO *et al*., 2016). Os produtos à base de *Bacillus* se destacam por seu uso potencial

como bionematicidas em relação a outros microrganismos. Isto se deve a produção de biomoléculas biologicamente ativas, como antibióticos, enzimas, exotoxinas e metabólitos primários e secundários (ABBASI *et al*., 2014; RAMEZANI *et al*., 2014; SANSINENEA; ORTIZ, 2011). Além disso, os produtos de controle biológico à base de *Bacillus* são seguros tanto para o ambiente como para organismos não-alvo, como humanos e outros organismos vivos (ENGELBRECHT *et at*., 2018; GAO *et al*., 2016).

Mais especificamente em relação aos mecanismos de ação, Mnif & Ghribi, (2015) relataram que a ação bionematicida do *B. subtilis* ocorreu através da produção de lipopeptídeos, surfactina e iturina. Já Gao *et a*l. (2016) relataram que a ação bionematicida de *B. cereus* cepa S2 ocorreu possivelmente através de metabólitos secundários e não proteínas. Xiong *et al*. (2015) em seu estudo utilizando a cepa Ybf-10 do *B. firmus* como bionematicida indicaram somente que a ação bionematicida ocorreu através de metabólitos secundários. Li *et al*. (2015) e Niu *et al*. (2007) evidenciaram que o *B. nematocida* possui ação nematicida pela produção de suas serino-proteases alcalinas extracelulares, a Bace16 e a protease neutra Bae16, que causam a degradação da cutícula do nematoide. Entretanto, esse fenômeno só ocorre quando os nematoides ingerem a bactéria, no chamado mecanismo cavalo de Tróia. Já o *B. magaterium* reduziu a taxa de infecção e a eclosão de ovos de *Meloidogyne incognita* por produzir compostos nematicidas como benzenoacetaldeído, 2-nonanona, decanal, 2 undecanona e dissulfureto de dimetilo (HUANG *et al*., 2010). Por outro lado, o *B. thuringiensis* produz proteínas cristalinas (Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry21) que atuam como toxinas acarretando mortalidade de larvas de nematoides, além da inibição da eclosão de ovos (LI *et al*., 2015; Wei *et al*., 2003).

No Brasil, de acordo com o MAPA, existem 45 nematicidas microbianos registrados e 33 são a base de *Bacillu*s. As espécies de *Bacillus* usadas nesses produtos são sete: o *B. licheniformis, B. subtilis, B. firmus, B. amyloliquefaciens, B. velezensi* e *B. methylotrophicus.* Os nematoides alvo estão em cinco diferentes gêneros: *M. incognita, M. javanica, M. exigua, M. paranaenses* e *M. graminicola* (todos conhecidos como nematoide das galhas)*; Pratylenchus zeae* e *P brachyurus* (nematoide das lesões radiculares)*, Radopholus similis*

(nematoide carvenícola), *Rotylenchulus reniformis* (nematoide reniforme) e *Heterodera glycines* (nematoide do cisto) (Tabela 1).

Tabela 1. Nematicidas bacterianos a base de *Bacillus* spp. registrados no MAPA (2022).

Nº registro	Ingrediente ativo	Nematoides alvos
17320	*Bacillus licheniformis; B. subtilis; Paecilomyces lilacinus*	*M. incognita; Pratylenchus brachyurus*
34321	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; P. brachyurus*
32917	*B. firmus*	*M. incognita; P. brachyurus*
12320	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; P. brachyurus; Heterodera glycines*
3420	*B. subtilis*	*M. incognita; M. javanica; M. exigua; M. paranaensis; Pratylenchus zeae*
17120	*B. subtilis*	*M. incognita; P. brachyurus*
36118	*B. subtilis*	*M. incognita; M. javanica; M. exigua; M. paranaensis; Pratylenchus zeae*
3221	*B. velezensis*, isolado CNPSo 3602	*M. incógnita*
11720	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; M. javanica; P. brachyurus*
11820	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; M. javanica; P. brachyurus*
15220	*B. subtilis*	*M. incognita; M. javanica; P. brachyurus; Heterodera glycines*
35021	*B. amyloliquefaciens*	*M. javanica; P. brachyurus; P. zeae*
43019	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; M. javanica; P. brachyurus; Rotylenchulus reniformis*
12420	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; P. brachyurus; H. glycines*
17220	*B. licheniformis; B. subtilis; Paecilomyces lilacinus*	*M. incognita; P. brachyurus*

12016	*B. amyloliquefaciens*	*P. brachyurus*
40519	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; P. brachyurus*
16920	*B. subtilis*	*M. incognita; M. javanica; P. brachyurus; H. glycines*
9421	*B. subtilis*	*M. incógnita*
34518	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; M. javanica; P. brachyurus; H. glycines*
32817	*B. firmus*	*M. javanica; P. brachyurus*
13018	*B. methylotrophicus*	*M. javanica; P. brachyurus*
15216*	*B. methylotrophicus*, isolado UFPEDA20	*M. javanica; P. brachyurus*
17020	*B. subtilis*	*M. incognita; M. javanica; P. brachyurus; H. glycines*
1817	*B. licheniformis; B. subtilis*	*M. javanica; P. brachyurus*
38119	*B. licheniformis; B. subtilis; Paecilomyces lilacinus*	*M. incognita; P. brachyurus*
317	*B. licheniformis; B. subtilis*	*M. incognita; M. javanica; M. exigua; M. graminicola; P. zeae; P. brachyurus; Radopholus similis*
12118	*B. subtilis*	*M. javanica; P. brachyurus*
15116*	*B. subtilis*, isolado UFPEDA764	*M. javanica; P. brachyurus*
3121	*B. velezensis*, isolado CNPSo 3602	*M. incógnita*
11620	*B. amyloliquefaciens*	*M. incognita; M. javanica; P. brachyurus*
32717	*B. firmus*	*M. javanica; Pr. brachyurus*

*Produto fitossanitário com uso aprovado para a agricultura orgânica.

Apesar de um grande número de produtos e da grande variedade de espécies de *Bacillus* spp. já serem comercializadas, estudos com outras

espécies de bactérias estão sendo realizados. Yin *et al*. (2021) utilizaram a bactéria *B. cereus* cepa Bc-cm103 nos seus estudos para o controle de nematoide das galhas (*M. javanica*). Nos testes laboratoriais, o uso da cepa causou 100% de mortalidade no estágio juvenil em 12 horas, além de diminuir a eclosão dos ovos em 40% em 72 horas. Nos testes em vasos, a cepa reduziu significativamente o aparecimento das galhas nas raízes de pepino (*Cucumis sativus*). Os autores indicaram que essa proteção ocorreu porque a bactéria cria biofilme sobre as raízes, o que as protege dos ataques dos patógenos. Gao *et al.* (2016) também relataram que outra cepa de *B. cereus,* a S2, exibiu alta atividade bionematicida contra a *M. incognita*. A cepa causou mortalidade *in vitro* de 91% do nematoide, já no experimento em estufas a mortalidade foi de 81% e em experimentos a campo de 59%. Os autores ainda relataram que a atividade nematicida ocorreu devido a produção de esfingosina pela bactéria.

A cepa AMCC1040 da espécie de *B. altitudinis* foi testada para o biocontrole de nematoides da espécie *M. incognita* em gengibre (*Zingiber officinale*). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. causam uma doença chamada rachadura de casca de gengibre, o que pode provocar grandes perdas na produtividade. O estudo demonstrou que essa cepa de *B. altitudinis* inibiu a reprodução dos nematoides, assim como reduziu significativamente a doença causada pelo patógeno em experimentos a campo (WANG *et al*., 2021).

O *B. altitudinis* também se mostrou eficiente no controle de outro nematoide do mesmo gênero, o *M. javanica*. Estudos realizados em casa de vegetação e a campo, demonstraram que a cepa de *B. altitudinis* KMS-6 reduziu em 76% a eclosão de ovos, em 86% a formação de galhas e em 92% a população desse nematoide, comparado com o tratamento controle em berinjela (*Solanum melongena*) e pepino (*C. sativus*). Os tratamentos com o bioagente foram mais eficientes que o controle químico (carbofuran). Além disso, a produtividade de ambas as culturas foi maior onde a bactéria foi inoculada (ANTIL *et al*., 2022). Existem relatos de outras espécies de *Bacillus* com ação nematicida ainda não citados no texto, como *B. weihenstephanensis* (SARANGI; RAMAKRISHNAN; NAKKEERAN, 2014), *B. coagulans* (ABBASI *et al*., 2017), *B. mojavensis* (XIANG *et al*., 2017) e *B. circulans* (EL-HADAD *et al*., 2010).

Com novos produtos e espécies de *Bacillus* spp. sendo introduzidas no mercado, uma nova gama de possibilidades e alternativas se abre. Entretanto,

Engelbrecht *et al*. (2018) enfatiza que estudos devem ser realizados tanto com os produtos já comercializados, como com os que estão sendo desenvolvidos em relação aos seus efeitos em organismos não-alvos, como insetos, minhocas, protozoários e microrganismos, no intuído de evitar um possível desequilíbrio ambiental.

3.4. Biofungicidas

Os fungos patogênicos são os principais organismos responsáveis por doenças em plantas, causando danos significativos nos cultivos de todo mundo. Diante disso, os biofungicidas têm sido cada vez mais reconhecidos e usados para resolver estes problemas. Esses são uma opção ambientalmente segura, acessíveis em termos de custo e mais persistentes no campo se comparado a outros métodos de controle (GOMES *et al*., 2021). O uso de fungicidas químicos pode criar um desbalanço no microbioma, que possuem um papel importante na manutenção da saúde do solo. Uma diminuição da diversidade no microbioma pode estimular o desenvolvimento de doenças de plantas transmitidas pelo solo (ABBEY *et al*., 2019; SHEN *et al*., 2014).

De acordo com o Mapa, no território brasileiro existem 60 fungicidas microbianos, desses, 35 são à base de *Bacillus.* Contudo, apenas 3 têm uso para agricultura orgânica. As espécies usadas nesses 35 produtos são: *Bacillus amyloliquefaciens, B. pumilus, B. subtilis* e *B. velezensis*, que atuam o controle de uma gama de patógenos fúngicos (Tabela 2).

Apesar de já existirem produtos com 5 espécies de *Bacillus*, estudos evidenciaram outras espécies promissoras no biocontrole de fungos patogênicos. Zhou *et al*. (2021a) usaram a cepa YN917 de *B. cereus* para avaliar seus efeitos em relação ao biocontrole de patógenos e suas propriedades em relação à promoção do crescimento de plantas. Os resultados obtidos pelos autores revelaram que a cepa reduziu significativamente a severidade da brusone (*Magnaporthe grisea*) nas plantas de arroz em casa de vegetação. Além disso, o uso dessa cepa de bactéria promoveu significativa germinação de sementes e o crescimento das plântulas. Em análises com os genomas da cepa, foram revelados agrupamentos de genes para biossíntese de promoção de plantas, como o ácido indolacético (AIA) e o triptofano. Os autores salientam que

essa cepa pode ter diversas finalidades, como biocontrole de doenças (brusone) e promoção de crescimento de plantas.

Chauhan *et al*. (2016) utilizaram duas espécies diferentes de *Bacillus* nos estudos com cúrcuma (*Curcuma longa*) e *Fusarium solani*. As espécies utilizadas em consórcio foram *B. endophyticus* e *B. cereus*, com as cepas TSH42 e TSH77, respectivamente. De acordo com os autores, o uso das cepas reduziu significativamente o crescimento do fungo patogênico *F. solani in vitro*. Em casa de vegetação, o uso dessas duas cepas também reduziu a incidência percentual da doença da podridão do rizoma causado pelo mesmo fungo patogênico. Além disso, também foi observado um aumento na biomassa fresca do rizoma e um maior crescimento das plantas se comparadas com as testemunhas.

Estudos realizados a campo utilizando a cepa de *B. altitudinis* BRHS/S-73 demonstraram que essa, além de solubilizar fosfato do solo, também promoveu o crescimento das plantas e o biocontrole do patógeno *Thanatephorus cucumeris*, um fungo que causa doenças nas raízes de *Vigna radiata* (feijão-da-china). As espécies de plantas utilizadas nesse estudo foram *V. radiata*, *Glycine max* (soja) e *Cicer arietinum* (grão de bico). As sementes foram inoculadas com a bactéria antes de serem semeadas no campo. Houve um aumento significativo no comprimento da raiz, comprimento da parte aérea e aumento na biomassa de raízes e da parte aérea das três espécies vegetais estudadas. Nas plantas de feijão-da-china, a eficiência no controle do patógeno foi de 67%, 30 dias depois de ser inoculado nas plantas (SUNAR *et al*., 2015). Outras espécies de *Bacillus* também demonstraram efeito biofungicida como *B. pseudomycoides* (KNEŽEVIĆ *et al*., 2021), *B. licheniformis* (LEE *et al*., 2006) e *B. tequilensis* (ZHOU *et al*., 2021b)

Tabela 2. Fungicidas bacterianos à base de *Bacillus* spp. registrados no MAPA (2022).

N. Registro	Ingrediente Ativo	Fungos Alvo
24820	*B. amyloliquefaciens*	*Colletotrichum truncatum; C. lindemuthianum; Corynespora cassiicola; Ramularia areola; Phaeosphaeria maydis*
21721	*B. amyloliquefaciens*	*C. lindemuthianum; C. gloeosporioides*

6721	*B. amyloliquefaciens*	*C. lindemuthianum; C. gloeosporioides*
27021	*B. amyloliquefaciens*	*Botrytis cinerea; C. gloeosporioides; Sphaeroteca fuliginea; Rhizoctonia solani; Sclerotinia sclerotiorum; Pythium ultimum*
8121	*B. subtilis; B. velezensis*, isolado CNPSo 3602	*C. truncatum ; Fusarium oxysporum f.sp. Vasinfectum; Fusarium oxysporum f.sp. Phaseoli; Rhizoctonia solani; P. ultimum; P. aphanidermatum*
22620	*B. amyloliquefaciens*	*C. lindemuthianum; C. gloeosporioides*
19121	*B. subtilis*	*C. gloeosporioides; R. solani; F. solani f. sp. glycines*
420	*B. amyloliquefaciens; Trichoderma asperellum; T. harzianum*	*C. lindemuthianum; S. sclerotiorum; R. solani*
25720	*B. amyloliquefaciens*	*C. lindemuthianum; C. gloeosporioides*
26816	*B. subtilis*	*Hemileia vastatrix; Neofabraea perennans; Alternaria porri; R. solani; Botrytis cinerea*
43418	*B. subtilis*	*Xanthomonas vesicatoria; Uncinula necator; H. vastatrix; S. sclerotiorum; Phakopsora pachyrhizi; Alternaria solani; C. gloeosporioides; C. acutatum; C. lindemuthianum*
3221	*B. velezensis*, isolado CNPSo 3602	*F. solani f. sp. glycines*
27321	*B. velezensis*, isolado CNPSo 3602; Bacillus *pumilus*; *Bacillus subtilis*	*Septoria glycines*
4621	*B. pumilus*	*Cercospora kikuchii; S. glycines; Corynespora cassiicola*
27221	*B. subtili; B. pumilus; B. velezensis,* isolado CNPSo 3602	*S. glycines*
4721	*B. pumilus*	*C. kikuchii; S. glycines; C.a cassiicola*

22718	*B. amyloliquefaciens*	*Botrytis squamosa; B. cinerea; Phyllosticta citricarpa; Sphaeroteca fuliginea; R. solani; Cryptosporiopsis perennans; Streptomyces scabies; F. solani; P. ultimum*
26616	*B. amyloliquefaciens*	*Uncinula necator; B. cinerea; C. gloeosporioides; C. perennans; P. citricarpa; A. porri; A. solani; A. dauci; S. sclerotiorum; S. fuliginea; Mycosphaerella fijiensis; Erysiphe polygoni*
15220	*B. subtilis*	*R. solani; S. sclerotiorum*
30820	*B. amyloliquefaciens*	*C. lindemuthianum; C. gloeosporioides*
21220	*B. amyloliquefaciens*	*S. sclerotiorum; R. solani*
520	*B. amyloliquefaciens; T, asperellum; T. harzianum*	*C. lindemuthianum; S. sclerotiorum; R.a solani*
522	*B. subtilis; B. velezensi*s, isolado CNPSo 3602	*S. sclerotiorum*
30918	*B. amyloliquefaciens*	*B. cinerea*
35419	*B. amyloliquefaciens*	*C. truncatum; C. lindemuthianum; C. cassiicola; R. areola; P. maydis*
3121	*B. velezensi*s, isolado CNPSo 3602	*F. solani f. sp. glycines*
3911	*B. subtilis,* linhagem QST 713	*F. oxysporum f.sp. lycopersici; Streptomyces scabies; C. perennans; P. ultimum; Alternaria dauci; A. porri; B. cinerea; C. gloeosporioides; C. acutatum; S. macularis; Mycosphaerella fijiensis; Sphaeroteca fuliginea; R. solani; S. sclerotiorum*
33918	*B. amyloliquefaciens; Trichoderma harzianum*	*R. solani; S. sclerotiorum; F. solani*
4311	*B. pumilus*	*S. macularis; U. necator; S. fuliginea; B. cinerea; C. perennans; C. lindemuthianum; Alternaria porri; A. solani*

1820	*B. amyloliquefaciens; T. asperellum; T. harzianum*	*C. lindemuthianum; S. sclerotiorum; R. solani*
21120	*B. amyloliquefaciens; T. harzianum*	*S. sclerotiorum*
25621	*B. amyloliquefaciens*, isolado CCT 7901; *T. harzianum*, isolado URM 8119; *T. asperellum,* isolado URM 8120	*C. lindemuthianum; S. sclerotiorum; R. solani*
25120	*B. amyloliquefaciens*	*C. truncatum; C. lindemuthianum; C. cassiicola; R. areola; P. maydis*
21021	*B. amyloliquefaciens*	*C. lindemuthianum; C. gloeosporioides*

*Produto fitossanitário com uso aprovado para a agricultura orgânica.

3.5. Bioinseticidas

Os bioinseticidas possuem alta especificidade, ausência de resistência nos insetos alvos, requerem um número menor de aplicações, o que junto com sua composição natural promovem impacto reduzido. Atualmente no MAPA (2022) há registro de 242 inseticidas microbiológicos, dos quais 39 produtos são a base de *Bacillus* (Tabela 3). As espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. moycoides* e *B. weihenstephanensis* são responsáveis por mais de 90% dos biopesticidas disponíveis (POLANCZYK; ALVES, 2003). As espécies desse grupo são muito semelhantes, sendo a principal característica que distingue *B. thuringiensis* dos outros táxons do mesmo gênero é a presença intracelular de um cristal protéico (MUNIZ, 2019).

Dentre os métodos de controle biológico de pragas, uma das alternativas disponíveis é a utilização de culturas geneticamente modificadas, dentre essas a soja *Bt*, por meio da inserção dos genes *Cry* de *B. thuringiensis* (SCHÜNEMANN *et al*.,2014). Essa bactéria produz inclusões cristalinas durante a esporulação (toxinas Cry) que contêm proteínas inseticidas chamadas α-endotoxinas. Quando a planta é atacada, essas inclusões são solubilizadas no intestino médio de insetos alvo, liberando as α-endotoxinas que possuem atividade proteolítica, tornando as toxinas ativas (CRICKMORE, 2005; BRAVO

et al., 2011; EVANGELISTA *et al*., 2021). Essas toxinas são capazes de formar ligações com receptores específicos presentes nas microvilosidades das células intestinais do inseto ocasionando a formação de oligômeros de toxinas, os quais se ligam a receptores secundários da membrana da célula intestinal e como resultado há inserção da toxina oligomérica na membrana da célula epitelial intestinal, resultando em poros nesse epitélio. A ação das toxinas resulta na paralisia do aparelho digestivo, ocasionando a morte por inanição, paralisia geral dos músculos e septicemia. Dessa forma, as toxinas são eficientes e altamente específicas para múltiplos insetos (EVANGELISTA *et al*., 2021). Existem também relatos sobre outras espécies de *Bacillus* com efeitos bioinseticidas, como no caso do *B. subtilis* (ASSIÉ *et al*., 2002), *B. sphaericus* (CHARLES; NIELSEN; DELÉCLUSE, 1996), *B. pumilus* (KAHIA *et al*., 2021) e o *B. flexus* (HASSANEIN *et al*., 2021), além de uma identificação de um gene tipo *Cry* em *B. cereus* (CASTILLO; LUÉVANO; IBARRA, 2021).

Tabela 3. Inseticidas bacterianos à base de *Bacillus* spp. registrados no MAPA (2022).

N. Registro	Ingrediente Ativo	Inseto Alvo
2798	*Bacillus thuringiensis*	*Tuta absoluta*; *Diaphania nitidali*; *Ecdytolopha aurantiana; Brassolis sophorae; Helicoverpa sp. Plutella xylostella*; *Anticarsia gemmatalis*; *Helicoverpa armigera*; *Ascia monuste orseis*
14320	*B. thuringiensis*	*Spodoptera frugiperda*; *Chrysodeixis includens*
6095	*B. thuringiensis*	*Bonagota salubricola; Cryptoblabes gnidiella; Diaphania hyalinata; D. nitidalis; E. aurantiana; T. absoluta; H. armigera; Neoleucinodes elegantalis; P. xylostella; Pseudoplusia includens; Spodoptera frugiperda; Grapholita molesta*
30518	*B. thuringiensis*	*E. aurantiana; H. armigera; Thyrinteina arnobia; P. xylostella; Helicoverpa zea*
1917	*B. thuringiensis*	*A. monuste orseis; A. gemmatalis; Eacles imperialis magnifica; Mocis latipes; S. frugiperda; E. aurantiana; B. sophorae; Trichoplusia ni; Thyrinteina arnobia; Heliothis virescens; Manduca sexta paphus; Erinnyis ello; H. armigera; H. zea;*

		D. nitidalis; Diaphania hyalinata; Colias lesbia pyrrhothea; Alabama argillacea; P. xylostella.
458791	*B thuringiensis*	*S. frugiperda; T. arnobia; E. ello; H. zea; H. virescens; A. gemmatalis;* *Mocis latipes; A. monuste orseis; P. xylostella; T. ni; E. imperialis magnifica; B. sophorae; M. sexta paphus; D. hyalinata; D. nitidalis; Colias lesbia pyrrhothea E. aurantiana; H. armigera; T. arnobia; A. argillacea;*
5022*	*B. thuringiensis var. kurstaki, isolado HD-1*	*A. argillacea; S. frugiperda; C. includens; A. gemmatalis;*
2420*	*B. thuringiensis var. kurstaki, isolado HD-1*	*A. argillacea; A. gemmatalis; P. includens; E. heros; C. includens.*
2821*	*B. thuringiensis*	*A. argillacea; S. frugiperda; C. includens; A. gemmatalis*
21918	*B. thuringiensis*	*H. armigera; C. includens; A. gemmatalis*
9121*	*B. thuringiensis*	*A. argillacea; S. frugiperda; C. includens; A. gemmatalis*
7721	*B. thuringiensis*	*C. includens; S. frugiperda; D. saccharalis*
14820	*B. thuringiensis*	*S. frugiperda; C. includens*
31421*	*B. thuringiensis var. kurstaki, isolado HD-1 (S1450)*	*A. argillacea; S. frugiperda; C. includens; A. gemmatalis*
4816	*B. thuringiensis*	*H. armigera; C. includens; A. gemmatalis.*
5120*	*B. thuringiensis*	*A. argillacea; S. frugiperda; C. includens; A. gemmatalis*
3321*	*B. thuringiensis*	*A. argillacea; S. frugiperda; C. includens; A. gemmatalis*
6319	*B. thuringiensis*	*E. aurantiana; C. includens;*
22316	*B. thuringiensis*	*G. molesta; N. elegantalis; P. xylostella; C. gnidiella; Pseudaletia sequax; E. aurantiana; H. armigera; P. includens; D. nitidalis.*

22216	*B. thuringiensis*	*S. frugiperda*
291	*B. thuringiensis*	*A. argillacea; Opsiphanes invirae; A. monuste orseis; B. sophorae; Condylorrhiza vestigialis; D. hyalinata; D. saccharalis; E. aurantiana; H. armigera; H. virescens; P. includens; T. absoluta; T. arnobia; T. ni; A. gemmatalis*
5917	*B. thuringiensis*	*C. includens; E. aurantiana; H. armigera; T. ni; T. arnobia; A. argillacea; A. monuste orseis; D. saccharalis; T. absoluta*
4707	*B. thuringiensis*	*A. argillacea; E. aurantiana; G. molesta; D. nitidalis; P. xylostella; A. gemmatalis; E. ello; Argyrotaenia sphaleropa; P. includens; Helicoverpa armigera; Strymon basalides; D. saccharalis; M. sexta paphus; T. absoluta;*
858901	*B. thuringiensis*	*S. basalides; O. invirae; D. nitidalis; Colias lesbia pyrrhothea; A. argillacea; H. virescens; A. gemmatalis; M. latipes; A. monuste orseis; P. xylostella; T. ni; E. imperialis magnifica; E. aurantiana; B. sophorae; B. astyra astyra; Manduca sexta paphus; E. ello; S. frugiperda; P. includens; H. zea; D. saccharalis; Helicoverpa sp.; D. hyalinata*
19721*	*B thuringiensis var. kurstaki, isolado HD-1*	*A.argillacea; S. frugiperda; C. includens; A. gemmatalis*
31217	*B. thuringiensis*	*E. aurantiana; H. armigera; T. arnobia; Plutella xylostella; Helicoverpa zea*
23017	*B. thuringiensis*	*P. includens; H.armigera*
7918	*B. thuringiensis*	*A. gemmatalis; S. frugiperda; C. includens.*
21419	*B. thuringiensis*	*E. aurantiana; H. armigera; T. arnobia; P. xylostella; H. zea*
18320	*B. thuringiensis*	*C. includens; S. frugiperda; S. eridania*
39517	*B. thuringiensis*	*E. aurantiana; T. arnobia; H. zea; H. armigera; P. xylostella*
2517	*B. thuringiensis*	*A. monuste orseis; E. ello; E. imperialis magnifica; E. aurantiana; B. sophorae; H. zea; D. nitidalis; D. hyalinata; Colias lesbia pyrrhothea; A. argillacea; H. virescens; H. armigera; A. gemmatalis; M.*

		latipes; S. frugiperda; T. ni; T. arnobia; M. sexta paphus; P. xylostella
10922*	*B. thuringiensis var. kurstaki, isolado HD-1*	*A. argillacea; S. frugiperda; C. includens; A. gemmatalis*
1608491	*B. thuringiensis*	*M. latipes; T. arnobia; A. argillacea; A. gemmatalis; A. monuste orseis; P. xylostella; T. ni; B. astyra astyra; B. sophorae; M. sexta paphus; E. ello; Dione juno juno; P. includens; R. nu; C. lesbia pyrrhothea; D. hyalinata; D. nitidalis; D. saccharalis; E. imperialis magnifica; E. aurantiana; H. zea; H. virescens; S. basalides; H. armígera; O. invirae; S. frugiperda*
39017	*B. thuringiensis*	*H. armigera; A. gemmatalis; C. includens; T. arnobia; T. ni; T. absoluta; P. sequax; A. argilácea; A. monuste orseis; D. hyalinata; C. vestigialis*
6618	*B. thuringiensis*	*E. aurantiana; H. armigera; T. arnobia; P. xylostella; Helicoverpa zea*
599	*B. thuringiensis*	*S. frugiperda; T. absoluta; A. monuste orseis; P. xylostella*

*Produto fitossanitário com uso aprovado para a agricultura orgânica.

3.6. Bactérias promotoras do crescimento de plantas

Associações entre plantas e bactérias tem sido estudada a muitas décadas, sugerindo que essa relação pode impactar positivamente no crescimento e na saúde das plantas. As plantas podem “selecionar” seu microbioma ou microbioma central para se associar às bactérias que podem ser benéficas a elas (OROZCO *et al*., 2018; MORALES *et al*., 2021). As bactérias podem se associar tanto com a parte aérea quanto com a parte radicular da planta. Além disso, essas podem penetrar dentro dos compartimentos internos da planta ou viver na sua rizosfera. As bactérias associadas às plantas podem ser capazes de exercer mecanismos benéficos, como a promoção direta (crescimento em si) ou indireta (biocontrole de patógenos) do crescimento de plantas (OROZCO *et al*., 2021). Em português são chamadas de bactérias

promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e em inglês de *plant growth-promoting bacteria* (PGPB).

Essa associação entre plantas e bactérias pode ocorrer de três maneiras. A primeira, através da rizosfera, conhecidas como rizobactérias. A rizosfera é a área do solo que circunda a raiz e é influenciada pela deposição de diversos compostos radiculares (vitaminas, aminoacido, nutrientes, etc) que podem ser utilizados por essas rizobactérias para o seu crescimento (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012). Os microrganismos colonizadores da parte aérea da planta (filosfera) são chamados de epífitas. Os mais comuns são as bactérias, onde apesar de não existir um termo em português para elas, são chamadas em inglês de *phyllobacterias* (OROZCO *et al*., 2021). Por último, existem as bactérias endófitas (ou endofíticas). Esse grupo de bactérias vivem dentro dos tecidos das plantas, sendo assim as que mais interagem com elas e consequentemente são as mais importantes BPCP's (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008; HARDOIM *et al*., 2015). Hoje no Brasil não existem bioproduto específicos para o crescimento de plantas, de acordo com o site do MAPA.

As espécies de *Bacillus* apresentam diferentes mecanismos na promoção de crescimento das plantas. Ku *et al*. (2018) relataram que a cepa YL6 de *B. cereus* tem potencial como BPCP's para as plantas *Glycine max* (soja), *Triticum vulgare* (trigo), *Brassica rapa subsp. pekinensis* (couve-chinesa). Além disso, dentre os mecanismos de promoção, estão a biossíntese de fitohormônios e a facilitação na aquisição do fósforo, que é um macroelemento essencial para as plantas. Khan *et al*. (2020) utilizou outra cepa de *B. cereus*, a SA1, que promoveu o crescimento da soja, a produção de biomassa e o aumento no teor de clorofila, através da secreção de ácidos orgânicos e da produção de fitohormônios. Ademais, a bactéria também promoveu termotolerância nas plantas de soja induzidas ao estresse por calor.

Em um estudo realizado por Ibort *et al*. (2017), utilizando conjuntamente as bactérias *Enterobacter* C7 e *B. megaterium,* observou-se promoção do crescimento de *Solanum lycopersicum* (tomateiro). Essa promoção ocorreu através da melhora na aquisição de sódio, cálcio, magnésio, na produção de antioxidantes e fitohormônios e pela secreção de metabólitos secundários. Eckshtain-Levi *et al*. (2020), utilizando as cepas de *B. subtilis* ES748 e ES749, demonstraram promoção do crescimento da planta *Arabidopsis thaliana* devido

a interação sinérgica entre as espécies. A cepa KP-14 de *B. altitudinis* promoveu o crescimento de *Miscanthus* × *giganteus* (Mxg) e *Brassica alba* (mostarda) através da produção de fitohormônios, secreção de sideróforos, melhoria na aquisição de fósforo e secreção de compostos orgânicos voláteis (PRANAW *et al*., 2020). Shen *et al*. (2015) utilizaram a cepa NJN-6 de *B. amyloliquefaciens* para o crescimento de *Musa paradisiaca* (banana), obtendo resultados promissores. A promoção do crescimento ocorreu através da secreção de compostos orgânicos e da geração de um biofilme protetor pela bactéria, de acordo com os autores. Na figura adaptada de Orozco *et al.* (2021), podemos observar os passos para a realização de um bioproduto promotor do crescimento de plantas (Figura 1).

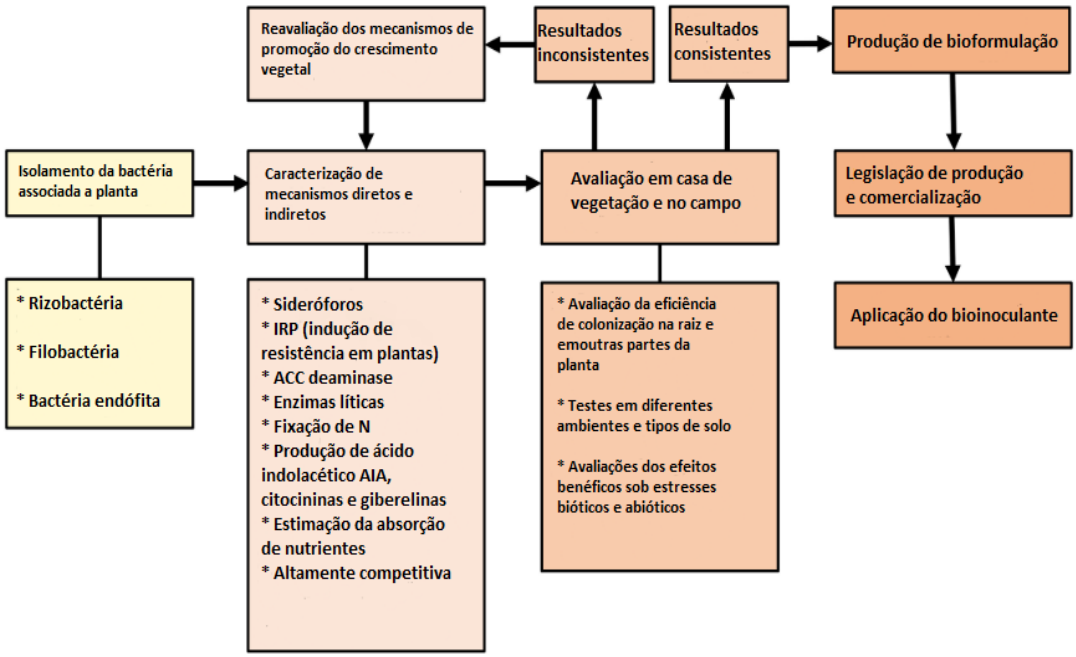

Figura 1. Um resumo dos processos para isolar e caracterizar bactérias promotoras de crescimento de plantas, a triagem preliminar para identificar as melhores cepas e os testes adequados para alcançar a formulação do bioinoculante.

4. Perspectivas

O aumento populacional que ocorrerá nos próximos anos demandará a ampliação da produção de alimentos (ONS *et al*., 2020). A ocorrência de pragas,

doenças e plantas daninhas nas culturas agrícolas é uma ameaça ao aumento da produção de alimentos. Além disso, a intensificação da produção agrícola não pode conduzir ao aumento dos preços dos alimentos, nem à degradação ambiental. Neste contexto, o controle biológico tem sido uma importante alternativa para o avanço da agricultura sustentável. A prática alia a produção lucrativa de base biológica com baixo impacto ambiental. Estas características têm conduzido ao crescimento muito acelerado da utilização do controle biológico em diversos países do mundo.

Entretanto, na utilização desta biotecnologia devem ser observados alguns fatores que tem grande influência na eficiência de bioprodutos, como as variáveis meteorológicas que ocorrem durante aplicação no campo, a tecnologia de aplicação, a qualidade do produto, o conhecimento do modo de ação do microrganismos, a compatibilidade com pesticidas sintéticos e entre microrganismos, etc. Estes são importantes desafios para o controle biológico, que demandarão mais inovação no desenvolvimento de novos bioprodutos, para que estes sejam amplamente utilizados nos sistemas agrícolas e possam contribuir para uma produção agrícola mais sustentável.

5. Referência bibliográficas

ABBASI, M. W. *et al*. Assessment of extracellular metabolites from *Bacillus* species against root-knot nematodes and root-infecting fungi in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. Special Issue, p. 289–294, 2017.

ABBASI, M. W. *et al*. Potential of *Bacillus* species against *Meloidogyne javanica* parasitizing eggplant (*Solanum melongena* L.) and induced biochemical changes. **Plant and Soil**, v. 375, n. 1–2, p. 159–173, 2014. https://doi.org/10.1007/s11104-013-1931-6.

ABBEY, J. A. *et al*. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)–prospects and challenges. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 241–262, 2019. https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574.

ABREU, M.M.V.; TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 236-251, 2004. https://doi.org/10.5102/ucs.v2i2.535.

AKPA, E. *et al*. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 20, p. 551-561, 2001. https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:551.

ANTIL, S. *et al*. Potential of *Bacillus altitudinis* KMS-6 as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Pest Science**, 2022. https://doi.org/10.1007/s10340-021-01469-x.

ASSIÉ, L. K. *et al*. Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain). **Mededelingen**, v. 67, n. 3, p. 647—655, 2002.

BAHARUDIN, M. M. A. A. *et al*. Antimicrobial activities of *Bacillus velezensis* strains isolated from stingless bee products against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 16, n. 5 May, p. 1–20, 2021.

BAKER, B. P.; GREEN, T. A.; L., Ali J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, p. 104095, 2020.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial comercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v, 53, p. 495-508, 2000.

BATISTA, C.D. *et al*. Perception of the use of integrated pest management by rural producers in the “Serra da Ibiapaba” Region, Ceará state. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e65791110271, 2020.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478–486, 2012.

BRASIL. 2009. Decreto no 6.913, de 23 de julho de 2009. Diário Oficial da União, Brasília, 24 jul. 2009. Seção 1, p. 8, 2009.

BRAVO, A. *et al*. *Bacillus thuringiensis*: uma história de um bioinseticida de sucesso. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.41, p. 423-431, 2011.

CASTILLO, F. J.; LUÉVANO, J.; IBARRA, J. E. Identification and characterization of a new *Cry*-like gene found in a *Bacillus cereus* strain. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 114, n. 11, p. 1759–1770, 2021.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA. PIB DO AGRONEGÓCIO ALCANÇA PARTICIPAÇÃO DE 26,6% NO PIB BRASILEIRO EM 2020. 10 de março de 2021. https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_CNA_relatorio_2020.pdf

CHARLES, J. F.; NIELSEN, C.; DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: Molecular biology and mode of action. **Annual Review of Entomology**, v. 41, n. 1, p. 451–472, 1996.

CHAUHAN, A. K. *et al.* Termitarium-inhabiting *Bacillus endophyticus* TSH42 and bacillus cereus TSH77 colonizing curcuma longa L.: Isolation, characterization, and evaluation of their biocontrol and plant-growth-promoting activities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 880–892, 2016.

CHEN, M. C. *et al*. Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1519–1529, 2019.

CHEN, M. *et al*. Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2020.

CRICKMORE, N. Usando minhocas para entender melhor como *Bacillus thuringiensis* mata insetos. **Tendências em Microbiologia**, v. 13, p.347-350, 2005.

DATTA, P.; TIWARI, P.; PANDEY, L. M. Oil washing proficiency of biosurfactant produced by isolated *Bacillus tequilensis* MK 729017 from Assam reservoir soil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 195, n. March, p. 107612, 2020.

DEMARTELAERE, A. C. F. *et al*. Danos causados ao meio ambiente, animais e ao homem com a utilização de agrotóxico: revisão bibliográfica / Damage caused environment, animals and man with the use pesticides: bibliographic review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 94668–94695, 2021.

DIMOPOULOU, A. *et al*. Shifting perspectives of translational research in bio-bactericides: Reviewing the bacillus amyloliquefaciens paradigm. **Biology**, v. 10, n. 11, 2021.

ECKSHTAIN, N. *et al.* Bacterial community members increase *Bacillus subtilis* maintenance on the roots of arabidopsis thaliana. **Phytobiomes Journal**, v. 4, n. 4, p. 303–313, 2020.

EL-HADAD, M. E. *et al*. *In vitro* evaluation of some bacterial isolates as biofertilizers and biocontrol agents against the second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2249–2256, 2010.

ENGELBRECHT, G. *et al*. Bacillus-based bionematicides: development, modes of action and commercialisation. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 629–653, 2018.

EVANGELISTA, J. G. V. N. *et al*. Inseticida biológico no controle de lagarta Spodoptera Eridania no cultivo da soja. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.12, n. 2, p. 548-556. 2021.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208–217, 1992.

GAO, H. *et al*. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–11, 2016.

GOMES. A. C. S. Biofungicides: An Eco-Friendly Approach for Plant Disease Management. **Encyclopedia of Mycology**. v. 2, p. 641-649, 2021.

GOSWAMI, M.; DEKA, S. Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, n. March, p. 285–296, 2019.

HARDOIM, P. R. *et al*. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HASSANEIN, W. A. *et al.* Insecticidal impacts of *Bacillus flexus* S13 biofilm'extracellular matrix' on cowpea weevil, Callosobruchus maculatus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, 2021.

HUANG, Y. *et al*. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 3, p. 417–422, 2010.

IBORT, P. *et al*. Tomato ethylene sensitivity determines interaction with plant growth-promoting bacteria. **Annals of Botany**, v. 120, n. 1, p. 101–122, 2017.

JEMIL, N. *et al*. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1060, p. 374–386, 2017.

JIN, P. *et al*. Antimicrobial effect of *Bacillus licheniformis* HN-5 bacitracin A on rice pathogen *Pantoea ananatis*. **BioControl**, v. 66, n. 2, p. 249–257, 2021.

KAHIA, M. *et al*. Insecticidal effect of Bacillus pumilus PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185 used alone and in combination against the foxglove aphid and the melon aphid (Hemiptera: Aphididae). **The Canadian Entomologist**, v. 153, n. 6, p. 726–740, 2021.

KHAN, A.S., GADELHA, J.V.M., SILVA, L.M.R. Benefícios Potenciais do Desenvolvimento Sustentável na Agricultura Cearense: O Caso da Região Serrana de Baturité. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 35, n. 1, p. 95-118, 2019.

KHAN, M. A. *et al.* Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat stress. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–14, 2020.

KNEŽEVIĆ, M. M. *et al*. The ability of a new strain of *Bacillus pseudomycoides* to improve the germination of alfalfa seeds in the presence of fungal infection or chromium. **Rhizosphere**, v. 18, 2021.

KU, Y*. et al*. Correction: Root colonization and growth promotion of soybean, wheat and Chinese cabbage by *Bacillus cereus* YL6. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 80–90, 2018.

LEE, J. P. *et al*. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 37, n. 3, p. 329–337, 2006.

LI, J. *et al*. Molecular Mechanisms of Nematode-Nematophagous Microbe Interactions: Basis for Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 67–95, 2015.

LI, B. *et al*. *Bacillus altitudinis* strain AMCC 101304: a novel potential biocontrol agent for potato common scab. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 10, p. 1009–1022, 2019.

LIU, Q. *et al.* Production, characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* L20 for microbial enhanced oil recovery. **Journal of Cleaner Production**, v. 307, n. May, p. 127193, 2021.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S. Importância dos fitonematoides na agricultura. In: OLIVEIRA, C. M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO, L. H. S. (Ed.). **Diagnose de fitonematoides**. Campinas: Millennium Editora, p. 1-11, 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Agrotóxico e Afins/DFIA/SDA. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT.- Consulta de Produtos Formulados. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons [Acesso em: 5 mai. 2022].

MARCHUT, O. *et al*. Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2021.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. **Crop Protection**, v. 77, p. 52–64, 2015.

MORALES, L. R. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, v. 242, n. May 2020, 2021.

MOURA, G. S.; FRANZENER, G. Biodiversity of nematodes biological indicators of soil quality in the agroecosystems. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–8, 2017.

MUNIZ, V. A. Atividade Larvicida de *Bacillus* spp. da Amazônia Brasileira portadores dos genes *Cry* e *Bsglu* (β-GLUCANASE), no controle de *Aedes Aegypti* Linnaeus, 1762. Dissertação (mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia). Universidade do Estado do Amazonas. p. 79, 2019.

NIU, Q. *et al*. Functional identification of the gene bace16 from nematophagous bacterium *Bacillus* nematocida. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 141–148, 2007.

NOGUEIRA, R.C.; CARQUEIRA, H.F.; SOARES, M.B.P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20, n. 2, p.145-157, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. Segurança de agentes microbiológicos para o controle de pragas: avaliação toxicológica. **Revista Brasileira de Toxicologia** , v.18, n.1, p.71-75, 2005.

ONS, L.; BYLEMANS, D.; THEVISSEN, K.; CAMMUE, B. P. A. Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. **Microorganisms**, v. 8, p.1-19, 2020.

OROZCO, M. *et al.* Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiological Research**, v. 208, p. 25–31, 2018.

OROZCO, M. *et al.* Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. **Agronomy**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2021.

PARRA, J.R. P. Controle biológico das pragas do citros. **Boletim Citrícola,** 2002.

PECCI, Y. *et al.* LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 772–778, 2010.

POLANCZYK, R.A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, v. 7, p. 1-10, 2003.

PRANAW, K. *et al*. Bioprospecting of a Novel Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus altitudinis* KP-14 for Enhancing Miscanthus × giganteus Growth in Metals Contaminated Soil. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 305, 2020.

RAMEZANI, M. *et al*. The nematicidal potential of local *Bacillus* species against the root-knot nematode infecting greenhouse tomatoes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 279–290, 2014.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 5, p. 1109–1114, 2008.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1523–1538, 2011.

SARANGI, T.; RAMAKRISHNAN, S.; NAKKEERAN, S. Biocontrol potential of endophytic *Bacillus* spp. against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Pestology**, v. 38, n. 6, p. 27–34, 2014.

SAUER, A. V. *et al.* Survival of pantoea ananatis, causal agent of maize white spot disease in crop debris. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 21, 2015.

SCHÜNEMANN, R., KNAAK, N., FIUZA, L. M., Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis toxins* in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

SHEN, Z. *et al*. Deep 16S rRNA pyrosequencing reveals a bacterial community associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression induced by bio-organic fertilizer application. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.

SHEN, Z. *et al.* Effect of the combination of bio-organic fertiliser with *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 on the control of banana *Fusarium* wilt disease, crop production and banana rhizosphere culturable microflora. **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 6, p. 716-731, 2015.

SIMÃO, A. M. T. *et al*. Toxicity assessment of a comercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticide on Nile tilápia, Oreochromis niloticus. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 2022.

SUNAR, K. *et al.* Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 91–104, 2015.

UNFER, R.K. *et al.* Métodos de preservação de fungos em laboratório. *In*: DOS SANTOS, C.A. **Grandes temas em Agronomia**. Editora Uniedusul, p. 9-18, 2019.

BOSCH, R. V. D.; MESSENGER, P. S.; GUTTIERREZ, A.P. An introduction to biological control. **New York: Plenum press**, 247 p., 1982.

VAN LENTEREN, J. C. *et al*. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v.63, p. 39-59, 2018.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 389–397, 2017.

VECINO, X. *et al.* Optimization of extraction conditions and fatty acid characterization of *Lactobacillus pentosus* cell-bound biosurfactant/bioemulsifier. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 2, p. 313–320, 2015.

VILLALOBOS, S.D.L.S. *et al*. *Bacillus cabrialesii* sp. Nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) in the yaqui valley, Mexico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 3939–3945, 2019.

WANG, J. Y. *et al.* Biocontrol potential of *Bacillus altitudinis* AMCC1040 against root-knot nematode disease of ginger and its impact on rhizosphere microbial community. **Biological Control, V. 158, n. p. 2021.** https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104598

WEI, J. Z. *et al. Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2760–2765, 2003.

XIANG, N. *et al.* Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 774–784, 2017.

XIONG, J. *et al.* Systemic nematicidal activity and biocontrol efficacy of *Bacillus firmus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 661–667, 2015.

YANG, J. *et al.* Identification, and Herbicidal Activity of Metabolites Produced by *Pseudomonas aeruginosa* CB-4. **Journal of Integrative Agriculture**, v.13, p. 1719-1726, 2014.

YARAGUPPI, D. A. *et al.* Response surface methodology-based optimization of biosurfactant production from isolated *Bacillus aryabhattai* strain ZDY2. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 10, n. 6, p. 2483–2498, 2020.

YIN, N. *et al.* Biocontrol Efficacy of *Bacillus cereus* Strain Bc-cm103 Against *Meloidogyne incognita*. **Plant Disease,** v. 105, p. 2031-2070, 2021.

ZHOU, H *et al.* Efficacy of Plant Growth-Promoting Bacteria *Bacillus cereus* YN917 for Biocontrol of Rice Blast. **Frontiers in microbiology,** v. 12, p 1-9, 2021a.

ZHOU, H. *et al.* Efficacy of *Bacillus tequilensis* strain JN-369 to biocontrol of rice blast and enhance rice growth. **Biological Control**, v. 160, n. October 2020, p. 104652, 2021b. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104652.

Autores

Vicente Guilherme Handte, Valéria Ortaça Portela, Lisiane Sobucki, Bruno Cherobini Piovesan, Mônica Dickow Pozzobon, Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria, Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, Brasil. E-mail: rodrigo@ufsm.br

* Autor para correspondência: rodrigo@ufsm.br

CAPÍTULO 4

Avaliação da atividade antibacteriana da *Cyperus rotundus* Linn. (Cyperaceae) por meio de um sistema de análise por injeção em fluxo

Bianca de Souza Campos, Geovanna Kelly Chagas, Maria Karollyne Ferreira de Oliveira, Júlio Cezar de Jesus Silva, Viviane Gomes Bonifacio, Giuliana Muniz Vila Verde, Jonas Alves Vieira

https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-08-4.c4

Resumo

A *Cyperus rotundus,* conhecida popularmente no Brasil como Tiririca ou Junça aromática é uma planta daninha, com cerca de 20-40 cm de altura, composta por inflorescências, folhas basais e rizomas que terminam em tubérculos ovalados e negros. Com grande potencial medicinal, apresenta diversas atividades farmacológicas como: adstringente, diaforética, diurética, emenagoga, sedativa, vermífuga, tônica e antibacteriana. O objetivo deste trabalho foi utilizar um sistema de análise por injeção em fluxo contínuo com detecção espectrofotométrica, para avaliação antibacteriana das soluções dos extratos brutos etanólicos e das frações semi purificadas das folhas e dos rizomas da *Cyperus rotundus*, frente a bactéria *Escherichia coli*. A planta passou por uma fase de tratamento, onde obteve-se amostras em pó da droga vegetal das folhas e dos rizomas. Estas foram submetidas à técnica de maceração com o etanol, e posteriormente a pressão reduzida, conduzindo ao extrato bruto etanólico (E.B.E), uma parte do mesmo foi fracionada e semi-purificadas em AcOEt, Hexânica, Diclorometânica e Aquosa. Os testes foram realizados usando 5 soluções de leitura: branco em relação a microrganismos, referência de comparação, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,88 % e de amostras do fracionamento. As leituras foram realizadas em intervalos de 30 minutos durante 270 minutos. As amostras dos rizomas da planta, apresentaram uma leve ação antimicrobiana sobre o inóculo, sendo a fração de AcOEt 144 mgL^{-1} a que mais inibiu a bactéria. Nas amostras das folhas foi observado fornecimento de nutrientes, proporcionando maior proliferação populacional da bactéria. A atividade antibacteriana da *C. rotundus*, se deve principalmente à produção de metabólitos secundários.

Palavras-Chaves: Avaliação antibacteriana, *Escherichia coli*, Sistema de análise por injeção em fluxo, Tiririca.

1. Introdução

As plantas para garantir sua sobrevivência no meio ambiente produzem metabólitos secundários que apresentam diversas funções, dentre elas proteção

Rafael Fernández Da Silva (Org.) © 2022 Mérida Publishers CC-BY 4.0

contra herbívoros, fungos e bactérias, alelopatia, atração de polinizadores etc. Muitos desses metabólitos podem ser utilizados na produção de cosméticos e medicamentos, devido as suas propriedades farmacológicas como por exemplo, antioxidante, anti-inflamatória, analgésico, estimulante do Sistema Nervoso Central, antitumoral, antisséptica e dentre outras propriedades (VIZZOTO *et al.*, 2010).

O Cerrado apresenta uma grande biodiversidade taxonômica e produção de compostos bioativos, que vem despertando interesse na investigação científica de plantas medicinais (LIMA NETO *et al.*, 2015), dentre elas destaca-se a planta *Cyperus rotundus*, conhecida popularmente como tiririca ou Junça-aromática. *Cyperus rotundus* é originária da Índia, sendo considerada uma das espécies vegetais com maior amplitude de distribuição no mundo, devido a sua capacidade de adaptar-se a diferentes tipos de solo, altitudes, temperaturas e pH do solo (SIVAPALAN, 2013). No Brasil, ocorre em quase toda extensão territorial e é vista como uma planta daninha, por possuir efeito alelopático e apresentar tubérculos que permanecem dormentes por longo período, contribuindo para a persistência dessa espécie no solo (SILVEIRA *et al*., 2010).

A tiririca é uma planta pequena e herbácea que produz poucas sementes viáveis, apresentando rizomas que podem se diferenciar em tubérculos ou bulbos basais. Os metabólitos que foram detectados na *Cyperus rotundus* são alcaloides, antraquinonas, cumarinas, esteroides e triterpenos, flavonoides, saponinas, taninos, resinas, amido, glicosídeos, monoterpenos, sesquiterpenos, sitosterol, terpenóides, óleos essenciais etc. (AL-SNAFI, 2016; SIVAPALAN, 2013).

Deste modo, a tiririca pode ser utilizada no combate a pragas em sistemas agroecológicos, indução de enraizamento e como uso medicinal (BARBOSA *et al*., 2007; SINGH *et al*., 2012; SARNO *et al*., 2014). Alguns efeitos farmacológicos da *C. rotundus* são anti-inflamatório, sedativo, anti-histamínico, antimalárica, antiparasitária, antipirético, antioxidante, efeito gastrointestinal, antidiabético, antimicrobiano, anticonvulsivante, hipolipemiante, entre outros efeitos (AL-SNAFI, 2016; SINGH *et al*., 2012; SIVAPALAN, 2013).

Logo, como a tiririca produz uma variedade de metabólitos que apresentam toxicidade para patógenos microbianos, essa pode influenciar no crescimento da bactéria *Escherichia coli*. A análise da toxicidade pode ser

detectada por sistema de análise poe injeção de fluxo em que avalia a turbidez da bactéria através do espectrofotômetro.

Portanto, como a planta tiririca encontra-se em diferentes locais, principalmente no Cerrado, e é utilizada na medicina popular por apresentar uma variedade de compostos químicos que podem influenciar no crescimento da *Escherichia coli*, e como vem ocorrendo um decréscimo na produção de antimicrobianos e um aumento na resistência dos microrganismos aos mesmos, acarretando sérios problemas na saúde pública, são necessários desenvolvimentos de pesquisas para que se possa isolar o(s) composto(s) químico(s) que trazem os benefícios antimicrobianos.

Dessa maneira o objetivo deste trabalho é o emprego do sistema de análise por injeção em fluxo, proposto para avaliação antibacteriana em amostra das folhas e dos rizomas da *Cyperus rotundus*, usando a bactéria *Escherichia coli* como teste, inoculada em meio de cultura e dopada com os extratos da referida amostra.

Referencial teórico

2.1. Família Cyperaceae

A família Cyperaceae é uma família cosmopolita, herbácea com grande diversidade principalmente em trópicos úmidos e semiúmidos, mas também frequente dominante em temperaturas frias. Compreende 104 gêneros e aproximadamente 5000 espécies. Apresenta características bem definidas, a maioria são perenes, relvadas, semelhantes a gramas. Estão associadas á formação em ambientes mal drenados como brejos, pântanos e em margens de rios e corpos d'água (GOETGHEBEUR, 1998).

Suas folhas são geralmente lineares e plana, as hastes não costumam apresentar ramificações, sendo que normalmente crescem em um colmo com uma inflorescência terminal central. Podem desenvolver curtos ou alongados rizomas (bulbos espessados), subterrâneos que terminam em tubérculos. Uma ocorrência quase universal é a presença de corpos de sílica, nas paredes internas das células da epiderme (GOETGHEBEUR, 1998).

2.2. Gênero *Cyperus*

Dentre o gênero *Cyperus* destacam diversas espécies, que possuem interesse economicamente, na alimentação, nos cosméticos e na medicina. Uma das espécies mais antigas historicamente é a *Cyperus papyrus L*, ou comumente papiro, conhecido pela sua cultivação pelos antigos egípcios, gregos e romanos na produção de papiros; um tipo de papel feito de tiras da medula do colmo colocadas e pressionadas juntas. Estudos apontam a utilização do papiro para a produção de biomassa sólida, para o cozimento de alimentos, na África Subsaariana. Na Figura 1, é possível visualizar a amplitude da distribuição mundial do gênero (JONES, 2018).

No Brasil, o gênero *Cyperus* abrange principalmente as ervas daninhas nas culturas de arroz, ocasionando aspectos negativos diretos na competição por recursos ambientais, dificultando a colheita, e por consequência acaba afetando a rentabilidade (ULGUIM *et al.*, 2019). O manejo é realizado principalmente por meio do controle com o uso de herbicidas, porém segundo Chapinotto *et al*. (2017), o uso excessivo selecionou plantas daninhas resistentes à acetolactato sintase (ALS) que inibe herbicidas em áreas de arroz irrigado.

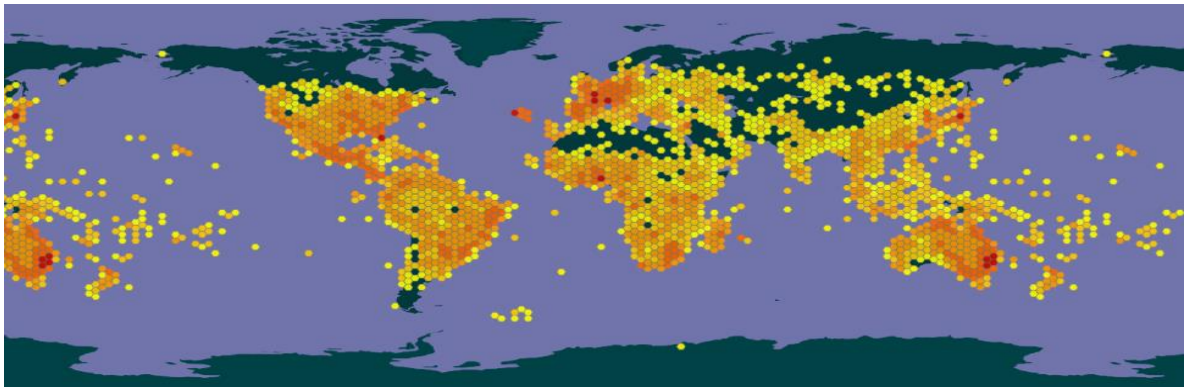

Figura 1. Distribuição mundial do gênero *Cyperus.* Fonte : GBIF, 2022. Disponível em:https://www.gbif.org/species/2713455.

Uma espécie de grande caráter econômico é a *Cyperus articulatus* L, conhecida vulgarmente como priprioca que apresenta distribuição nas Américas tropical e subtropical, sendo muito encontrada na Amazônia. Devido os seus óleos essenciais aromáticos é bem vista na confecção de perfumes (FERREIRA, 2018).

2.3. Espécie *Cyperus rotundus L.*

De origem indiana, a *Cyperus rotundus* Linn., uma planta conhecida popularmente como Tiririca, é amplamente distribuída pelo mundo, acredita-se que sua chegada no Brasil foi durante os tempos coloniais, pelos navios mercantes portugueses (SANTOS, 2014). Pertencente à família Cyperaceae, com cerca de 20-40 cm de altura é composta por inflorescências, folhas basais de coloração verde-brilhante e inervação paralelinérvea, caule de haste triangular e caule subterrâneo (rizoma) com raízes que terminam em tubérculos ovalados e negros, conforme representada na Figura 2 (ARANTES, 2005).

Figura 2. *Cyperus rotundu*s L. (a) inflorescências e folhas (b) rizomas com os tubérculos. Fonte : https://www.gbif.org/occurrence/gallery, taxon_key=2714818. 2022 Décio Karam Embrapa.

Conhecida pela sua sobrevivência e persistência nas lavouras de cana-de-açúcar e algodão, é uma planta daninha de ciclo fotossintético C_4, que possui uma maior eficiência na absorção de CO_2 atmosférico (AZANIA *et al*., 2006). Sendo assim, acaba adaptando-se melhor em locais com climas quentes e secos. Detêm de uma diversidade química de espécies, notável pelas diferenças na composição química dos seus óleos essenciais (SANTOS, 2014).

É utilizada na alimentação animais suínos, na confecção de utensílios, na indústria têxtil e de uso medicinal (SANTOS, 2014). Estudos estão sendo feitos para mostrar suas potenciais atividades farmacológicas como: anti-inflamatória, antidiabética, antipirética, analgésica, anti-dismenorréia, repelente, entre outros

(SINGH *et al*., 2012). Os rizomas são considerados adstringentes, diaforéticos, diuréticos, aromáticos, emenagogos, sedativos, vermífugos, tônicos e antibacterianos (AL-SNAFI, 2016).

Em um estudo os rizomas de *Cyperus rotundus* foi submetido a análise por GC-MS mostrando um perfil altamente complexo; contendo cerca de dez componentes de alcalóide e aproximadamente vinte e cinco componentes pertencem ao de fenóis (ABO-ALTEMEN *et al*., 2019). Kamala *et al*. (2018), fizeram uma revisão sistemática na qual encontraram mais de 30 estruturas nos rizomas da espécie (Figura 3).

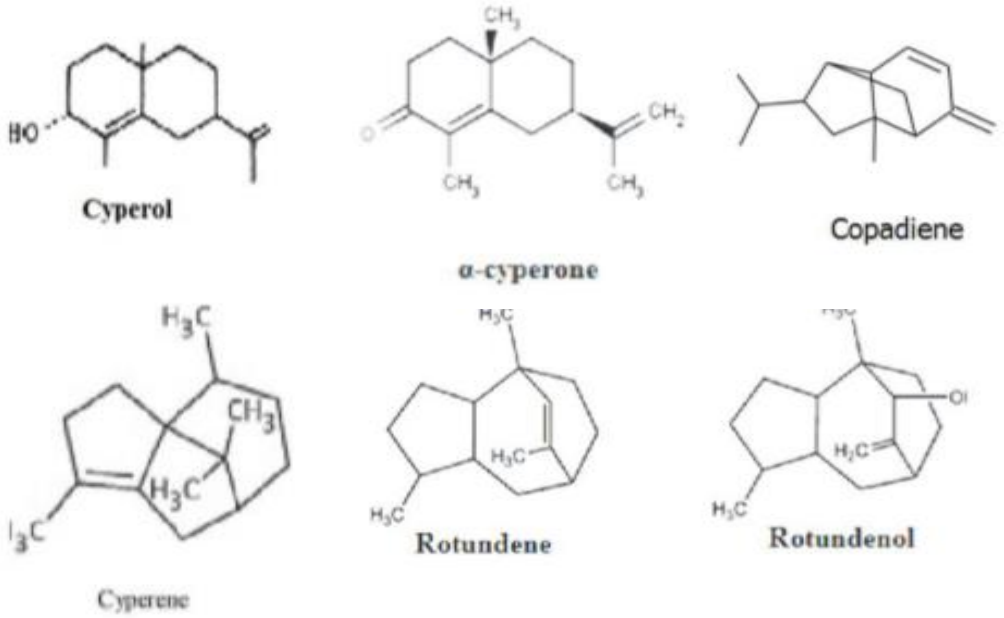

Figura 3. Estruturas encontradas nos rizomas da *C. rotundus*. Fonte: Adaptado de Kamala (2018).

2.4 *Escherichia coli*

Com cerca de 1 micrômetro de comprimento, a *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa, cuja morfologia é de bastonetes. Descoberta em 1962 pelo cientista Escherich, pertence à família *Enterobacteriaceae,* faz parte da microbiota do trato intestinal de humanos e de outros mamíferos, pois contribui para a produção de certas vitaminas e participa da digestão de alimentos. Sendo assim, sua presença na água e nos alimentos é indicativo de contaminação fecal (KAPER *et al*., 2004; TORTORA *et al*., 2010; ROSA *et al*., 2016).

Por fissão binária, em condições favoráveis, se divide a cada 20 minutos, assim após 20 gerações, uma única célula inicial poderá gerar mais de um milhão de células. Desta forma, apresenta como vantagem o fato de ser facilmente cultivada, além de características bioquímicas e genéticas bem conhecidas. Entretanto, esta bactéria, possui algumas linhagens patogênicas que causam infecções urinárias e gastrenterite, mais comumente conhecida como diarréia dos viajantes. Isto se deve ao fato de transportar plasmídeos codificadores de toxinas e de fímbrias que permitem a maior fixação bacteriana às células intestinais. (KAPER *et al*., 2004; TORTORA *et al.*, 2010; ROSA *et al*., 2016).

A linhagem chamada de *Escherichia coli* O157:H7, tem sido tratada como problema de saúde pública. Atualmente, é uma das principais causas de diarreia no mundo. Em 1996, cerca de 9 mil pessoas no Japão ficaram doentes e sete morreram como resultado de uma infecção por *Escherichia coli* O157:H7. Na maioria dos surtos estão associados com carne malpassada e bebidas não pasteurizadas, por essa incidência os órgãos de saúde dos Estados Unidos incentivaram a pesquisa científica para o desenvolvimento de novos métodos de detecção da bactéria nos alimentos (KAPER *et al*., 2004; TORTORA *et al.*, 2010; ROSA *et al*., 2016).

2.5. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O sistema de análise por injeção em fluxo é uma técnica alternativa, na qual consiste em procedimentos analíticos automatizados. Tem como princípio a injeção de uma solução de amostra no seu percurso analítico, que se dispersa e entra em contato com uma solução transportadora podendo estar apta a sofrer reações químicas, e se separar ou se concentrar, resultando em um produto a ser detectado (REIS *et al*., 1989; MOREIRA, 2014).

Apresenta como vantagens o baixo custo, a rapidez (tempo de 20 a 50 s) a praticidade e versatilidade, alta frequência de amostragem, já que permite maior reprodutibilidade, menor risco de exposição do analista a substâncias tóxicas, e pouco consumo de reagentes, contribuindo para a redução na geração de resíduos no meio ambiente. Além de ser munida a adaptações, em suas estruturas, para controlar o volume, a vazão de amostragem ou para adquirir

diferentes tipos de detecção como condutométrica, espectrofotométrica, potenciométrica, amperométrica, entre outras. (REIS *et al*., 1989; SANTOS, A. C. V.; MASINI, J. C., 2010; DOS SANTOS *et al*., 2011; MOREIRA, 2014; TOLEDO, MA *et al*., 2018; TOLEDO, Mônica A, *et al*., 2019).

2.6. Atividade antibacteriana

O crescimento bacteriano apresenta resposta constante na Figura 4, conforme retratado por *Farah* (2001):

- Fase lag: corresponde ao período inicial. Não há aumento no número de bactérias viáveis, mas uma adaptação ao meio. Neste período as células aumentam de tamanho e ficam prontas para a divisão.
- Fase Logarítmica ou Exponencial: corresponde ao período de crescimento rápido e máximo no número de bactérias viáveis.
- Fase Estacionária: corresponde ao período onde o número de bactérias viáveis permanece constante. Ha um equilíbrio entre o ritmo de reprodução e o ritmo de morte por razões como esgotamento de nutrientes essenciais e acúmulo de produtos metabólicos tóxicos.

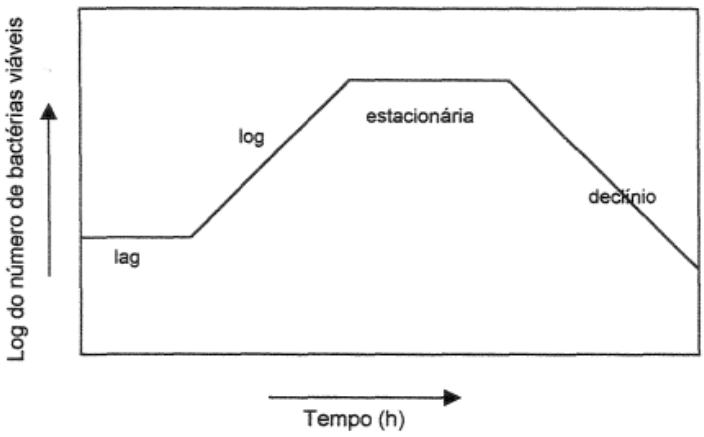

Figura 4. Curva do crescimento bacteriano. Fonte: FARAH (2001).

- Fase de declínio ou desativação da bactéria: corresponde ao período em que o número de bactérias viáveis decresce, onde ocorre mais mortes do que produção (FARAH, 2001).

3. Metodologia

3.1. Material botânico

Realizou-se a coleta da *Cyperus rotundus* no início do mês de novembro de 2016, área situada às margens da Rua Getúlio Dédio de Brito Qd. 23, Lt.19, Residencial Vale dos Sonhos, Goiânia - GO, com as coordenadas geográficas correspondentes a latitude 6°35'54.1"S e longitude 49°12'15.1"W. A exsicata foi armazenada no herbário do Campus Central - SEDE-CET, Anápolis da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

Posteriormente, a planta passou pela fase de tratamento, na qual constituiu-se na obtenção da droga vegetal. Primeiramente lavou-se com sanitizante para retirada da sujidade e de possíveis contaminantes. Realizou-se a secagem sob condições normais, a temperatura ambiente, para que não houvesse a eliminação de substâncias voláteis, que durou 8 dias ao ar livre na sombra. Após a secagem, separou-se as folhas juntamente com as inflorescências dos rizomas e tubérculos e procedeu-se a moagem das amostras separadamente. A moagem foi realizada em um moinho de facas *MARCONI* (modelo 680) com granulação de 40 meshs.

3.2. Preparação dos extratos vegetais

Exatamente 300 g da droga vegetal pulverizada das folhas e dos rizomas foram submetidos ao processo de extração por maceração com etanol 70 ºGL, sob agitação manual com renovação do solvente de 2 a 4 dias. Durante o preparo, armazenou-se o extrato ao abrigo da luz e perante refrigeração, para evitar a degradação por oxidação/hidrólise e contaminação microbiana. Realizou-se cerca de 15 extrações, para extrair o máximo de substâncias possíveis.

O filtrado obtido das extrações passou-se pelo método de rotoevaporação no evaporador rotativo *QUIMIS*, modelos 34482 e Q344M2, temperatura de 40 ºC, com objetivo de eliminar o etanol e para subsequente obtenção do extrato bruto etanólico (E.B.E.).

3.3. Fracionamento das extrações

Para a extração de variáveis metabólitos secundários, optou-se pela realização do fracionamento do E.B.E.. Submeteu-se à partição líquido-líquido com solventes orgânicos, 34,20 g de E.B.E das folhas e 35,46 g dos rizomas, no qual a princípio foi solubilizado em uma mistura de 7:3 metanol água com o auxílio de um banho ultra-sônico *Unique Clean*, modelo *Maxi Clean 750*, para a retirada de clorofilas. Em seguida, o extrato foi submetido ao fracionamento com os solventes descritos na Figura 5, separando-se a fase orgânica da fase aquosa. Obtendo-se três frações semi purificadas e uma residual (aquosa).

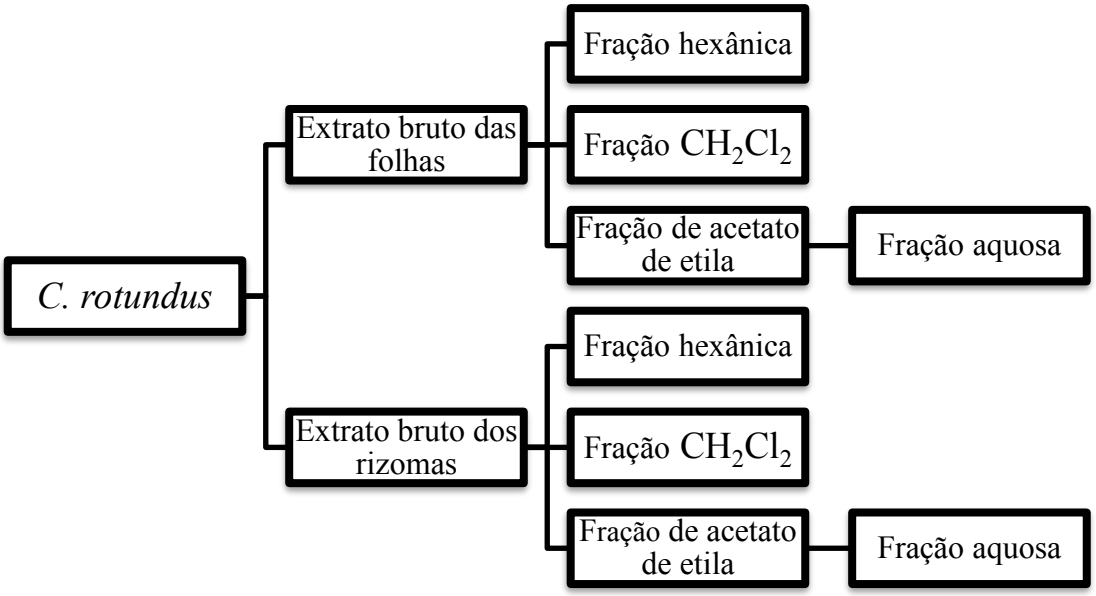

Figura 5. Esquema da etapa de Fracionamento de partição líquido- líquido do extrato bruto etanólico de *C.rotundus*.

Em cada fração foi adicionado o sulfato de sódio anidro para absorver o restante de água presente nas mesmas, e em seguida concentrou-se as frações no evaporador rotativo na temperatura de 40 ºC.

3.4. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA), trata-se de um sistema fechado que oferece condições adequadas para análises envolvendo microorganismos, com o desígnio de evitar ou minimizar a contaminação do laboratório com os mesmos.

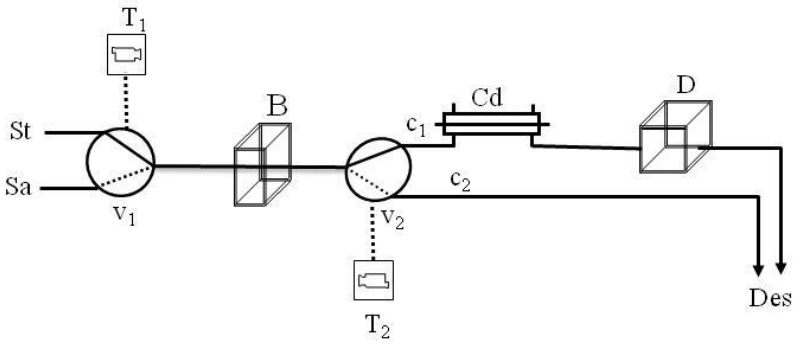

Figura 6. Módulo de análise do sistema em fluxo contínuo. St = Reagente e solução transportadora ($H_2SO_4$0,2 mol/L^{-1}); Sa = solução de amostra; v_1 e v_2 = válvulas solenóides de três vias; B = bomba peristáltica; c_1 = caminho 1; c_2 = caminho 2; Cd = câmara de separação por difusão gasosa; T1 e T2 = Temporizadores semi-automáticos; D = Espectrofotômetro; Des = descarte.

Conforme o módulo de análise do sistema em fluxo representado na Figura 6, mantendo-se as válvulas v_1 e v_2 desligadas, a solução transportadora flui pelo caminho c_1, passando pela câmara de separação Cd, detector (D), indo para o descarte (Des). Para inserir a solução de amostra liga-se a válvula (v_1), por um intervalo de tempo previamente definido e, em uma dada vazão para delimitar o volume da solução de amostra (sa) a ser inserido no percurso analítico do sistema em fluxo. Após a amostragem, desliga-se v_1, voltando fluir a solução transportadora que transporta a solução da amostra pelo canal c_1, passando pela cubeta no detector, onde é gerado um sinal de absorbância em função da turbidez propiciada pela proliferação dos microrganismos nas soluções, em seguida chega ao descarte. Na câmara de difusão ocorre a separação e descarte do gás CO_2. O descarte do CO_2 faz-se necessário, uma vez que ao passar pela cubeta no espectrofotômetro, gera instabilidade nas leituras, devido alteração no meio reacional, propiciada pelo mesmo.

A válvula (v_2), só é ligada durante a troca de solução de amostra, essa é usada para desviar os resíduos de soluções de amostras, pelo caminho c_2 indo direto para o descarte, sem passar pelo detector. Assim, v_2 é ligada juntamente com v_1 por certo intervalo de tempo apropriado, para efetuar a troca de solução de amostra corroborando para aumentar a frequência analítica. Em seguida,

desliga-se v_1 e na sequência v_2, voltando a fluir a solução transportadora por c_1. Nessa condição pode-se iniciar um novo ciclo de amostragem.

Quanto aos temporizadores semiautomáticos, são dispositivos construídos no laboratório, com escala de tempo variável de 0,5 segundos a 5 minutos. Estes acessórios permitem ligar e desligar componentes eletrônicos, em intervalo de tempo definido pelo analista. É constituído de uma chave que uma vez acionada, liga o aparelho, que permanece ligado durante o intervalo de tempo definido previamente, ao final deste período desliga-o automaticamente. Para esse sistema em fluxo, os temporizadores foram construídos com o objetivo de ligar e desligar as válvulas solenoides de três vias v_1 e v_2, requeridas para realização da análise química. Para efetuar a amostragem, usa-se o temporizador t_1 para ligar v_1. Usando um intervalo de tempo constante, para reproduzir com precisão os volumes de soluços serem inseridos no percurso analítico do referido sistema.

A válvula v_2 é ligada pelo temporizador t_2, de forma semelhante a v_1. Entretanto o intervalo de tempo que v_2 permanece ligada, deve ser maior que o de v_1, para garantir a troca de soluço de amostra e a limpeza do percurso analítico de forma adequada. Assim ao desligar v_1 e mantendo v_2 ligada por maior intervalo de tempo, a solução transportadora continuará fluindo por c_2, descartando todo o resíduo gerado durante a troca de solução de amostra. Todas as condições de otimizações das análises foram definidas experimentalmente.

Os estudos foram realizados inserindo-se 200 μL de solução de amostra, que correspondia 5 s de amostragem, cuja vazão foi mantida em 2,4 $mLmin^{-1}$. No espectrofotômetro UV-Vis, as leituras em absorbância foram efetuadas usando o comprimento de onda em 440 nm.

3.5. Meio de cultura

Utilizou-se o meio de cultura denominado de mínimo para o crescimento da bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922). Pesou-se 7 g de K_2HPO_4; 3 g de KH_2PO_4; 1 g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,1 g de $MgSO_4.7H_2O$ e 0,5 g de citrato de sódio. Solubilizou-se e dilui-se cerca de 800 mL de água destilada, ajustou-se o pH

para 7,2 com solução de KOH. Autoclavou-se (121°C por 15 minutos) e em seguida resfriou-se a aproximadamente 70°C, quando então adicionou-se cerca de 200 mL de solução previamente fervida contendo 20 g de glicose. Em resumo esta composição foi para preparar 1 litro de meio de cultura. Armazenou-se em frasco estéril.

3.6. Preparação das soluções das amostras das folhas, rizomas e de DMSO

Para a realização de teste biológico nas amostras do E.B.E e das frações (amostras das folhas e dos rizomas), todas as soluções das amostras foram preparadas conforme descrito a seguir:

a) Solução das amostras dos E.B.E., pesou-se 103 mg das amostras, que se solubilizou em 4 mL de Dimetilsufóxido (DMSO), que foi aferida em um balão volumétrico de 50 mL, com água deionizada, resultando na concentração em amostra de 2000 mgL^{-1}. Esse mesmo procedimento foi usado na preparação das soluções das amostras das frações.
b) Solução da fração hexânica, 2080 mgL^{-1} em amostras;
c) Solução da fração de diclorometano, 2080 mgL^{-1} em amostras;
d) Solução da fração de acetato de etila (AcOEt), 2000 mgL^{-1} em amostras;
e) Uma solução de DMSO 8%, foi preparada transferindo-se 4 mL de DMSO (PA) para um balão volumétrico de 50 mL e completando o volume com água deionizada.

A solução de DMSO 8% foi utilizada com o objetivo de avaliar se esse solvente usado na solubilização das amostras, na referida concentração, poderia interferir no desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli*, usada na avaliação antibacteriana nas soluções em análise.

3.7. Preparação das soluções de leitura para avaliação biológica

Todas as soluções de leitura foram preparadas usando alíquotas das soluções, conforme descrito no Tabela 1.

Tabela 1. Procedimento usado na preparação das soluções de leituras. Avaliação das soluções em branco, referência, DMSO e das amostras das folhas e dos rizomas da planta *Cyperus rotundus*.

Soluções	Alíquotas em (mL)						
	Meio de Cultura	Suspensão de *E.coli*	Água	E.B.E. 2000 mg L^{-1}	Fração hexânica 2080 mg.L^{-1}	Solução DMSO 8%	Volume Final
Branco	26,2	-	3,8	-	-	-	30
Referência	26,2	0,5	3,3	-	-	-	30
DMSO 0,88%	26,2	0,5	0,38	-	-	3,3	30
E.B.E. 104 mgL^{-1}	26,2	0,5	1,74	1,56	-	-	30
Fração hexânica 102,67 mg.L^{-1}	26,2	0,5	1,82	-	1,48	-	30

As soluções de leituras das demais amostras foram preparadas seguindo o mesmo procedimento descrito na tabela 1.

Descrições das soluções da Tabela 1:

- Solução em branco, constituída somente do meio de cultura, foi utilizada para certificar que o meio de cultura usado nas análises, encontrava-se isento de contaminação por possíveis microrganismos;
- Solução de DMSO 0,88 %, teve como objetivo verificar suas possíveis interferências no desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli*. A utilização dessas soluções fez-se necessário, uma vez que as amostras foram

solubilizadas com este solvente, resultando essa concentração nas soluções de leitura.

- Solução de referência, foi usada como meio de comparação referente ao desenvolvimento da bactéria nas soluções das amostras em análise, para verificar a presença de substâncias prejudiciais ou benéficas à mesma. Sendo que, as prejudiciais poderiam inibir o crescimento populacional da *Escherichia coli*, enquanto as benéficas poderiam favorecer a sua proliferação, podendo apresentar um desenvolvimento semelhante ou até mesmo maior do que na solução de referência.
- Quanto às soluções de leituras das amostras da planta, teve como objetivo a avaliação antibacteriana nas mesmas, fundamentado na inibição ou na proliferação da bactéria, usada como teste.

Todas as soluções foram preparadas em frascos estéreis distintos. Após a preparação, estas soluções foram submetidas a uma leitura inicial e em seguida foram mantidas no banho termostatizado a 37 °C durante toda a duração das análises, as leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV/VIS *BIOSPECTRO ® modelo Sp 220*, comprimento de 440 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extratos e frações de Cyperus rotundus

A droga vegetal obtida das folhas apresentou-se uma coloração esverdeada, já a dos rizomas apresentou-se uma coloração acastanhada; ambas com um odor aromático característico adocicado. Em seguida, esta passou-se pelo processo de extração, no qual, consiste na retirada de um ou mais constituintes de uma matéria prima natural, com o auxílio de solventes líquidos (SIMÕES, 2017).

Considerando os tipos de extrações existentes, optou-se por uma variação da operação de maceração, a remaceração; na qual a matéria-prima é extraída por um líquido extrator em um recipiente fechado, com a renovação do solvente. O líquido extrator escolhido foi o álcool 70 ºGL, para a maior extração de componentes, já que apresenta afinidade com muitos compostos, além de evitar o crescimento microbiano por ser um excelente conservante (SIMÕES, 2017).

O extrato foi mantido sob refrigeração e ao abrigo de luz, para evitar danos por reações de oxidação e hidrólise; ocasionalmente, agitou-se o extrato manualmente para o maior contato com a matriz vegetal. Para não haver a saturação do solvente, houve sua renovação de 3 a 4 dias, sendo este filtrado e posteriormente armazenado sob refrigeração (SIMÕES, 2017). Apesar da massa seca inicial ter sido alta cerca de 300 g, o rendimento foi consideravelmente baixo, mas isso pode ser justificado pela perda durante o processo. O rendimento do extrato e de cada uma das frações encontra-se descrito na tabela 2.

Tabela 2. Quantidade e rendimento dos extratos e frações da *Cyperus rotundus*

	Peso (g)	**Rendimento (%)**
Folhas		
Extrato bruto etanólico	42,02	14,74
Fração hexânica	0,243	
Fração diclorometano	1,09	12,20
Fração Acetato de etila	2,84	
Total	4,173	
Rizomas		
Extrato bruto etanólico	49,493	16,49
Fração hexânica	0,956	
Fração diclorometano	2,96	18,68
Fração Acetato de etila	2,71	
Total	6,626	

Concentrou-se o filtrado por evaporação sob vácuo e a temperatura mais baixa, já que os extratos mostraram-se sensíveis. Obteve-se um extrato bruto etanólico (E.B.E.) semi-sólido espesso. Para conseguir mais seletividade dos compostos químicos no ensaio biológico, realizou-se a etapa de fracionamento com a etapa de partição com os solventes de polaridade crescente (SIMÕES, 2017). As amostras obtidas do fracionamento estão representadas na Figura 7.

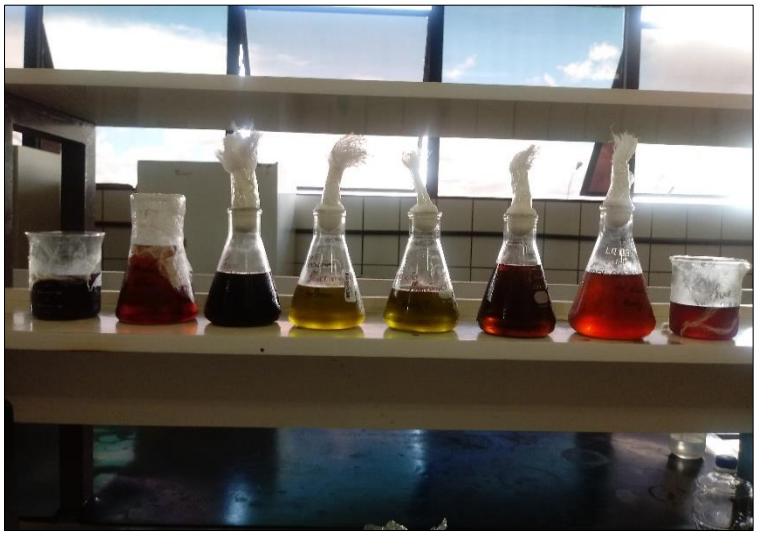

Figura 7. Amostras obtidas na etapa de fracionamento. Da esquerda para direita: 1º Fração residual das folhas, 2º Fração de AcOEt das folhas 3º Fração diclorometano das folhas 4º Fração hexânica das folhas 5 º Fração hexânica dos rizomas, 6º Fração de diclorometano dos rizomas 7º Fração de AcOEt dos rizomas 8º Fração residual dos rizomas.

4.2. Ensaio antibacteriano

Por apresentar características conhecidas, de fácil cultivo e de baixa patogenicidade quando usada de forma segura, a bactéria *Escherichia coli,* foi escolhida para ser inoculada juntamente com os extratos e frações da planta. Pela recomendação da ATCC, a bactéria foi mantida em banho maria, em torno de 37 º C, que é a temperatura ideal para sua proliferação.

Tanto o meio de cultura mínimo e as concentrações foram escolhidas com base nos resultados eficazes de trabalhos publicados. De acordo com CAMPOS (2008), o pH do meio mínimo deve ser ajustado para 7,2, pois corre o risco de

interferir no crescimento da bactéria; além disse é estudado o fato do meio mínimo apresenta uma resposta de crescimento microbiano lento, o que justifica o fato da *Escherichia coli* ter apresentado pico maior cerca de 24 horas após a inoculação.

4.3. Sistema FIA

O monitoramento do crescimento bacteriano utilizando sistema de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica é baseada na turbidez do meio. Esta técnica estima de maneira indireta à concentração das células, monitorando a dispersão da luz, assim, quanto maior a concentração de bactérias no meio, maior a quantidade de radiação eletromagnética (luz) desviada.

4.4. Testes de toxicidade

4.4.1. Ensaio com o Extrato Bruto das Folhas (EBEF) e dos rizomas (EBER)

No gráfico da Figura 8, pode-se observar que nas primeiras horas houve um crescimento lento na solução de referência em comparação com as soluções das amostras do EBEF, acredita-se que seja em função de uma possível adaptação das bactérias em relação ao meio de cultura, sendo que os compostos químicos do extrato bruto não interferiram no crescimento microbiano em ambas concentrações. Já nos gráficos da Figura 9 dos rizomas, a solução do EBER, quando comparado com a referência, acompanhou o crescimento durante a primeira hora, porém a concentração de 48 mgL^{-1}, inibiu o microrganismo a partir das 2 horas.

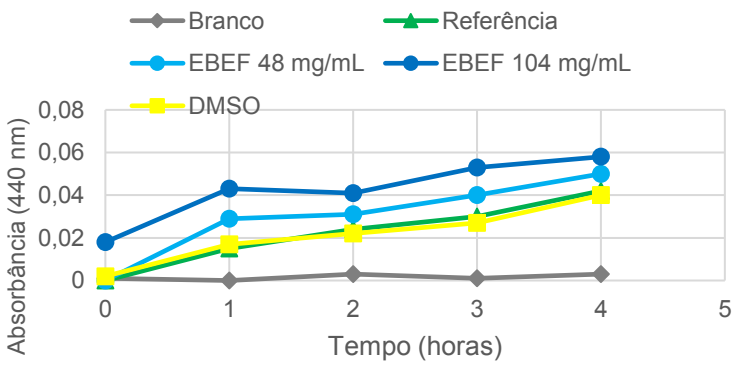

Figura 8. Teste antibacteriano espectrofotométrico com o EBEF das folhas.

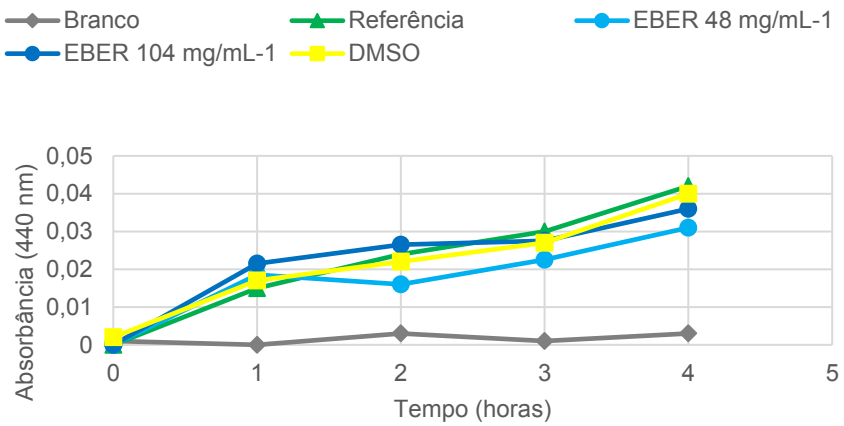

Figura 9. Teste antibacteriano espectrofotométrico com o EBEF dos rizomas.

4.4.2. Ensaio antibacteriano com as frações hexânica e diclorometano dos rizomas

As frações das folhas não inibiram a proliferação do microrganismo, conforme representado na Figura 10, a fração hexânica acompanhou o crescimento da referência, já a fração de diclorometano, apresentou maior absorbância, pode ter tido a interferência da coloração ser maior, pelos resquícios de clorofila. Outro fator provável é a presença de nutrientes da planta para a bactéria.

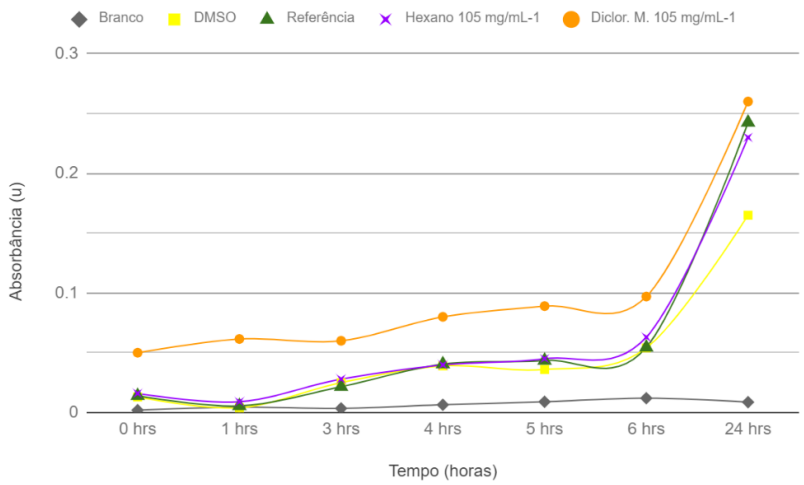

Figura 10. Teste antibacteriano espectrofotométrico com as frações hexânica e de diclorometano das folhas.

Na Figura 11, as frações dos rizomas apresentaram atividade semelhantes até as 6 horas após a inoculação, entre 6 e 24 horas, houve um leve decréscimo na absorbância, porém não se pode confirmar se houve a inibição.

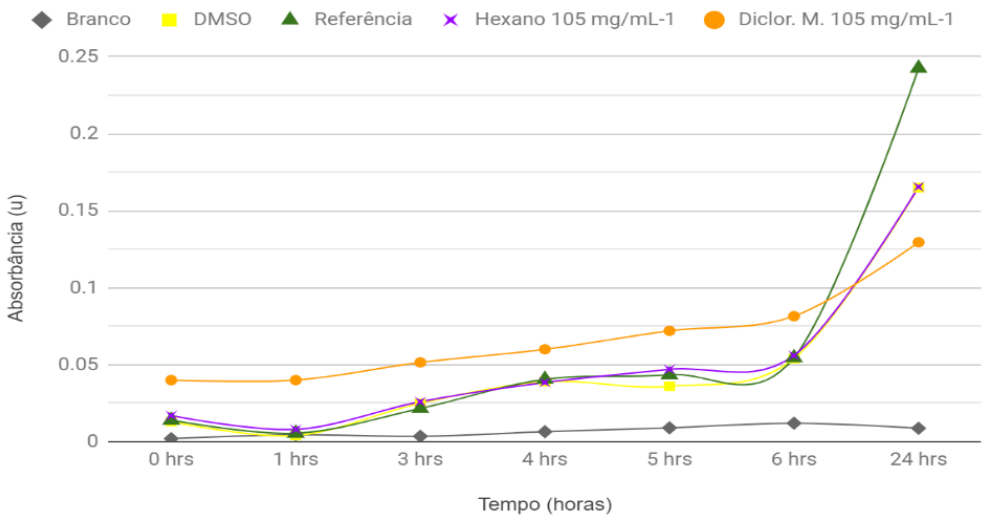

Figura 11. Teste biológico espectrofotométrico comas frações hexânica e de diclorometano dos rizomas.

4.4.3. Ensaio antibacteriano com a fração de acetato de etila das folhas e rizomas

A fração de acetato de etila dos rizomas foi a que mais apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 144 mg/mL^{-1}. Percebe-se, na Figura 12, que a partir das 5 horas, a bactéria começa a crescer (Fase log), cerca de 18 horas inicia-se o declínio, indicando que a *Escherichia coli* está desativando. Levanta-se a hipótese novamente, que as folhas fornecem nutrientes para as bactérias pelo fato de nas 24 horas ainda está proliferando.

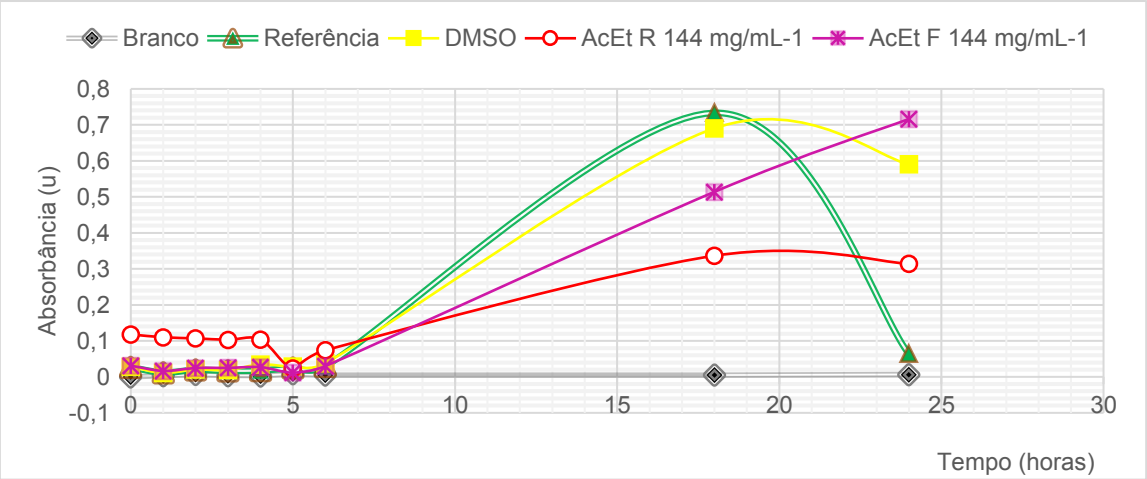

Figura 12. Teste antibacteriano espectrofotométrico com as frações de acetato de etila das folhas (AcOEt F) e dos rizomas (AcOEt R).

5. Considerações finais

No início deste trabalho de pesquisa, evidenciou-se a necessidade do estudo de novos fármacos com potencial atividade antimicrobiana, devido ao aumento da resistência bacteriana aos medicamentos de amplo espectro. Desta forma, partiu-se do fato de que a *Cyperus rotundus*, possui grande capacidade alelopática e diversas atividades farmacológicas, como antioxidante e principalmente antibacteriana. Assim, optou-se por analisá-la frente a *Escherichia coli* utilizando o sistema de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica.

O sistema de análise por injeção em fluxo mostrou-se uma alternativa prática e eficaz para avaliação antibacteriana, oferecendo dados qualitativos e quantitativos de forma simples, rápida, menos onerosa e eficaz. Tanto, o extrato bruto e as frações dos rizomas da *Cyperus rotundus* apresentou-se potencial em atividade antimicrobiana contra a *E.coli*, sendo que, a fração de acetato de etila na concentração de 144 mg/mL^{-1} inibiu mais a bactéria. Quanto as folhas, quando comparado com os rizomas não apresentou atividade antibacteriana, o que levanta a hipótese de haver, nutrientes que proporcionam a proliferação da bactéria.

Por conseguinte, historicamente a planta analisada tem um vasto potencial farmacológico, que merece ser alvo de novas pesquisas científicas, seja para a aplicação como matéria-prima no desenvolvimento de fitoterápicos,

ou no auxílio na síntese de fármacos. Portanto, a pesquisa deve ser continuada na busca de elucidação de compostos químicos, e na determinação de proteínas e vitaminas.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte dos colaboradores do Centro de Pesquisa e Educação Científica (CEPEC), aos Cursos de Química Industrial e Farmácia, ao Instituto Acadêmico de Ciências Tecnológicas (IACT) da Universidade Estadual de Goiás (UEG), e o apoio financeiro da Coordenadoria Central de Bolsas (CCB) na modalidade de Bolsas de Iniciação Científica (BIC/UEG).

7. Referências bibliográficas

ABO-ALTEMEN, Russell A.; AL-SHAMMARI, Ahmed Majeed; SHAWKAT, Muayed S. GC-MS. Analysis and Chemical Composition identification of *Cyperus rotundus* L. from Iraq. **Energy Procedia**, v. 157, p. 1462-1474, 2019.

AL-SNAFI, Ali Esmail. A review on *Cyperus rotundus:* A potential medicinal plant. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 6, n. 7, p. 32-48, 2016.

ARANTES, Maria do Carmo Batista, et al. Estudo farmacognóstico do *Cyperus rotundus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 17-20, 2005.

AZANIA, C. A. M. *et al.* Desenvolvimento da tiririca *(Cyperus rotundus)* influenciado pela presença e ausência de palha de cana-de-açúcar e herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 24, n. 1, p. 29- 35, 2006.

BARBOSA, Flávia Silva, *et al*. Utilização de extratos de tiririca no controle de *Diabrotica speciosa*. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v.2, n.2, p.764-767, 2007.

Reis, M.F. Giné, E.A.M. Kronka, A análise química por injeção em fluxo contínuo, Química Nova, v. 12, n. 1, p. 82, 1989.

CAMPOS, Natalia Martins. Avaliação da atividade antibacteriana de *Cayaponia Espelina* (Cucurbitaceae), utilizando-se um sistema de análise por injeção em fluxo, 2008.

CHAPINOTTO D.M,*et al*. Cross-resistance of rice flatsedge to als-inhibiting herbicides. **PlantaDaninha**. 2017;35:1-12.

DOS SANTOS, Wallans Torres Pio,*et al*. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações. **Quimica nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.

FARAH, Carolina Rittes Turato,*et al*. Teste de toxicidade aguda: monitoração da respiração da bactéria *Klebsiella oxytoca* usando um sistema FIA/Condutométrico. 2001.

FERREIRA, JordanaCatrine Corrêa. Avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de Cyperus. Dissertação. Universidade Federal Do Oeste Do Pará. Pró-reitora De Pesquisa, Pós-Graduação E Inovação Tecnológica Programa De Pós-Graduação Em Biociências, 2018.

GOETGHEBEUR, Paul. Cyperaceae. In: **Flowering Plants· Monocotyledons**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 141-190, 1998

JONES, Michael B.; KANSIIME, Frank; SAUNDERS, Matthew J. The potential use of papyrus (*Cyperus papyrus* L.) wetlands as a source of biomass energy for sub-Saharan Africa. **GCB Bioenergy**, v. 10, n. 1, p. 4-11, 2018.

KAMALA, Arunagiri; MIDDHA, Sushil Kumar; KARIGAR, Chandrakant S. Plants in traditional medicine with special reference to *Cyperus rotundus* L.: a review.**3 Biotech**, v. 8, n. 7, p. 309, 2018.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry LT. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123, 2004.

LIMA NETO, G. A *et al*. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med**., Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069 1077, 2015.

MOREIRA, Bruna CS *et al*. Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo utilizando materiais alternativos de baixo custo para fins didáticos.**QuímicaNova**, v. 37, n. 9, p. 1566-1572., 2014.

ROSA, Joice Lara Rosa Lara,*et al*. Características da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, n. 1, p. 66-78, 2016.

SANTOS, Ana Lúcia Mendes dos. Estudo químico e biológico de *Cyperus rotundus l.* aclimatada no Amazonas. 157 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SANTOS, A. C. V.; MASINI, J. C.A análise por injeção sequencial (sia): vinte anos em uma perspectiva brasileira. **Quim. Nova***,* v. 33, 9, p. 1949, 2010.

SARNO, Ana Rita Ribeiro *et al*. Atividade Hormonal do Extrato de Tiririca na Rizogênese De Ora Pro Nobis. In: **XI Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas, 2014 Poços De Caldas (MG).**

SILVEIRA, H.R.O. *et al*. Alelopatia e Homeopatia no Manejo da Tiririca (*Cyperus Rotundus*). **Planta Daninha, Viçosa-Mg,** v. 28, n. 3, p. 499-506, 2010**.**

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. *et al*. (Org.) **Farmacognosia: da produto natural ao medicamento**. 7 ed. Porto Alegre: Artemed, 2017.

SINGH, N. *et al*. Phyto-pharmacotherapeutics of *Cyperus rotundus Linn*. (Motha): an overview. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v.3, p. 467-476, 2012.

SIVAPALAN, Sri Ranjani. Medicinal uses and Pharmacological activities of *Cyperus rotundus Linn*–A Review.**International Journal of Scientific and Research Publications**, v.3, n.5, p. 711-716, 2013.

TOLEDO MA, *et al.* Utilization of a continuous flow system to evaluate the parameters of the baru pulp fermentation process for the production of alcoholic beverage. **International Journal of Development *Research*,**v. 8, n. 1, p. 18534 – 539, 2018.

TOLEDO, Mônica A, *et al*. "Reuse of sanitizing solution in tomato hygienization (*Lycopersiconesculentum mill*) in industrial kitchens", **International Journal of Development Research**, v. 9, n. 5, p. 27423-27427, 2019.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia-12ª Edição**.Artmed Editora, 2016.

ULGUIM, A.R. *et al*. Resistance Mapping of the Genus *Cyperus* in Rio Grande do Sul and Selection Pressure Analysis. **Planta daninha**, Viçosa, v. 37, p.1-8, 2019.

VIZZOTO, Marcia *et al*. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas (RS): 2010.

Autores

Bianca de Souza Campos, Geovanna Kelly Chagas, Maria Karollyne Ferreira de Oliveira, Júlio Cezar de Jesus Silva, Viviane Gomes Bonifacio, Giuliana Muniz Vila Verde, Jonas Alves Vieira*

Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Central – SEDE-CET Anápolis. Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio - Caixa Postal: 459. CEP: 75.132-903, Anápolis-GO, Brasil. E-mail:jonas@ueg.br.

* Autor para correspondência: jonas@ueg.br.

CAPÍTULO 5

Efeito do uso de fertilizante organomineral e da inoculação de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento inicial de plantas jovens de *Eucalyptus grandis*

Adriana Maria Griebeler, Breno Magno Silva dos Santos, Kellin Vanessa Andriguetto, Janaine Giombelli Jachi, Gabriel Coelho Waimer, Clóvis Orlando Da Ros, Felipe Turchetto

https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-08-4.c5

Resumo

O uso combinado de fertilizantes organominerais à inoculação com *Trichoderma* spp. pode aumentar o crescimento de espécies arbóreas de interesse econômico e ambiental, contribuindo para redução da necessidade de aplicação de fertilizantes. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência da aplicação de fertilizante organomineral associado à inoculação com *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento inicial de plantas jovens de um clone de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. A pesquisa foi realizada no viveiro florestal da Universidade Federal de Santa Maria Campus Frederico Westphalen. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 considerando a adubação (fertilização organomineral e ausência de adubação - testemunha) e a inoculação das mudas (presença ou ausência da inoculação com *T. harzianum*). As mudas foram transplantadas para vasos de 11 litros, preenchidos com solo acrescido da respectiva adubação de base e conduzidas em casa de vegetação. A altura (H), diâmetro do coleto (DC), alocação de massa seca radicular (MSR), do caule e ramos (MSC), das folhas (MSPA) e total (MST) das plantas foram determinadas aos 180 dias após o transplante. Os dados foram submetidos à análise dos pressupostos de normalidade e homogeneidade, seguido de análise de variância e comparação de médias pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$) no *software* RStudio. Constatou-se efeito isolado dos fatores de estudo para todos os atributos avaliados, exceto para o DC, o qual foi influenciado apenas pela utilização de fertilizante organomineral. A inoculação com *T. harzianum* ou a adubação com fertilizante organomineral proporcionaram maior crescimento e alocação de massa seca das plantas.

Palavras-chave: Fungos benéficos, insumos ecológicos, mudas florestais, silvicultura.

Rafael Fernández Da Silva (Org.) © 2022 Mérida Publishers CC-BY 4.0

1. Introdução

No Brasil, os plantios florestais com fins industriais ocupam uma área de 9,55 milhões de hectares, das quais 7,45 milhões de hectares são cultivadas com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia (*IBÁ, 2021). Os plantios são voltados à produção de matéria prima para diversos usos, incluindo papel e celulose, carvão vegetal, painéis e construção civil. Além das funções produtivas, o setor desempenha papel fundamental no cenário socioeconômico, com geração de emprego e renda e na prestação de serviços ambientais à humanidade (LONGUE JÚNIOR; COLODETTE, 2013; IBÁ, 2021).

Clones e híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e *Eucalyptus urophylla*, tem sido os mais cultivados no país (KONZEN *et al*., 2017), com vistas à obtenção de biomassa para produção de celulose, devido sua plasticidade, rápido crescimento e produtividade. Paralelamente, o avanço das pesquisas com genótipos de interesse para produção madeireira, tem permitido o desenvolvimento de novos materiais genéticos superiores. Um exemplo é o clone GPC 23 (*E. grandis*), criado para atender a demanda de madeira serrada, onde características para o uso sólido da madeira foram prioritárias na seleção (AFUBRA, 2022). Desde 2010, plantios homogêneos e consórcios (sistemas agrosilvipastoris) com esse material têm sido realizados na região Sul do Brasil.

Na silvicultura, a implantação de povoamentos florestais de qualidade e altamente produtivos, demandam do fornecimento adequado de fertilizantes. A fonte de nutrientes utilizada nas adubações de plantio consiste majoritariamente em fertilizantes minerais. Contudo, visto que a agricultura brasileira, importa 83% dos fertilizantes que utiliza (AMA, 2019), o custo com a manutenção da fertilidade dos solos tem se mostrado crescente nos últimos anos, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias capazes de reduzir a dependência de fontes de nutrientes de outros países.

Diante desse contexto, a adubação orgânica apresenta-se como uma alternativa promissora, para aumento da produtividade das florestas associada ao baixo custo (PELISSARI *et al*., 2009). Entre os diferentes tipos de adubações orgânicas, a produção de fertilizantes organominerais, como alternativa para o aproveitamento dos resíduos de suínos e aves, tem aumentado no Brasil, mediante o emprego de técnicas de compostagem e enriquecimento com

fertilizantes minerais (BENITES *et al*., 2013). De acordo com Barros *et al.* (2021), essas técnicas de produção e a sua mineralização são importantes e garantem o aumento da concentração dos nutrientes, além de torná-los prontamente disponíveis para as plantas. Estudos tem demonstrado que a incorporação da fração sólida das águas residuária de suinocultura ao solo pode contribuir para melhoria da sua qualidade química, física e biológica, repercutindo no crescimento e qualidade de espécies florestais (BARROS *et al*., 2021; MAGALHÃES *et al*., 2021; STUMM, 2020).

Paralelamente, o uso de microrganismos benéficos, como *Trichoderma* spp., surge como uma das inovações tecnológicas que visam contribuir à proteção, melhoria da qualidade e promoção de crescimento de plantas florestais (STEFFEN *et al*., 2019), tanto no viveiro (CHAGAS JÚNIOR *et al*., 2021; AZEVEDO *et al*., 2017), como no campo (GRIEBELER *et al*., 2021, SOLDAN *et al*., 2018). Dentre as espécies, isolados de *Tri*ch*oderma harzianum* tem se destacado na promoção de crescimento vegetal, devido sua capacidade de atuar na solubilização de micro e macro nutrientes como P, Ca, Mn, Zn, Cu e Fe, no combate a patógenos e na síntese de fitohormônios como o ácido Idolacético e colonização rizosférica (SAITO *et al*., 2009; LI *et al*., 2015).

Outra vantagem da utilização de bioestimulantes a base de *Trichoderma* spp. é que estes são capazes de se estabelecer, colonizar e reproduzir no solo (SUASSUNA *et al*., 2019), podendo, portanto, contribuir para redução dos custos com a aquisição de insumos. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo identificar a influência da aplicação de fertilizante organomineral a base de dejeto suíno associado à inoculação com *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento inicial de plantas jovens de um clone de *E. grandis*.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

O estudo foi realizado em casa de vegetação no viveiro florestal do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *Campus* Frederico Westphalen, estado do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil (27°23'47.94"S e 53°25'40.92"O), no período de janeiro a julho de 2021. O clima local, segundo a classificação de Köppen, é Subtropical do tipo Cfa, com quatro estações bem definidas (ALVARES *et al*., 2013) e a altitude é de 480

metros. As temperaturas mínimas e máximas durante o período de condução do experimento variaram de 4,2 ºC a 23,2 ºC e 16,6 ºC a 33,4 ºC, respectivamente.

As mudas de *E. grandis* (clone GPC 23) utilizadas na condução do experimento possuíam cerca de 120 dias, apresentavam altura e diâmetro médio de 39,8 cm e 3,17 mm, respetivamente e foram produzidas no Viveiro Agroflorestal Afubra, localizado no interior do município de Rio Pardo, RS.

O solo utilizado no cultivo das plantas foi um Argissolo Vermelho (Embrapa 2013), coletado no município de Frederico Westphalen, na camada de 0,0-0,20 m de profundidade, cuja análise química indicou pH=5,3, P (Mehlich)= 18,4 mg dm^{-3}, M.O=0,8 %, K=36,0 mg dm^{-3} SB(%)=16,4, H+Al= 8,9 (Cmolc.dm^{-3} solo), Ca=1,3 (Cmolc.dm^{-3} solo), Mg=0,9 (Cmolc.dm^{-3} solo) e CTC pH7=13,2 (Cmolc.dm^{-3} solo). Após a coleta, o solo foi seco ao ar e passado em peneira com malha de 2 mm, para posterior preenchimento dos vasos.

2.2. Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 considerando a inoculação das mudas (presença ou ausência da inoculação com *T. harzianum*) e a adubação de base (fertilização organomineral e ausência de adubação - testemunha). A unidade experimental consistiu em vasos com 11 litros de capacidade, sendo utilizadas seis repetições por tratamento.

O inóculo de *Trichoderma* spp. utilizado consistiu em um produto comercial formulado à base de *Trichoderma harzianum*, cuja concentração apresentada foi de 1 x 10^9 UFC.ml^{-1}. Conforme indicações do fabricante, esse produto pode ser utilizado para controle de fungos edáficos e estimula o crescimento das plantas, podendo ser aplicado no tratamento de sementes ou no sulco de plantio. A solução concentrada foi previamente diluída em 1000 mL de água destilada (proporção 1:1 v/v), resultando na concentração final de esporos de 5 x 10^8 UFC.ml^{-1}. A aplicação do tratamento com inoculação ocorreu de forma fracionada, sendo aplicados 6 ml da solução no momento do plantio das mudas nos vasos, adicionando-se no entorno do torrão das mudas, e complementada com mais 6 ml, 15 dias depois do plantio, conforme metodologia proposta por Griebeler *et al*. (2021).

O fertilizante organomineral utilizado consistiu de produto obtido a partir da mistura de fertilizante mineral, composto por ureia, superfosfato triplo e cloreto de potássio, com o fertilizante orgânico a base de dejeto suíno. O fertilizante orgânico foi obtido por meio de um sistema de tratamento de águas residuárias da suinocultura, instalado na UFSM Campus de Frederico Westphalen, sendo a fração sólida separada por meio de decantação, peneirada e submetida à granulação. A mistura do fertilizante e do solo foi realizada manualmente.

Para o cultivo das plantas, inicialmente adicionou-se uma fina camada de brita ao fundo de vasos de polipropileno com capacidade de 11 litros, para facilitar a drenagem e em seguida, realizou-se o preenchimento dos mesmos com solo (com ou sem fertilização de base). Posteriormente, os vasos foram levados para casa de vegetação onde foram irrigados até 100% da capacidade de campo. Na sequência, realizou-se o plantio e inoculação das mudas. Durante a condução da pesquisa, a irrigação foi realizada diariamente de forma automatizada, por meio de microaspersores, sendo fornecida uma lâmina de 4 mm dia $^{-1}$ de água.

2.3. Avaliação dos atributos morfológicos

Aos 180 dias após o transplante, mensurou-se a altura (H), e diâmetro do coleto (DC) das plantas, com paquímetro digital (precisão de 0,01 mm) e régua milimetrada, respectivamente. Na sequência, a parte aérea das plantas foi cortada ao nível do solo e fracionada em folhas e caule. As raízes foram cuidadosamente separadas do solo, de forma manual, e lavadas em água corrente sobre peneiras. A parte aérea (folhas e caule) e as raízes foram dispostas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 65ºC até peso constante. Posteriormente, realizou-se a pesagem das amostras em balança analítica para determinação da alocação de massa seca de cada fração.

2.4. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram testados quanto a normalidade dos resíduos e homogeneidade da variância pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de acordo com o modelo: $Y_{ijk} = m + a_i + d_j + (ad)_{ij} + \delta_{ijk}$, onde: Y_{ijk} é o valor observado referente a cada unidade experimental; m representa a média geral;

a_i é o efeito fixo da inoculação com *T. harzianum*; d_j é o efeito fixo da fertilização de base; $(ad)_{ij}$ é o efeito da interação entre os fatores principais e; e δ_{ijk} é o efeito do erro aleatório. Quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste t de Student (p≤0,05). Para as análises, utilizou-se os pacotes "ExpDes.pt" (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021) e Metan (OLIVOTO, 2021) do *software* RStudio (R CORE TEAM, 2018).

3. Resultados e Discussão

A partir da análise de variância não verificou-se efeito significativo da interação entre os fatores testados (p>0,05). Quando analisado o efeito do uso de fertilizante organomineral a base de dejeto suíno (FOM) verificou-se efeito significativo para todas as variáveis analisadas (p<0,05). A adição de FOM no cultivo de *Eucalyptus grandis* garantiu as maiores médias de incremento em altura e diâmetro do coleto, bem como maior alocação de biomassa (Figura 1). Cordeiro *et al*. (2018), avaliando a aplicação de doses de dejeto suíno no crescimento de mudas de *Luehea* Mart & Zucc, observaram que a aplicação contribuiu para o crescimento das mudas.

Nesse contexto, Da Ros *et al*. (2018) indicaram o composto orgânico proveniente do tratamento da água residuária de suinocultura, obtido através de compostagem mecanizada para produção de mudas de *Eucalyptus* spp., de *Toona ciliata* var. a*ustralis* (cedro-australiano) e de *Khaya ivorensis* A. Chev. (mogno-africano). A resposta positiva das plantas de *Eucalyptus grandis* cultivadas em solo acrescido de FOM a base de dejeto suíno, pode ser explicada pelas suas propriedades, como incremento de matéria orgânica, associada ao alto teor de nutrientes que é disponibilizado às plantas, principalmente de N e P.

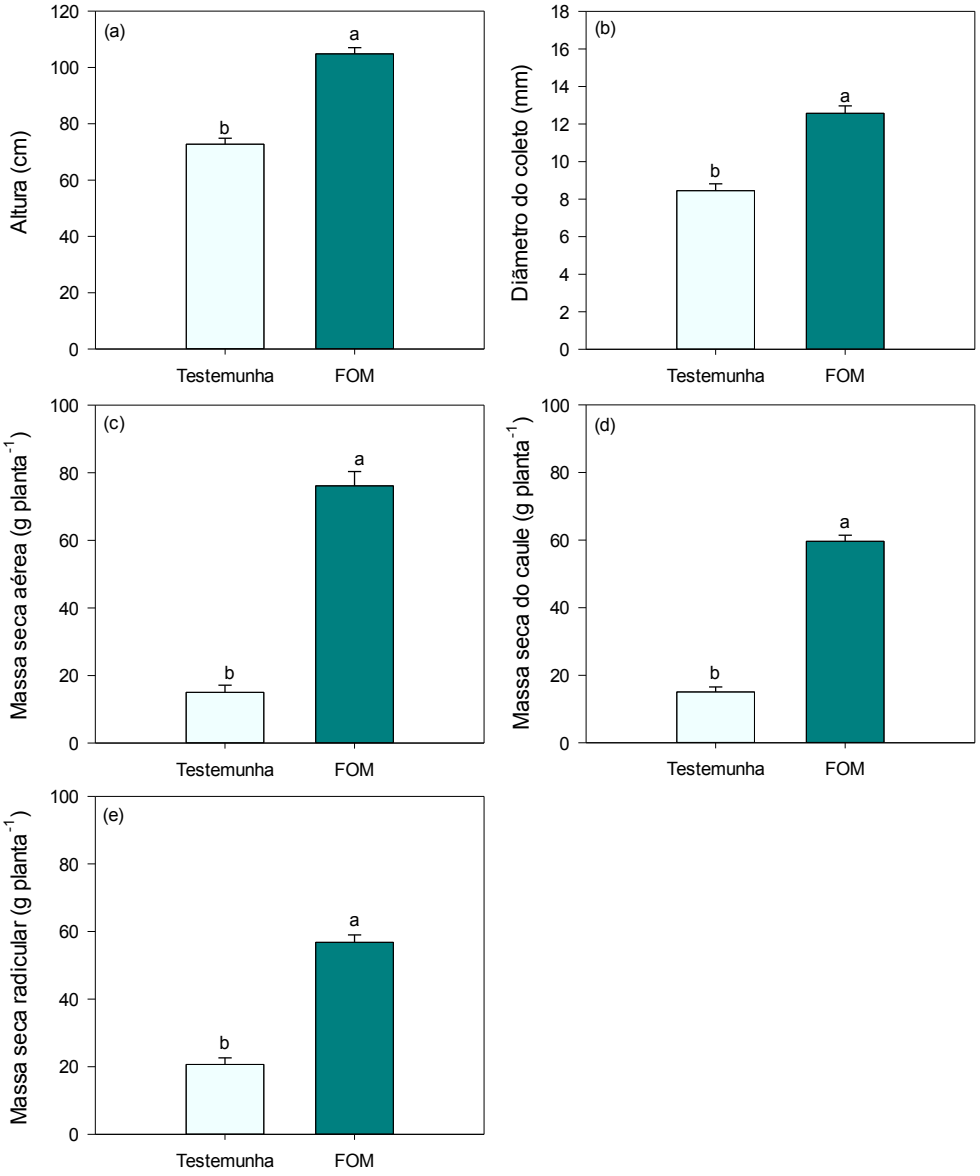

Figura 1. Altura (a), diâmetro do colo (b), massa seca aérea (c), massa seca do caule (d) e massa seca radicular (e) de plantas jovens de *E. grandis* submetidas a adubação com fertilizante organomineral, cultivadas por 180 dias. *Médias seguidas de mesma letra não representam diferença significativa de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$). Os valores são apresentados como média ± erro padrão. FOM: fertilizante organomineral.

No que tange ao efeito da inoculação das plantas de *E. grandis* com *T. harzianum* contatou-se efeito significativo para as variáveis altura (p=0,0009), massa seca aérea (p=0,0103), massa seca do caule (p=0,0492) e massa seca de raízes (p=0,0015) (Figura 2).

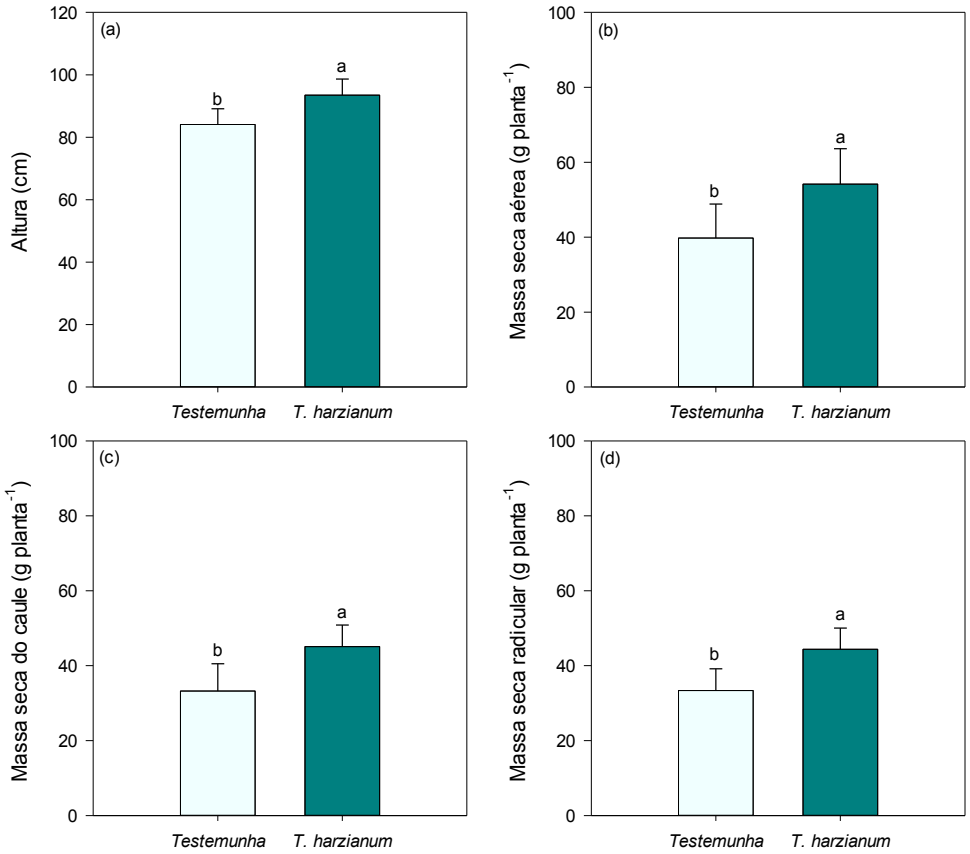

Figura 2. Altura (a), massa seca aérea (b), massa seca do caule (c) e massa seca radicular de plantas jovens de *E. grandis* submetidas a inoculação com *T. harzianum*, cultivadas por 180 dias. *Médias seguidas de mesma letra não representam diferença significativa de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$). Os valores são apresentados como média ± erro padrão.

A inoculação das plantas de *E. grandis* com *T. harzianum* possibilitou aumento de 10%, 25%, 8% e 20% para o crescimento em altura e alocação de biomassa foliar, do caule e radicular, respectivamente. Machado et al. (2015) também verificaram o potencial de isolados de *T. harzianum*, inoculados via pó de arroz colonizado incorporado ao substrato, como promotores de crescimento de mudas de *Gochnatia polymorpha* (cambará). Chagas *et al*. (2021) também obtiveram efeito positivo da inoculação com *Trichoderma* no crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus brassiana*.

Os resultados benéficos da inoculação de espécies vegetais com *Trichoderma* spp. estão associados a multiplicação celular vegetal por meio da produção de ácido indol-3-acético (CHAGAS *et al*., 2017; HOYOS-CARVAJAL *et al*., 2009) e a solubilização de nutrientes na rizosfera, que contribui com o

aumento da disponibilidade de nutrientes às plantas (JESUS *et al*., 2011; SOLDAN *et al*., 2018). Além disso, a colonização da raiz, por *Trichoderma*, frequentemente aumenta o desenvolvimento radicular, a resistência a estresses abióticos e maximiza o uso de nutrientes (RUBIO *et al*., 2014) e a eficiência fotossintética (VARGAS *et al*., 2009).

Os resultados obtidos demonstram que os insumos ecológicos testados, possuem elevado potencial de utilização no cultivo de *Eucalyptus grandis* e podem ser grandes aliados dos silvicultores com vistas à melhoria do vigor e crescimento das plantas, associada à redução dos custos com a aquisição de fertilizantes minerais, sobretudo pela elevada disponibilidade de esterco suíno na região Sul do Brasil.

4. Conclusão

O uso da fração sólida da água residuária da suinocultura na formulação de fertilizante organomineral permite maiores taxas de crescimento de plantas de *Eucalyptus grandis*, sendo indicado o uso no cultivo de *E. grandis*. A inoculação com *Trichoderma harzianum* é benéfica às plantas de *Eucalyptus grandis*, promovendo maior crescimento e alocação de biomassa.

5. Referências

AFUBRA. Associação de Fumicultores do Brasil. *Eucalyptus grandis* - Cultivar: Planflora GPC 23. Disponível em: <https://afubra.com.br/viveiro-muda/134/eucalyptus-grandis-cultivar-planflora-gpc-23.html>. Acesso em 12 de maio de 2022.

ALVARES, A. Claiton. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Germany, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

AMA. Associação dos Misturadores de Adubo do Brasil. **Dados Fertilizantes e cenários globais**. 2019.

AZEVEDO, B. Gileno *et al*. Efeito de *Trichoderma* spp. no crescimento de mudas clonais de *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, V. 45, p. 9, 2017. https://dx.doi.org/10.18671/scifor.v45n114.10

BARROS, Sinara *et al*. Crescimento inicial de *Eucalyptus grandis* cultivado com fertilizante organomineral remineralizador e ectomicorriza. In: MOURA, H.A. Pedro; MONTEIRO, F.C. Vanessa (ed). **Ciências Agrárias, Indicadores e Sistemas de Produção Sustentáveis**. 3. Ed. Ponta Grossa: Editora Atena, 2021 p. 1-11.

BENITES, M. Vinícius. *et al*. Produção de fertilizante organomineral granulado a partir de dejetos de suínos e aves no Brasil. In: **Embrapa Solos-Artigo em anais de congresso (ALICE).** In: Worshop internacional y taller nacional valorización de residuos, oportunidad para la innovación, 2013, Pucón, Chile: CIDGRO, 2013.

CHAGAS, F.B. Lilian; CHAGAS, F. Aloisio; CASTRO, G. Henrique. Phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production by *Trichoderma* strains for biomass increase on basil and mint plants capacidade de solubilização de fosfato e síntese de aia por espécies de trichoderma e incremento na biomassa de planta. **Brazilian Journal of Agriculture**. V 92, p. 176–185, 2017. https://doi.org/10.37856/bja.v92i2.3221

CHAGAS JUNIOR, F. Aloisio *et al*. *Trichoderma* como promotor de crescimento de mudas de eucaliptos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity.** V. 9, p. 60-72, 2021. https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v9n1.chagasjunior.

CORDEIRO, Juliano *et al.* Growth of forest seedling submited to fertilization with swine wastewater. **Brazilian Journal of Development**. V. 4, n. 7, edição especial, p. 3862-3875, 2018.

DA RÓS, O. Clóvis *et al* Composto de águas residuárias de suinocultura na produção de mudas de espécies florestais. **Floresta**, v. 48, n. 1, p. 103-112. jan./marc. 2018. https://doi.org/10.5380/rf.v48 i1.53346.

FERREIRA, E.; CAVALCANTI, P.; NOGUEIRA, D. **ExpDes.pt: Experimental Designs pacakge (Portuguese).** R package version 1.1.2., 2021.

GRIEBELER, M. Adriana *et al*. Type of container and *Trichoderma* spp. inoculation enhance the performance of tree species in enrichment planting. **Ecological Engineering.** V. 169, 2021. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2021.106317

HOYOS-CARVAJAL, Liliana; ORDUZ, Sergio; BISSETT, John. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**. V. 51, p. 409–416, 2009. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018

IBÁ. INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório IBÁ 2021**. Disponível em: <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2022.

JESUS, P. Elisângela *et al*. Avaliação do potencial de *Trichoderma asperellum* como condicionador de substrato para a produção de mudas de café. **Cerrado Agrociências.** V. 7, p. 7–19, 2011.

KONZEN, R. Enéas *et al.* Genetic variation for growth variables of *Eucalyptus benthamii* Maiden & amp; Cambage and *E. smithii* R. T. baker provenances in southern brazil. **Cerne**, V. 23, p. 359–366, 2017. https://doi.org/10.1590/01047760201723032357

LI, Rui-Xia *et al*. Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. **PLOS ONE**, V. 10, p. 1-15, 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130081

LONGUE JÚNIOR, Dalton; COLODETTE, L. Jorge. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, V. 33, p. 429-438, 2013. https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.528

MAGALHÃES, B. Juliano *et al*. Fração sólida das águas residuárias de suinocultura para o crescimento inicial de *Eucalyptus grandis*. In: MOURA, H.A. Pedro; MONTEIRO, F.C. Vanessa (ed). **Ciências Agrárias, Indicadores e Sistemas de Produção Sustentáveis**. 3. Ed. Ponta Grossa: Editora Atena, 2021 p. 89-99.

OLIVOTO, Thiago. **Metan: Análise de ensaios em vários ambientes.** R package version 1.13, 2021.

PELISSARI, A.Z. Rodrigo *et al*. Lodo têxtil e água residuárias da suinocultura na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* (W, Hill ex Maiden). **Engenharia Agrícola**, V. 29, p. 288-300, 2009. https://doi.org/10.1590/S0100-69162009000200012

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**Vienna, AustriaR Foundation for Statistical Computing, , 2018.

RUBIO, B. Maria *et al*. Identifying beneficial qualities of Trichoderma parareesei for plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1864-1873, 2014. https://doi.org/10.1128/AEM.03375-13.

SAITO, R. Larissa *et al*. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, V. 2, 2009.

STUMM, Juliano. Fertilizantes organominerais remineralizadores do solo e micorrização na produção de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden**.** Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, 2020.

SUASSUNA, D. Nelson; SILVA, C. Juliano; BETTIOL Wagner. Uso do *Trichoderma* na cultura do algodão. In: MEYER, C. Mauricio; MAZARO, M. Sérgio; SILVA, C. Juliano (ed). ***Trichoderma*: Uso na Agricultura**. Brasília, DF: Embrapa. 2019. p. 361-379.

SOLDAN, Angelita *et al*. Development of Forestry Species Inoculated with *Trichoderma* spp . Fertilized with Rock Phosphate. **Floresta e Ambiente**. V. 25(4), 2018. https://doi.org/10.1590/2179-8087.064316.

STEFFEN, P.K. Gerusa *et al*. *Trichoderma asperelloides* promove crescimento inicial em mudas de *Corymbia citriodora.* **Enciclopédia Biosfera**, V. 16, p. 1699, 2019.

VARGAS, A. Walter; MANDAWE, C. John; KENERLEY, M. Charles. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. **Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 792-808, 2009. https://doi.org/10.1104/pp.109.141291.

Autores

Adriana Maria Griebeler[1], Breno Magno Silva dos Santos[1], Kellin Vanessa Andriguetto[1], Janaine Giombelli Jachi[1], Gabriel Coelho Waimer[1], Clóvis Orlando Da Ros[2], Felipe Turchetto[1]

1. Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - *Campus* Frederico Westphalen, Linha Sete de Setembro, BR 386 Km 40, CEP 98400-000, Frederico Westphalen-RS, Brasil.
2. Departamento de Ciências Agronômicas e Ambientais da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - *Campus* Frederico Westphalen, Linha Sete de Setembro, BR 386 Km 40, CEP 98400-000, Frederico Westphalen-RS, Brasil.

* Autor para correspondência: griebeleradriana@gmail.com

MÉRIDA
PUBLISHERS

www.meridapublishers.com