

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE PALMA DE  
ÓLEO (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) A PARTIR DE CULTIVOS  
EMBRIOGÊNICOS EM SUSPENSÃO**

**JOANE DOS SANTOS NEVES**

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

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE PALMA DE  
ÓLEO (*Elaeis oleífera* x *E. guineensis*) A PARTIR DE CULTIVOS  
EMBRIOGÊNICOS EM SUSPENSÃO**

**JOANE DOS SANTOS NEVES**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Inaê Mariê de Araújo Silva Cardoso**

Dissertação apresentada à  
Universidade de Brasília para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Florestais, área de  
concentração: Manejo florestal.

**BRASÍLIA - DF**

**MARÇO DE 2023**

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Distribuição geográfica de plantios comerciais de *Elaeis* spp. no território brasileiro. Fonte: Agropalma (2018)

.....15

**Figura 2.** Aspectos gerais da palmeira *Elaeis* spp. A. Indivíduo adulto no campo exibindo estipe ereto. B. Dendzeiro com cacho de frutos. C. Fruto inteiro e seccionado de dendzeiro. D. Biocombustível de dendzeiro. E. Produto alimentício (azeite) e cosmético de dendzeiro. Fontes: A, B = Jardim Botânico UTAD; C = MPOB/Nature; D = Vivian Chies. E: Google

.....17

**Figura 3.** Aspectos gerais sobre os agregados celulares de *Elaeis* spp. utilizados. A. Agregados celulares oriundos de explantes foliares em meio líquido sob agitação após 6 anos de cultivo. B-C. Agregados celulares em meio líquido em erlenmeyers. D-F. Agregados celulares após 7, 30 e 60 dias de cultivo em meio semissólido, respectivamente. G. Agregados celulares após 120 dias de cultivo em meio semissólido; notar diferenciação de embrião somático. H. Cluster de embriões somáticos em estágio similar ao torpedo, após 340 dias de cultivo em meio semissólido. Abreviações: ce, calo embriogênico; es, embrião somático; et, embrião somático torpedo. Barras: D, E = 1 mm e F-H = 2 mm

.....33

**Figura 4.** Caracterização morfológica das respostas da maturação de embriões somáticos de *Elaeis* spp. oriundos de diferentes tratamentos de maturação. A. Maturação do embrião somático após um mês de cultivo em meio suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. B. Escurecimento dos embriões somáticos ao longo do tempo durante a exposição ao PEG. C. Embriões somáticos esverdeados e com sinais de vitrificação cultivados em meio suplementado com Polietilenoglicol (PEG). D. Emissão de parte aérea. E. Embriões somáticos com sinais de vitrificação (seta) cultivados em meio suplementado com PEG após 90 dias em meio com PEG. F. Ocorrência de embriogênese secundária (seta). Barras: 1,25 cm

.....36

**Figura 5.** Germinação de *clusters* de embriões somáticos de *Elaeis* spp. após passagem por diferentes tratamentos de maturação, após três meses de germinação .....37

**Figura 6.** Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões somáticos de *Elaeis guineensis* submetidos a diferentes tratamentos de maturação. A. Cluster de embriões somáticos após 30 dias em meio de cultivo suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de Polietilenoglicol (PEG). B. Secção anatômica de embrião somático apresentado na letra A; notar presença de plúmula (seta), procâmbio e protoderme. C. Embrião somático com grãos de amido (detalhe lateral – seta) corados com Lugol. D. Embrião somático, após 30 dias em meio de cultivo suplementado com 45 g/L de sacarose, corado com Xylidine Ponceau. E. Detalhe do embrião somático apresentado na letra D (retângulo); notar reservas proteicas no interior de vacúolos. F. Células com reservas proteicas (setas). G. Embrião somático, após 30 dias em meio de cultivo suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de Polietilenoglicol (PEG), corado com Xylidine Ponceau. H. Detalhe do embrião somático apresentado na letra G (retângulo); notar abundância de reservas proteicas, corpos proteicos esféricos..... 41

**Figura 7.** Caracterização morfológica da germinação de embriões somáticos de *Elaeis* spp. oriundos de diferentes tratamentos de maturação. A, B. Regeneração de plantas. C. Plantas em cluster com 60 dias em meio de germinação e após 30 dias em meio de maturação suplementado com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. D, E. Plantas isoladas após 60 dias em meio de germinação e 60 dias em meio de maturação suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de PEG. F. Clusters com embriões somáticos vitrificados (seta) e com áreas escurecidas após 90 dias em meio de maturação suplementado com 45 g/L de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG. G. Plantas com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos oriundas do meio com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. G. Plantas aclimatizadas  
Barras: A-C = 1 cm e D-F = 2 cm

.....44

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Teores de proteínas totais ( $\mu\text{g}$  de proteína/ mg de matéria fresca) de embriões somáticos de palma de óleo (Genótipo B35-1733) oriundos de diferentes tratamentos de maturação.....39

**Tabela 2.** Número de embriões somáticos por *cluster* em palma de óleo (Genótipo B351733) com emissão de parte aérea e/ou raiz oriundos de diferentes tratamentos dematuração.....45

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>%</b>	Por cento
<b>½</b>	Metade
<b>Mm</b>	Micrômetro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µG</b>	Micrograma
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AG<sub>3</sub></b>	Ácido giberélico
<b>Atm</b>	Atmosfera
<b>Cm</b>	Centímetro
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro quadrado
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b><i>et al.</i></b>	E colaboradores
<b>g</b>	Gramas
<b>g.L<sup>-1</sup></b>	Gramas por Litro
<b>L</b>	Litro
<b>Mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MS</b>	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
<b>Picloram</b>	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico

## SUMÁRIO

### EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) A PARTIR DE CULTIVOS EMBRIOGÊNICOS EM SUSPENSÃO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Aspectos gerais da palma de óleo ( <i>Elaeis</i> spp.).....	15
3.2 Utilização da palma de óleo.....	18
3.3 Cultura de tecidos vegetais .....	19
3.3.1 Embriogênese somática .....	19
3.3.1.1 Maturação de embriões somáticos.....	22
3.3.2 Cultivos celulares em suspensão .....	24
3.3.3 Análises morfoanatômicas, histoquímicas e bioquímicas no desenvolvimento de embriões somáticos .....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Material vegetal .....	28
4.2 Diferenciação de embriões somáticos .....	28
4.3 Maturação de embriões somáticos.....	28
4.3.1 Análises bioquímicas - proteínas solúveis totais .....	29
4.4 Germinação de embriões somáticos .....	30
4.5 Aclimatização de plantas .....	30
4.6 Análises morfoanatômicas, histoquímicas e bioquímicas no desenvolvimento de embriões somáticos .....	31
5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	32

5.1 Diferenciação de embriões somáticos oriundos de agregados celulares cultivados em meio líquido.....	32
5.2 Maturação de embriões somáticos.....	35
5.2.1 Análises bioquímicas - proteínas solúveis totais, morfoanatômicas e histoquímicas.....	38
5.3 Germinação de embriões somáticos .....	43
5.3 Aclimatização de plantas .....	47
6 CONCLUSÕES .....	47
REFERÊNCIAS .....	48

# **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) A PARTIR DE CULTIVOS EMBRIOGÊNICOS EM SUSPENSÃO**

## **RESUMO**

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis* spp.) é a oleaginosa que possui a maior produtividade conhecida em óleo vegetal. Programas de incentivo à produção são demandas crescentes ao programa de melhoramento genético da cultura e produção de mudas de qualidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade embriogênica de agregados celulares de palma de óleo, cultivados em meio líquido, em diferenciar embriões somáticos (ESs), maturar e regenerar plantas. Para tanto, agregados celulares do híbrido interespecífico B35-1733, induzidos a partir de folhas imaturas de planta adulta e mantidos por seis anos em meio líquido, sob agitação, foram cultivados em meio de cultura semissólido de diferenciação. Uma vez diferenciados, a maturação foi realizada pela transferência dos ESs em estágio de desenvolvimento similar ao torpedo, dispostos em *clusters*, para meios de maturação, com diferentes composições de Polietilenoglicol (PEG) e sacarose, sendo avaliados quanto ao acúmulo de proteínas totais e análises histoquímicas. Por fim, os ESs foram transferidos para meio de regeneração, onde foram avaliados quanto à germinação. De maneira geral verificou-se que os cultivos embriogênicos em suspensão foram capazes de diferenciar ESs e que os tratamentos de maturação formados unicamente com sacarose proporcionaram os melhores resultados para a maturação dos ESs. As análises bioquímicas e histoquímicas confirmaram o aumento do acúmulo de proteínas solúveis totais nos ESs com o aumento das concentrações de PEG e sacarose no meio de cultivo. A germinação dos ESs em plantas ocorreu de maneira mais eficiente naqueles que foram maturados em meio suplementado com sacarose, enquanto os oriundos de tratamentos de maturação com PEG apresentaram sinais característicos de escurecimento e hiperhidricidade. Conclusivamente, o trabalho sugere um protocolo para que agregados celulares de palma de óleo, uma vez estabelecidos e mantidos em meio líquido, possam ser diferenciados em ESs e originarem plantas clonais.

**Palavras-chaves:** Arecaceae; competência embriogênica; embriões somáticos; sacarose; Polietilenoglicol; germinação.

# **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) A PARTIR DE CULTIVOS EMBRIOGÊNICOS EM SUSPENSÃO**

## **ABSTRACT**

Oil palms are the oilseed with the highest known productivity in vegetable oil. Production incentive programs are increasing the demand for quality seedlings. The objective of this work was to evaluate the embryogenic capacity of oil palm cell aggregates, cultivated in liquid medium, to differentiate somatic embryos (SEs), mature and regenerate plants. For this purpose, cell aggregates of the interspecific hybrid B35-1733, induced from immature leaves of an adult plant and kept for six years in liquid medium were cultivated in semi-solid differentiation culture medium. Once differentiated, the maturation was carried out by transferring ESs at a stage of development similar to the torpedo, arranged in clusters, to maturation media, with different compositions of Polyethylene glycol (PEG) and sucrose, being evaluated for the accumulation of total proteins and histochemical analysis. ESs were then transferred to regeneration medium and evaluated for germination. It was found that the embryogenic suspension cultures were able to differentiate the ESs and that the maturation treatments formed solely with sucrose provided the best results for the maturation. Biochemical and histochemical tests showed that the amount of total soluble proteins in the ESs increased with the increase in the concentrations of PEG and sucrose in the maturation culture medium. The germination of ESs in plants was more efficient in those that were matured in medium supplemented with sucrose, whereas those originating from maturation treatments with PEG showed characteristic signs of browning and hyperhydricity. In conclusion, the work suggests an efficient protocol so that oil palm cell aggregates, once established and maintained in a liquid medium, can be differentiated into ESs and originate clonal plants.

**Palavras-chaves:** Arecaceae; embryogenic competence; somatic embryos; sucrose; Polyethylene glycol; germination.

# **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) A PARTIR DE CULTIVOS EMBRIOGÊNICOS EM SUSPENSÃO**

## **1- INTRODUÇÃO**

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis* spp.) é uma espécie de palmeira que ocorre em regiões tropicais úmidas da África, Ásia e América (MUKHERJEE; SOVACOOOL, 2014). É uma planta perene da família Arecaceae. A partir dos seus frutos podem ser extraídos dois tipos diferentes de óleo: o óleo de palmiste e o óleo de palma, os quais apresentam expressiva importância econômica, sendo úteis tanto como fonte de alimento, como para a produção de cosméticos e de biocombustíveis (GLIMN-LACY; KAUFMAN, 2006; CUI *et al.*, 2020).

A palma de óleo é a espécie vegetal com maior produção de óleo no mundo, alcançando mais de 75 milhões de toneladas produzidas, especialmente em países do Sudeste Asiático, África Equatorial e América Tropical (CUI *et al.*, 2020; USDA, 2021). O óleo desta palmeira é o mais comercializado pelo mercado, tendo ampla utilização nos setores industrial e alimentício, fármaco e de cosméticos, além de ter grande potencial para produção de biocombustíveis (SANTANA *et al.*, 2013; USDA, 2021; TOW *et al.*, 2021).

Durante muitos anos, a palma de óleo foi plantada somente para atender a indústria alimentícia (WICKE *et al.*, 2011). Contudo, essa realidade está mudando. Entre todas as matérias-primas cotadas para a produção de biodiesel, é a que mais produz óleo por área plantada e apresenta ciclo de produção durante todo o ano, diferente do que ocorre com outras culturas oleaginosas (MONTEIRO; HOMMA, 2014; SOUZA *et al.*, 2022). Esses são os principais fatores atrativos, que impulsionam o mercado internacional, a investir na palma de óleo para a produção de biodiesel em nível mundial (FEDEPALMA, 2010). Neste contexto, enfatiza-se a alta demanda mundial por mudas, uma vez que a área plantada com palma de óleo geralmente precisa ser renovada a cada 25 anos, com uma rotatividade média de replantio de 4% ao ano (CORLEY; TINKER, 2016) e há uma estimativa da necessidade de 100 milhões de mudas a cada ano (CUI *et al.*, 2020). Rotineiramente, a produção de mudas em palma de óleo é feita a partir de sementes. Embora seja a técnica mais usualmente utilizada, a produção de mudas por sementes tem como inconvenientes a desuniformidade das mudas e, conseqüentemente, dos plantios em campo, em razão dos genitores serem plantas alógamas e apresentarem alta heterozigose, além de algumas variedades, especialmente aquelas formadas por híbridos

interespecíficos, apresentarem baixas taxas de germinação de sementes (LOW *et al.*, 2008; CORLEY; TINKER, 2016).

Como alternativas promissoras têm-se ferramentas biotecnológicas, como a clonagem de plantas em laboratório, que podem ser de grande interesse tanto para programas de melhoramento genético da cultura, como para o surgimento e disponibilização de novos materiais ao setor produtivo (LOW *et al.*, 2008; KONAN *et al.*, 2010; LUIS *et al.*, 2010). A micropropagação via embriogênese somática, consiste na melhor alternativa para a multiplicação clonal de plantas, em especial, de palmeiras que não perfilham como é o caso da palma de óleo. Essa técnica permite o desenvolvimento de estruturas similares a embriões zigóticos, mas a partir de tecidos somáticos, sem que haja a fusão de gametas, podendo proporcionar milhares de plantas idênticas à planta matriz (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; SOH *et al.*, 2011; LELJAK-LEVANIC *et al.*, 2015).

A embriogênese somática, de modo geral, baseia-se na exposição de células ou tecidos oriundos de diferentes órgãos vegetais às condições de cultivo controladas *in vitro*, incluindo concentrações de sais minerais, compostos orgânicos e reguladores de crescimento (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; JIMÉNEZ, 2005; ZAVATTIERI *et al.*, 2010; ELHITI; STASOLLA; WANG, 2013; FAISAL *et al.*, 2021). Sob esses estímulos, as células somáticas, ao adquirirem competência, seguem a rota embriogênica, regenerando embriões somáticos e plantas geneticamente idênticas à planta mãe fornecedora dos explantes iniciais.

De fato, a embriogênese somática se tornou uma das técnicas de propagação clonal mais promissora das últimas décadas, oferecendo como vantagens a possibilidade de multiplicação em massa de genótipos superiores, num espaço físico reduzido e garantindo a qualidade fitossanitária e genética do material propagado (OOI *et al.*, 2012; AL SHAMARI *et al.*, 2018). Assim, a embriogênese somática tem sido o principal e, para muitas espécies de palmeiras, o único método capaz de permitir a clonagem (PALANYANDY *et al.*, 2013; KONAN *et al.*, 2006; REE; GUERRA, 2015; SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2018).

O explante mais utilizado para a produção comercial via embriogênese somática de palma de óleo é o palmito (folhas aclorofiladas e ainda não expandidas) (OOI *et al.*, 2012), cuja obtenção pode ocasionar danos à planta mãe, além de ser trabalhosa e requerer um planejamento logístico para não comprometer a viabilidade do explante, a depender da distância entre o local de coleta e de inoculação do material. Esses aspectos levam a induções sazonais da embriogênese somática. No entanto, massas calogênicas embriogênicas, oriundas desse tipo de explante, podem ser multiplicadas e mantidas por longos períodos *in vitro*, além de manipuladas conforme a necessidade de regeneração, desde que um protocolo para tal seja bem definido (MONTEIRO *et*

*al.*, 2018).

No mundo, há milhões de plantas de diversas espécies sendo produzidas anualmente via embriogênese somática (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; LOYOLA-VARGAS *et al.*, 2016; AIDUN, 2018; EGERTSDOTTER *et al.*, 2019). Todavia, o entendimento dos mecanismos que regulam todas as etapas do processo ainda é limitado. Neste sentido, a realização de estudos anatômicos e bioquímicos durante a embriogênese somática é determinante, pois eles podem proporcionar uma grande quantidade de informação, incluindo aquelas associadas com a competência embriogênica, ou então, com a mobilização de reservas nas fases de diferenciação, maturação e germinação dos embriões somáticos, contribuindo dessa maneira, para a otimização dos protocolos (PESCADOR *et al.*, 2008).

De fato, muitos esforços têm sido feitos para aperfeiçoar a técnica de embriogênese somática em diversas espécies vegetais concentrando-se, mais recentemente, nas etapas de maturação e germinação dos embriões somáticos, consideradas etapas críticas do processo. A etapa de maturação é a mais crítica no desenvolvimento do embrião somático. Nela ocorre a expansão, diferenciação e acúmulo de substância de reserva do embrião, sendo determinante para a germinação e conversão bem-sucedida dos embriões somáticos (STASOLLA; YEUNG, 2003; MISHRA *et al.*, 2012). Para otimização da maturação dos embriões somáticos e, conseqüente, incremento da qualidade das plantas resultantes, diferentes trabalhos têm focado na manipulação de meios de cultura, quanto aos tipos e concentrações de reguladores de crescimento e agentes osmóticos, como açúcares e Polietilenoglicol (PEG) (AHMADI *et al.*, 2014; MEZIANI *et al.*, 2016; MASRI *et al.*, 2017).

A maturação do embrião envolve perda de água, levando à dessecação do embrião e o início da dormência (LINACERO *et al.*, 2001). A adição de agentes osmóticos, como o PEG, ao meio de cultura reduz a disponibilidade de água e incrementa o conteúdo de reservas nutricionais, simulando as condições do desenvolvimento do embrião (BOZHKOVA, 1998; SILVEIRA, 2004). De acordo com Svobodová *et al.* (1999), esse agente osmótico quando adicionado ao meio de maturação pode aumentar o número de embriões somáticos, porém pode proporcionar efeito negativo no crescimento e desenvolvimento posterior dos embriões somáticos.

Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a capacidade embriogênica de calos de palma de óleo, cultivados em meio de suspensão por seis anos, de diferenciar embriões somáticos (ES), maturar e regenerar plantas. O trabalho propôs também avaliar etapas do protocolo de embriogênese somática em meio líquido e otimizar a etapa de maturação de embriões somáticos, a partir da combinação ou não de sacarose e polietilenoglicol (PEG).

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar a capacidade embriogênica de agregados celulares de palma de óleo, cultivados em meio líquido, em diferenciar embriões somáticos (ESs), maturar e regenerar plantas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar etapas do protocolo de embriogênese somática em meio líquido de palma de óleo desenvolvidos até o momento, a partir de cultivos em suspensão mantidos em meio líquido;
- Otimizar a etapa de maturação dos embriões somáticos, oriundos dos agregados celulares do meio líquido, mediante o uso de sacarose, combinada ou não com Polietilenoglicol (PEG).
- Caracterizar o processo de diferenciação e monitorar o processo de maturação dos embriões somáticos, obtidos por meio de análises morfoanatômicas, histoquímicas e bioquímicas.

### 3- REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Aspectos gerais da palma de óleo (*Elaeis spp.*)

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis spp.*) é uma palmeira oleaginosa que tem ocorrência nos continentes Africano e Americano. (TREGGAR *et al.*, 2011). Ele pertence a classe Liliopsida (monocotiledônea), ordem Arecales, família Arecaceae (Palmae), subfamília Arcoideae e gênero *Elaeis* (TREGGAR *et al.*, 2011). Em termos de área plantada, a Amazônia brasileira destaca-se, juntamente com o Estado do Pará com maior produção, seguido pelo Estado da Bahia (Fig. 1), seja pelos resultados dos plantios em produção ou pela ampla disponibilidade de área apta ao cultivo da palma (AGROPALMA, 2018).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de plantios comerciais de *Elaeis spp.* no território brasileiro. Fonte: Agropalma (2018).

A palma de óleo exibe melhor desenvolvimento em regiões de clima tropical, com boa adaptação ao clima quente e úmido (CARVALHO *et al.*, 2001; SANTOS, 2010). O clima é o fator ambiental que mais influencia os processos produtivos, sendo a temperatura do ar em níveis moderados, com médias mensais variando entre 24 e 28°C, o elemento climático que mais favorece a produção da palma de óleo (BASTOS *et al.*, 2001; ZAE-DENDÊ, 2010).

*Elaeis* spp. é uma palmeira monocaule, podendo atingir de 25 a 30 metros de altura quando atinge a idade adulta (Fig. 2A, B). Na base do caule, a espécie parece uma coluna em forma de cone, que a partir do primeiro metro de altura, torna-se constante quanto ao diâmetro. Na parte superior, o dendezeiro possui uma coroa de folhas pinadas. Uma planta adulta possui entre 30 e 45 folhas funcionais e cada folha demora de 2 a 3 anos para se desenvolver, desde o início até o momento em que os folhetos se estendem no centro da copa da palmeira (DRANSFIELD; UHL, 1998; ADAM *et al.*, 2005).

Possuindo um formato oval, o cacho de fruto do dendezeiro mede mais de 50 centímetros de comprimento. Os frutos são compostos pelo epicarpo, a camada mais externa, pelo mesocarpo, a camada média, representando 92% do fruto, de onde se extrai o óleo de dendê, e pelo endocarpo, a camada interna, composta pela casca e a amêndoa, as quais contêm um óleo com características físico-químicas diferentes da do óleo de dendê, chamado de óleo de palmiste (SUMATHI *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2020; GUTBROAD *et al.*, 2021) (Fig. 2C). Os óleos oriundos dos frutos do dendezeiro têm sido utilizados como fonte de alimento, para produção de combustíveis, de produtos cosméticos, dentre outros usos (GLIMN-LACY; KAUFMAN, 2006; CUI *et al.*, 2022) (Fig. 2D, E).

Atualmente, os programas de melhoramento genético de palma de óleo, têm dado a atenção para a produção de variedades interespecíficas, com o principal objetivo de melhorar a qualidade do óleo, obter variedades mais resistentes e com porte mais baixo. Para tanto, utilizam as espécies *Elaeis oleifera* (HBK.), também conhecido como ‘caiaué’, endêmico do continente Americano, e o *Elaeis guineensis* (Jacq.), conhecido como dendê africano, de origem Africana (SURRE; ZILLER, 1969; CUNHA *et al.*, 2012). O primeiro, apesar de ser pouco produtivo, possui características agronômicas importantes, como menor crescimento vertical do tronco, óleo mais insaturado e de alto teor de oleína, que favorece a produção de biodiesel de alta qualidade, além de maior tolerância a diversas pragas (CHINCHILLA, 2008; CUNHA *et al.*, 2012). Já a segunda espécie é a mais produtiva em óleo vegetal e a que domina os plantios comerciais no mundo, embora seja mais suscetível a pragas e de possua porte elevado, características que tornam os plantios mais onerosos (BARCELOS *et al.*, 2000; BARCELOS *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2012).

Principal fonte mundial de óleo vegetal do mundo (USDA, 2021) o dendê chegou ao Brasil no século XVI, trazido do continente Africano pelos escravos adaptando-se as condições climáticas e de solo para o seu desenvolvimento.



**Figura 2.** Aspectos gerais da palma de óleo. A. Indivíduo adulto no campo exibindo estipe ereto. B. Dendezeiro com cacho de frutos. C. Fruto inteiro e seccionado de dendezeiro. D. Biocombustível de dendezeiro. E. Produto alimentício (azeite) e cosmético de dendezeiro. Fontes: A, B = Jardim Botânico UTAD; C = MPOB/Nature; D = Vivian Chies. E: Google.

Contudo a plantação de dendezeiro pode ser atingida por pragas e doenças, que por vezes, dificultam a expansão do cultivo, provocando a morte da planta e a perda de grandes áreas de plantio, o que afeta de forma negativa a economia dos países que cultivam o dendezeiro. Entre as pragas que infestam essa palmeira estão os roedores, insetos e lagartas desfolhadoras. E, entre as doenças, mencionam-se o Anel Vermelho (AV), Fusariose ou Secamento Letal (SL), Amarelecimento Fatal (AF), Marchitez Sorpresiva, Arcada Foliar ou Doença da Coroa e Podridão Seca do Coração ou Mancha Anular (AGROPALMA, 2014).

Dessa forma, estudos realizados nas últimas décadas, mostram que o híbrido do caiaué com o dendezeiro é pouco afetado por doenças e mais resistente a pragas (BARCELOS *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2012). Logo, torna-se necessário que se desenvolva pesquisas para a obtenção de protocolos seguros e confiáveis para a propagação clonal de genótipos da espécie, tanto para contribuir para programas de melhoramento genético da cultura, quanto para favorecer a propagação em larga escala de genótipos de interesse comercial (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; BALZON *et al.*, 2013).

### 3.2 Utilização do óleo de palma

Os dois tipos de óleo, dendê ou de palma, extraído do mesocarpo, e o óleo de amêndoa (óleo de palmiste), extraído da semente, têm ampla utilização e apresentam-se como matéria-prima para uso alimentício, medicinal, biodiesel e industrial (Fig. 2D, E). O óleo extraído do fruto da palma é o mais utilizado pela indústria alimentícia em todo o mundo, por ser o melhor para a substituição da gordura hidrogenada, além disso, é livre de gordura trans e rico em vitaminas do complexo A e E. Esse óleo também é utilizado como complemento nutricional para populações de baixa renda. Entre as aplicações industriais estão a produção de itens de higiene e limpeza, lubrificantes e na produção de biocombustível (BRAZÍLIO *et al.*, 2012; VISONÁ-OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A cultura favorável do dendê no Brasil tem aberto as portas para a produção de biodiesel, podendo substituir ou ser misturado ao óleo diesel, que é derivado do petróleo. As primeiras plantações para fins industriais de palma de óleo no país são do início dos anos 1960, na Bahia, e em seguida, no Pará (VENTURIERI *et al.*, 2009; REBELLO; COSTA, 2012; SIDRA, 2021). Na região Norte, a introdução aconteceu em 1951. Até então, a dendeicultura no Brasil necessitava de sementes importadas, o que levou ao desenvolvimento programas de pesquisas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), visando dotar o país de estrutura para gerar tecnologias para expansão sustentável da cultura. Com objetivo de atender a necessidade de sementes de alta qualidade, a Embrapa iniciou, em 1982, um Programa de Melhoramento Genético do dendezeiro, estabelecendo bancos de germoplasma da espécie africana *E. guineensis* (dendê) e da americana *E. oleifera* (caiaué) (CAMILLO, 2012).

De acordo com Peres e Beltrão (2006), as principais oleaginosas com domínio tecnológico são o algodão, amendoim, mamona, soja, girassol, canola gergelim e dendê. O dendê está entre as espécies com maior potencial para produção de biodiesel, considerando a alta produtividade de óleo e densidade energética (LOPES MATOS, 2020; ANTONINI; OLIVEIRA, 2021).

### 3.3 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais é uma das ferramentas biotecnológicas que envolvem o cultivo *in vitro* de plantas, ou partes dessas, como células ou fragmentos de tecido vivo, sob condições assépticas, em um meio de cultura nutritivo e em condições controladas de temperatura e luminosidade (TORRES *et al.*, 2000; SOUZA; JUNGHANS, 2006; SOH *et al.*, 2011; PELISSARI *et al.*, 2012). As técnicas da cultura de tecidos vegetais possuem diferentes aplicabilidades, como subsídio à propagação clonal de mudas em larga escala, ou seja, micropropagação vegetal; na conservação de recursos genéticos de plantas, a conservação *in vitro*; na produção de plantas transgênicas, na regeneração de plantas livres de vírus e patógenos, conhecidos como limpeza clonal, entre outras (TORRES *et al.*, 1998; CID; TEIXEIRA, 2010; EL FINTE *et al.*, 2013; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2018).

A micropropagação é uma das práticas mais utilizadas e de maior impacto para agricultura, pois oferece uma relação de baixo custo-benefício que permite uma rápida multiplicação, numa escala comercial, de materiais genéticos com características agronômicas (CID; TEIXEIRA, 2014). Além disso, possibilita a compreensão dos eventos morfológicos e bioquímicos que acontecem em plantas (CAMPOS, 2018).

Na família Arecaceae, há muitos estudos realizados na área da propagação *in vitro*, sobretudo com relação à embriogênese somática. Uma das principais espécies de interesse comercial é o *Elaeis guineensis*, dendezeiro, com vários protocolos de propagação clonal disponíveis via embriogênese somática (TEIXEIRA *et al.*, 1993; BALZON *et al.*, 2013; ALMEIDA, 2019; ALMEIDA, 2020).

#### 3.3.1 Embriogênese somática

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

Existem muitos argumentos para o uso de técnicas de cultura *in vitro* em palmeiras, como por exemplo, auxiliar estudos morfogênicos e para acelerar programas de melhoramento genético. Os programas de melhoramento em palmeiras são demorados e complexos devido ao longo ciclo, forma de crescimento e por não apresentar métodos convencionais de propagação

vegetativa (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Sendo assim, as técnicas de cultivo *in vitro*, em especial, a embriogênese somática, se projetam como alternativas promissoras para a propagação clonal de palmeiras (SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012).

Relatada pela primeira vez em palmeiras por Staritsky (1970) para a espécie *Elaeis guineensis*, a embriogênese somática é a técnica da cultura de tecidos mais utilizada na propagação vegetativa de palmeiras (STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007; SILVA; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2018). Desde sua primeira descrição em palmeiras, há relatos do desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática para mais de 20 espécies e dezenas de variedades (REE; GUERRA, 2015; SILVA, SCHEWINSKI-PEREIRA, 2018).

A embriogênese somática é um método onde as células somáticas diferenciam-se em plantas, acompanhando estágios de citodiferenciação embriogênicos com características definidas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; EMONS, 1994). Em geral, termos como embriogênese somática adventícia, assexual ou não zigótica são empregados para caracterizar indivíduos que foram originados de embriões bipolares e que não apresentam conexão vascular com o tecido materno, oriundos de células somáticas (HACCIUS, 1978; CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004). É um processo de regeneração envolvendo várias etapas, iniciando com a formação de massas pró-embriogênicas de células, seguido pela formação do embrião somático, maturação e regeneração da planta (VON ARNOLD *et al.*, 2002). Esses embriões, portanto, passam por estágios de desenvolvimento similares aos mencionados para os embriões zigóticos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (TEIXEIRA *et al.*, 1989; TITON *et al.*, 2007).

A formação dos embriões somáticos pode ocorrer de forma direta e indireta. A embriogênese somática direta ocorre a partir do propágulo inicial que já possui células programadas para a diferenciação e formação de embriões somáticos sem a ocorrência da fase intermediária de formação de calos, sendo necessário apenas acrescentar determinadas quantidades de reguladores de crescimento para a indução da divisão celular e expressão da embriogênese (REZENDE *et al.*, 2008). Por outro lado, a embriogênese somática indireta, que acontece na maioria dos casos, a formação dos embriões somáticos ocorre a partir da desdiferenciação celular com a proliferação de calos, seguida da diferenciação de células embriogênicas, sendo necessárias altas quantidades de reguladores de crescimento para aquisição de competência embriogênica (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010). O modelo indireto da embriogênese somática tem sido o principal método descrito para a propagação clonal da palma de óleo (KONAN *et al.*, 2006; WECKX *et al.*, 2019; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022).

Ressalta-se que após o início da embriogênese somática, o processo se torna autorregulatório, ou seja, pode suprir os subseqüentes estádios da via embriogênica sem a necessidade de ter contribuição de sinais externos, requerendo atividades simultâneas de sinalização e vias genéticas (SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014). De maneira geral, o processo de transição de células somáticas para embriogênicas envolve a desdiferenciação das células, ativação do ciclo de divisão celular e a reorganização da fisiologia, metabolismo e padrões de expressão gênica (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; YANG; ZHANG, 2010; ELMEER, 2013).

No decorrer desse processo, vários fatores externos atuam de forma direta e/ou indireta nos resultados obtidos, como o genótipo da planta doadora, o tipo e o estágio fisiológico dos explantes, a quantidade de agente gelificante e de carvão ativado no meio de cultura, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento e a duração das fases de todo processo são os fatores mais determinantes no sucesso das culturas embriogênicas (MUNIRAN *et al.*, 2008; KUMAR; KUMARI, 2011; SILVA *et al.*, 2012; CORREDOIRA *et al.*, 2019).

A embriogênese somática apresenta um conjunto de fases, sendo elas: indução de calos embriogênicos, multiplicação de calos, diferenciação, maturação e germinação dos embriões somáticos obtidos e aclimatização das plantas oriundas do processo de germinação. Para a indução de calos é necessária a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, geralmente em altas concentrações e/ou aplicação de estresses diversos, como osmótico, salino, hídrico, térmico, metais pesados, nutricional e oxidativo (KHURANA, 2005; IBRAHEEM, 2014; MOON *et al.*, 2015;; PEREIRA *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016; KRISHNAN; SIRIL, 2017; PAIS, 2019).

Por conseguinte, a fase de multiplicação objetiva determinar condições que sejam adequadas para estabelecer ciclos da divisão celular e controle dos processos de diferenciação, de tal maneira, que as culturas sejam compostas por células pró-embriogênica ou embriões somáticos em estágio globular de desenvolvimento (TARMIZI *et al.*, 2008; CORREIA *et al.*, 2016). É geralmente nessa fase que suspensões celulares são estabelecidas (GORRET *et al.*, 2004).

A diferenciação caracteriza-se pelo cultivo de massas embriogênicas em meios com níveis reduzidos de reguladores de crescimento (GOH *et al.*, 2001; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; REE; GUERRA, 2015) ou desprovidos deles (REE; GUERRA, 2015). A redução ou total remoção desses reguladores inibe a proliferação e promovendo um gradiente polar de auxina (JIMÉNEZ, 2001, 2005), estimulando assim, a formação de embriões somáticos e o desenvolvimento inicial (VON ARNOLD *et al.*, 2002; SU *et al.*, 2009).

A maturação é apontada como a etapa fundamental do desenvolvimento do embrião, assim conhecer os fatores biológicos que afetam a embriogênese somática é fundamental para otimizar a tecnologia da embriogênese somática (PERÁNQUESADA *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2022). Durante a fase de maturação os embriões somáticos sofrem alterações morfológicas e bioquímicas, como a deposição de compostos de armazenamento (MÁRQUEZ-MARTÍN *et al.*, 2011; KAMLE E BAEK, 2017; GARCIA *et al.* 2019), síntese e mobilização de proteínas, carboidratos e lipídios e alterações do conteúdo endógeno de poliaminas (SILVEIRA *et al.*, 2004), sendo considerada uma fase crítica do processo embriogênico, que limita a aplicação comercial da embriogênese somática (MÁRQUEZ-MARTÍN *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2012; VALE *et al.*, 2014). A etapa seguinte é a germinação, definida como o desenvolvimento do sistema radicular e parte aérea (MERKLE *et al.*, 1995). Essa fase proporciona condições adequadas para a conversão dos embriões somáticos maduros em plantas, sendo comumente realizada em meios nutritivos sem reguladores de crescimento (GOMES *et al.*, 2016).

Por fim, a fase de aclimatização, é caracterizada como a transição das plantas das condições *in vitro* para *ex vitro* (BADR *et al.*, 2015). As plantas transplantadas para condições *ex vitro* devem resistir de forma progressiva ao aumento da luminosidade, à umidade relativa inferior, variação de temperatura e estresses bióticos típicos da nova condição (FKI *et al.*, 2011). Para isso, algumas técnicas têm sido adotadas para aumentar a sobrevivência e crescimento de plantas regeneradas a partir de embriões somáticos (STEINMACHER, *et al.*, 2007; STEFENON *et al.*, 2020).

Contudo, existem aspectos que precisam ser aprimorados para melhor aplicação em larga escala da rota da embriogênese somática. Entre eles, podem ser citados, a sincronização da maturação de embriões somáticos, a utilização de biorreatores nas etapas finais do processo, análise mais detalhada da germinação, a fase de aclimatação de plantas e a realização de análises fisiológicas e da qualidade molecular das plantas obtidas (FERREIRA *et al.*, 2022).

### **3.3.1.1 Maturação de embriões somáticos**

Baixos percentuais de germinação de embriões somáticos podem estar relacionados ao processo de maturação e a ocorrência de altas taxas de anormalidades de embriões maduros (KÖRBES; DROSTE, 2005; YOUSSEF *et al.*, 2010; PAIS, 2019), o que limita a exploração da técnica. O pequeno tamanho do embrião restringe sua capacidade de armazenar reservas e limita sua capacidade de desenvolvimento, o que aumenta sua dependência das reservas do endosperma e da região haustorial. Segundo Sghaier *et al.* (2008), esse menor conteúdo proteico pode ser consequente da ausência de sinais indutores necessários à síntese de moléculas

específicas, como hormônios e o processo de dessecação. Ainda conforme esses autores, a não acumulação de proteínas de reserva está associado com a ausência da fase de maturação em embriões somáticos, sendo considerados marcadores da fase de maturação (GALAU *et al.*, 1991).

Diferentes pesquisadores têm ressaltado déficit proteico em embriões somáticos em variadas palmeiras, incluindo *Phoenix dactylifera* (SANÉ *et al.*, 2006; ZEIN ELDIN; IBRAHIM, 2015), *Elaeis guineensis* (ABERLENC BERTOSSI *et al.*, 2008), *Acrocomia aculeta* (MOURA *et al.*, 2010) e *Syagrus oleracea* (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019a). Fournié (1994) também salientou que o embrião somático de dendezeiro, embora similar em termos histológicos ao embrião zigótico, não possui as características do estado maduro. Nesse contexto, Aberlenc-Bertossi *et al.* (2008) afirmam que embriões somáticos de dendezeiro, diferentemente dos embriões zigóticos, apresentam desenvolvimento contínuo, sem sofrer desidratação, seguindo direto para o crescimento germinativo. Considerando essas pesquisas, é importante aprimorar a etapa de maturação para garantir uma germinação eficiente e o desenvolvimento de mudas vigorosas. Salienta-se que, de modo geral, essa etapa do processo embriogênico é geralmente negligenciada durante o desenvolvimento de protocolos em diferentes espécies vegetais, o que inclui as palmeiras.

Na natureza, embora não seja consenso, a mudança da embriogênese para fase de maturação (*sensu stricto*) é caracterizada pelo incremento do peso seco, momento no qual ocorre o preenchimento da semente. A fase de maturação tardia, por sua vez, se inicia com o final do preenchimento da semente, ocasião na qual o embrião e/ou endosperma cessam o processo de expansão e acumulam reservas (LENPRICE *et al.*, 2017). Sob condições *in vitro*, a maturação pode ser afetada por múltiplos fatores (MADAKADZE; SENARATNA, 2000; GAO *et al.*, 2022), dentre os quais, mencionam-se a suplementação do meio de cultivo com glutamina (ZOUINE *et al.*, 2005; YANG, 2020; PULLMAN; BUCALO, 2014), diferentes fontes de açúcares, Polietilenoglicol (PEG), ácido abscísico (ABA) (LINOSSIER *et al.*, 1997; BOZHKOV; VON ARNOLD, 1998; KÖRBES; DROSTE, 2005; ABERLENC-BERTOSSI *et al.*, 2008; SGHAIER-HAMMAMI *et al.*, 2010; BUSINGE *et al.*, 2013; SGHAIER *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2022), alta concentração de agente gelificante, uso de meio líquido e alteração da concentração de sais dos meios de cultivo (MAZRI *et al.*, 2022). Segundo Sghaier-Hammami *et al.* (2010), os efeitos de alguns desses fatores ainda não são bem compreendidos e suas aplicações visam imitar as mudanças que ocorrem durante maturação de embriões zigóticos.

O Polietilenoglicol (PEG), por exemplo, tem sido utilizado para promover a maturação na embriogênese somática em várias espécies, como no caso de *Phoenix dactylifera*

(ALKHATEEB, 2006), *Carica papaya* (VALE *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2019; BOTINI *et al.*, 2021), *Pinus* spp. (STASOLLA ; YEUNG 2003; SALO *et al.*, 2016) e *Cicer arietinum* (MISHRA *et al.*, 2012). O PEG induz o estresse hídrico, uma vez que devido ao seu alto peso molecular, esse composto não consegue atravessar a parede celular, levando a restrita absorção de água, com pressão de turgor baixa e redução no potencial osmótico intracelular (MISHRA *et al.*, 2012), imitando assim, a etapa de dessecação que ocorre naturalmente durante a embriogênese zigótica.

Segundo Mazri (2019), manitol, sorbitol e PEG são frequentemente usados em muitas espécies de plantas para estimular a maturação de embriões somáticos. Tais autores constataram em tamareira (*Phoenix dactylifera*) que o PEG na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> aumentou significativamente o número de embriões somáticos maduros. Por outro lado, Tikkinen *et al.* (2018) reportaram que a adição de PEG ao meio de maturação semissólido proporcionou o aumento da produção de embriões somático em *Picea abies* L. Karst.), porém com rendimento inferior ao observado no tratamento desprovido desse agente osmótico. Quando utilizado em meio de maturação combinado com ácido abscísico (ABA), o rendimento embrionário incrementou de tal maneira que foi possível realizar a transferência de embriões germinados *in vitro* diretamente para o viveiro.

Em espécies como *Picea glauca* (STASOLLA *et al.*, 2003; BELMONTE *et al.*, 2005) e *Aesculus hippocastanum* (TROCH *et al.*, 2009), a adição de PEG no meio de maturação foi essencial para a conversão dos embriões somáticos em plântulas. Resultados positivos na fase de maturação consequentes da adição de PEG ao meio de cultura também foram reportados em *Passiflora edulis* Sims (CRUZ *et al.*, 2022), *Panax ginseng* (LANGHANSOVA *et al.*, 2004), *Picea abies* (HUDEC *et al.*, 2016), *Carica papaya* (HERINGER *et al.*, 2013; VALE *et al.*, 2018).

### **3.3.2 Cultivos celulares em suspensão**

Os cultivos em suspensão celular é a técnica que possibilita a indução, propagação e manutenção de células em meio líquido sem que haja a necessidade de adição de um agente gelificante (MATSUMOTO, 2006). O meio líquido tem mostrado ser uma alternativa promissora à propagação *in vitro*, dadas as vantagens de ter produção de embriões somáticos uniformes, com redução de custos para produção de plantas e a possibilidade de automatização (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009; SUMARYONO *et al.*, 2008).

Normalmente na cultura de células em suspensão, calos friáveis que foram induzidos *in vitro* são escolhidos e inoculados em meio de cultura líquido acrescentado com auxina. Nessas

condições, os materiais são geralmente mantidos sob agitação, com o objetivo de formarem um conteúdo em suspensão. Sob essas condições, as células adquirem competência para se desenvolverem e formarem agregados celulares (MAZAREIA *et al.*, 2011; KSHIRSAGAR *et al.*, 2015).

Pelo fato de ter contato direto entre as células e os nutrientes do meio de cultura, os cultivos celulares em suspensão favorecem maior taxa de divisão celular, permitindo assim, um crescimento acelerado e exponencial das células (CID, 1998; VANISREE *et al.*, 2004; MOHD *et al.*, 2012). As condições de crescimento podem ser totalmente controladas, evitando, desse modo, que os explantes sofram processos de diferenciação (LIU *et al.*, 2013).

### **3.3.3 Análises morfoanatômicas, histoquímicas e bioquímicas no desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática**

A análise morfoanatômica compreende a aplicação de múltiplas técnicas que permite o melhor entendimento dos eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. Desta maneira, é possível conhecer e entender o desenvolvimento do material vegetal desde a indução da embriogênese somática até aclimatização das plantas.

A realização de análises anatômicas é bastante útil para a melhor compreensão da embriogênese em várias espécies vegetais. Em palmeiras, há relatos do uso dessa ferramenta em diversas espécies, seja para permitir a distinção de calos embriogênicos e não embriogênicos, seja para a identificação dos embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. Dentre os vários trabalhos, mencionam-se aqueles realizados em *Cocus nucifera* (CHAN *et al.*, 1998), *Euterpe edulis* (GUERRA; HANDRO, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2022), *E. precatória* (FERREIRA *et al.*, 2022), *P. dactylifera* (SANÉ *et al.*, 2006; QUEYE *et al.*, 2009), *Bactris gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2007), *S. oleracea* (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019a, b) e *E. guineensis* e seus híbridos interespecíficos (SCHWENDIMAN *et al.*, 1988; SILVA *et al.*, 2012; SILVA-CARDOSO *et al.*, 2022). Outra importante aplicabilidade das análises histológicas consiste na identificação da origem do embrião somático, a qual pode ser unicelular ou multicelular (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019b), a qual pode influenciar (facilitar ou dificultar) o manejo dos embriões somáticos, bem como pode ser determinante na qualidade morfológica dos embriões formados.

Apesar dessa abundância de trabalhos, Silva-Cardoso *et al.* (2022) enfatizam que o conhecimento atual sobre os conceitos inerentes aos processos de aquisição de competência para a formação de calos, embriogênicos ou não, por células somáticas ainda é deficitário em palmeiras, principalmente com relação aos eventos histológicos iniciais, que envolve a

identificação detalhada das respostas dos explantes e das células/tecidos relacionados com a origem do calo.

Análises morfoanatômicas geralmente são acompanhadas por análises histoquímicas. A histoquímica tem a finalidade de localizar *in situ* os principais grupos químicos que estão presentes nos tecidos vegetais, determinando a natureza das substâncias presentes nos tecidos. Em todos os métodos histoquímicos é necessário evitar o deslocamento artificial da substância a ser caracterizada durante os tratamentos que precedem a reação histoquímica, que é detectada ao microscópio por coloração específica. Além disso, os métodos histoquímicos geralmente não permitem determinações quantitativas (FIGUEIREDO *et al.*, 2005).

Análises histoquímicas permitem gerar informações com relação a produção e uso de reservas nutricionais (proteínas, lipídeos e amido) que subsidiam em termos energéticos os eventos de divisão e diferenciação celular e germinação dos embriões somáticos. Ademais, a identificação de compostos nutricionais por análises histoquímicas pode indicar a qualidade fisiológica dos embriões somáticos após a etapa de maturação (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019a). Esses compostos de reserva exercem um papel importante na morfogênese *in vitro* (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2004).

Os carboidratos, por exemplo, fazem parte de um importante grupo de compostos vegetais, que incluem desde açúcares simples até açúcares mais complexos. Uma de suas funções é o acúmulo de reservas, realizado pelo armazenamento de grãos de amido, atuando também na defesa e sustentação da planta, realizada pela celulose e hemicelulose (GIBSON, 2005; MOGHADDAM; ENDE, 2012). No desenvolvimento dos embriões, os carboidratos são fonte de energia metabólica para as células e carbono estrutural para várias rotas biossintéticas (KUMAR; KUMARI, 2011).

Já os lipídeos são moléculas grandes e complexas formadas por ácidos graxos e ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas constituídas por 4 a 36 carbonos. Tem função de armazenar de formas bastante reduzidas o carbono. Além disso, os lipídeos atuam na composição de membranas celulares e na ligação de substâncias oleaginosas com substâncias não oleaginosas (BENSON, 1964; HARWOOD E MOORE JR Jr, 1989; SOMERVILLE; BROWSE, 1991; THELEN E OHLROGGE, 2002; CHAPMAN *et al.*, 2012). Na embriogênese de espécies oleaginosas, como a mamona, o algodão e o dendezeiro, pesquisas comprovam que durante as fases de maturação e germinação, as reservas lipídicas armazenadas nos cotilédones são convertidas em glicose, sacarose e diversos outros metabólitos essenciais ao desenvolvimento inicial da planta (PESCADOR *et al.*, 2012; THEODOULOU; EASTMOND, 2012; DUSSERT *et al.*, 2013).

Os aminoácidos servem como constituintes básicos para a biossíntese de outras substâncias vegetais, como as proteínas, os ácidos nucleicos e as substâncias nitrogenadas do metabolismo secundário, como os fitorreguladores. Dessa maneira, o metabolismo desses compostos é responsável direta e/ou indiretamente por quase todos os processos do crescimento e desenvolvimento da planta (MIFLIN; LEA, 1977; HÄUSLER *et al.*, 2014).

Algumas das diversas funções desempenhadas pelas proteínas consistem no transporte de substâncias para dentro e para fora das células, resistência e adaptação da planta a estresses abióticos (CARVALHO; GOMES, 2007; KOSOVÁ *et al.*, 2011). No desenvolvimento embriogênico, é comum observar o aumento do conteúdo de proteínas, esse acréscimo se dá em função da síntese de proteínas de reserva e acúmulo de proteínas relacionadas ao estresse e a outras classes de proteínas, como aquelas envolvidas com a respiração (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2014a). As proteínas de armazenamento são consideradas as principais fontes de nitrogênio e carbono durante a germinação e posterior crescimento inicial das plântulas (MADAKADZE; SENARATNA, 2000; ELIÁŠOVÁ *et al.*, 2022). Análises bioquímicas têm sido realizadas em trabalhos de embriogênese somática em palmeiras, a grande maioria voltada para a identificação de marcadores do potencial embriogênico de calos (DUSSERT *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2014; GOMES, 2016).

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília, DF. Foram utilizados como material vegetal, agregados celulares (calos) cultivados, desde o ano de 2016, em meio líquido composto pelos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose, 0,5 g L<sup>-1</sup> de glutamina e 1 g.L<sup>-1</sup> de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (MONTEIRO *et al.*, 2018). Os agregados celulares foram oriundos de suspensões celulares, estabelecidas a partir de calos provenientes de tecidos foliares jovens (palmito – folhas aclorofiladas e não expandidas) de plantas adultas do híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) B35-1733 previamente estabelecidos *in vitro* (Fig. 3A-C).

### 4.2 Diferenciação de embriões somáticos

Para a diferenciação de embriões somáticos, agregados celulares oriundos do meio líquido, foram cultivados em meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de caseína, 1,0 g.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 2,3 g.L<sup>-1</sup> do agente solidificante Phytigel (Sigma, St. Louis, MO), (dados não publicados). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8±0,1 antes da esterilização, realizada em autoclave à 121 °C durante 20 minutos, à 1,5 atm de pressão.

Durante a fase de diferenciação, os explantes foram cultivados em placas de *Petri* (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, seladas com policloreto de polivinila (PVC) transparente e armazenados em sala de crescimento à 25°±2°C, com subcultivos mensais. Cada placa foi composta por 10 agregados celulares, em um total de 27 placas.

A percentagem de formação de calos com embriões somáticos e o número de embriões somáticos por calo foram determinados após 340 dias de cultivo.

### 4.3 Maturação de embriões somáticos

A maturação dos embriões somáticos foi realizada pela transferência dos embriões somáticos em estágio de desenvolvimento similar ao torpedo, dispostos de forma agregada (*clusters* com cerca de 20 embriões somáticos por agregado), para novos meios de cultura, com diferentes composições: 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 0 g.L<sup>-1</sup> de Polietilenoglicol (PEG); 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 0 g.L<sup>-1</sup> de PEG; 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de PEG; 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45

g.L<sup>-1</sup> de PEG; 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de PEG e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG. Os *clusters* foram matindos nos meios de maturação por 30 dias.

Logo após, os explantes foram transferidos para o meio de pré-germinação semissólido, composto pelos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 0,25 g.L<sup>-1</sup> de caseína, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de cisteína, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de arginina, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de asparagina, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 2,3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8±1,0 antes da esterilização, realizada por autoclavagem à 121 °C durante 20 minutos, à 1,5 atm de pressão.

Durante a fase de maturação, os explantes foram cultivados em tubos de ensaio, com aproximadamente 10 mL de meio de cultura por tubo de ensaio, seladas com filme PVC transparente e armazenadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de 100 µmol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, à 25°±2°C.

Mensalmente, embriões somáticos com coloração esverdeada (critério de maturação) foram transferidos para o meio líquido de germinação, descrito no tópico posterior. Dessa forma, foram contabilizados, a cada 30 dias, o número de embriões somáticos considerados maduros por tratamento.

#### **4.3.1 Análises bioquímicas – proteínas solúveis totais**

Após 30 dias de cultivo em meios de maturação, amostras (10 mg de massa fresca), oriundas de cada tratamento de maturação, foram utilizadas para quantificação de proteínas solúveis totais.

A quantificação foi conduzida de acordo com o método descrito por Bradford (1976). A leitura ocorreu em espectrofotômetro na absorvância de 595 nm, conforme Gomes *et al.* (2014). Para tanto, 10 mg de massa fresca das amostras foram inoculadas em microtubos de 2 mL de capacidade, imersas em 0,5 mL de NaOH 0,1 N e incubadas à 4°C por 12 horas. Em seguida, foram adicionadas às amostras mais duas alíquotas de 0,25 mL de NaOH 0,1 N, seguido de mais uma hora de incubação à 4°C cada.

Após esse processo, as amostras foram centrifugadas à 12.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos. Posteriormente, 1 mL de ácido tricloroacético 20% foi adicionado às amostras, que foram então, centrifugadas à 13.000 rpm por 10 minutos para precipitação das proteínas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o extrato ressuspenso em 1 mL de NaOH 0,1 N.

Por fim, a quantificação das proteínas totais foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976). Para isso, 2 µL das amostras foram pipetados em microplacas,

onde foram adicionados 300 µL de reagente Bradford 50%. Após 5 minutos de repouso no escuro, foi realizada a leitura das absorbâncias das amostras em leitor de microplacas Elisa à 595 nm. Nessa etapa, todas as análises foram realizadas em triplicata e com base na curva padrão de albumina de soro bovina (BSA do inglês *Bovine Serum Albumin*), com quantidades crescentes de 0,0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 µg.

As análises foram realizadas em triplicata. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ), por meio do software estatístico R.

#### **4.4 Germinação de embriões somáticos**

*Clusters* de embriões maduros (esverdeados) foram transferidos mensalmente para meio de germinação líquido composto por sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 0,25 g.L<sup>-1</sup> de caseína, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de asparagina, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de arginina, 0,25 g.L<sup>-1</sup> de cisteína, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberelérico (AG<sub>3</sub>). Os meios foram esterilizados por autoclavagem à 121 °C durante 20 minutos, à 1,5 atm de pressão.

Durante a fase de germinação, os explantes foram cultivados em frascos de vidro, com aproximadamente 250 mL de meio de cultura por frasco, selados com filme PVC transparente e armazenados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de 100 µmol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, à 25°±2°C. Subcultivo foi realizado após três meses de cultivo.

Após três meses de cultivo, avaliaram-se os percentuais de emissão de parte aérea e de enraizamento por *cluster*. O conjunto de dados obtido foi submetido à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ), por meio do software estatístico R.

#### **4.5 Aclimatização de plantas**

Posteriormente ao enraizamento *in vitro* das plantas, as mesmas foram retiradas dos seus frascos de cultivo e submetidas à lavagem de suas raízes em água corrente para eliminar o excesso de meio de cultura. Em seguida, os cultivos foram transferidos para copos descartáveis brancos de 300 mL de capacidade preenchidos com substrato comercial Bioplant®. Após o plantio, as mudas foram pré-aclimatizadas em câmaras tipo BOD (Percival, modelo I-30NL) com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e radiação luminosa de 20 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Durante as duas primeiras semanas desse processo, os propágulos foram mantidos cobertos por sacos de polietileno transparente, com filtros para realização de trocas gasosas.

#### **4.6 Análises morfoanatômicas e histoquímicas**

Para melhor caracterização do potencial embriogênico dos agregados celulares, embriões somáticos oriundos do meio líquido (três embriões por tratamento) foram retirados de cada tratamento de maturação e foram submetidas às análises anatômicas e histoquímicas.

As etapas de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal coletado foram realizadas conforme o seguinte protocolo: fixação em solução de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), por um período de 24 h (sob vácuo durante a primeira hora), seguida de três lavagens em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo); logo após, desidratação em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70% - 100%, 100%), por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

Posteriormente, cortes longitudinais e transversais (3-7  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. As secções obtidas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos (O'BRIEN; FENDER; MCCULLY, 1964).

As secções obtidas a partir do material emblocado também foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: Lugol (JOHANSEN, 1940) para detecção de grãos de amido e *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para identificação de proteínas (VIDAL, 1970). A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diferenciação de embriões somáticos oriundos de agregados celulares cultivados em meio líquido

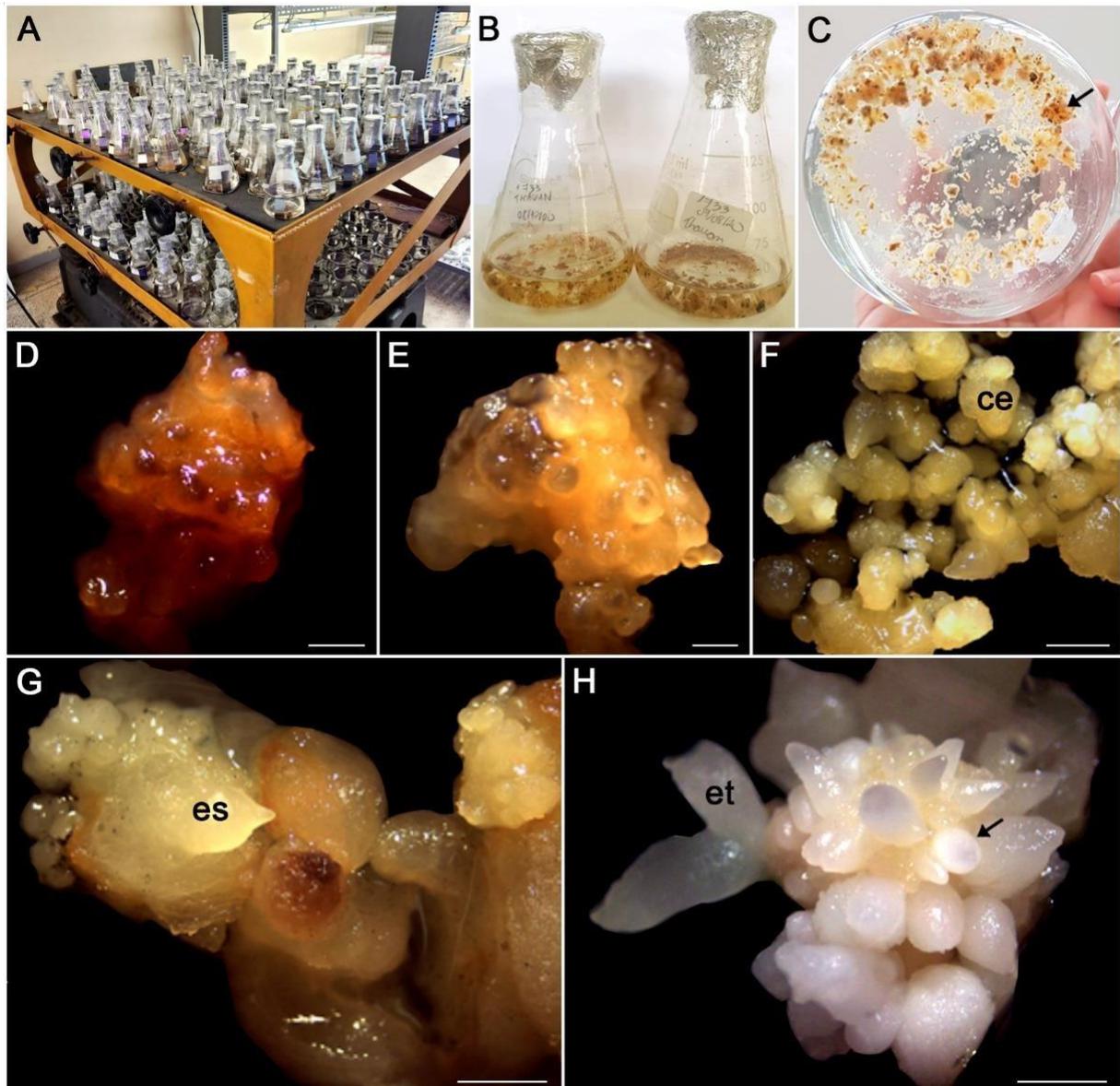
Após 7 dias de cultivo em meio semissólido dos agregados celulares oriundos do meio líquido, verificou-se uma pigmentação escurecida e consistência mucilaginosa - hidratada (Fig. 3D). Aos 30 dias de cultivo em meio semissólido, observou-se início de formação de calos embriogênicos, caracterizados por coloração amarelada, consistência menos mucilaginosa e formação de estruturas nodulares (Fig. 3E). Aos 60 dias, constatou-se multiplicação expressiva dos calos embriogênicos (Fig. 3F). Resultados semelhantes também foram relatados por De Carvalho (2012), com calos primários que evoluíram para calos embriogênicos, com aspecto nodular e de coloração amarelada.

Embora a morfologia das linhagens embriogênicas apresentem diferenças relevantes, a influência da idade da cultura também se mostra evidente, pois as culturas mantidas por subcultivos repetitivos durante períodos prolongados mostraram uma proporção aumentada de calos embriogênicos e embriões subdesenvolvidos (BRADAĬ *et. al.*, 2016).

Já aos 120 dias de cultivo em meio semissólido, observou-se a diferenciação de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (globular e torpedo) (Fig. 3G). Após 340 dias, notou-se o surgimento de *clusters* (agrupamentos) de embriões somáticos, com embriões globulares e torpedos de diferentes tamanhos, a maioria com coloração branca-leitosa (Fig. 3H).

Esta pesquisa mostra que o processo de embriogênese somática desde a retirada dos agregados do meio líquido até o surgimento de embriões somáticos é um processo razoavelmente longo, requerendo cerca de 10 meses. Esse achado concorda com Soh *et al.* (2011). Segundo esses autores, as fases de calogênese e diferenciação de embriões somáticos de *E. guineensis* foram lentas, em média com 8 meses.

Os resultados obtidos corroboram com os de Monteiro *et al.* (2018), que relataram a formação assincrônica de embriões somáticos de dendezeiro, ou seja, formação de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (globular e torpedo) simultaneamente. Resultados semelhantes também foram observados em outros trabalhos com palmeiras (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010; BALZON *et al.*, 2013; NEVES *et al.*, 2020).



**Figura 3.** Aspectos gerais sobre os agregados celulares de palma de óleo (Genótipo B35-1733) utilizados. **A.** Agregados celulares oriundos de explantes foliares em meio líquido sob agitação, após 6 anos de cultivo. **B-C.** Agregados celulares em meio líquido em erlenmeyers. **D-F.** Agregados celulares após 7, 30 e 60 dias de cultivo em meio semissólido, respectivamente. **G.** Agregados celulares após 120 dias de cultivo em meio semissólido; notar diferenciação de embrião somático. **H.** Cluster de embriões somáticos em estágio similar ao torpeda, após 340 dias de cultivo em meio semissólido. Abreviações: ce, calo embriogênico; es, embrião somático; et, embrião somático torpeda. Barras: **D, E** = 1 mm e **F-H** = 2 mm.

Considerando-se um total de 27 placas com seis explantes cada, correspondentes aos agregados calogênicos oriundos do meio líquido, verificou-se, após 340 dias em meio semissólido, que 49,4% das placas apresentaram calos com embriões somáticos (Fig. 3H). Menciona-se que alguns calos apresentaram escurecimento (oxidação), o que comprometeu o processo de diferenciação dos embriões somáticos.

Os tecidos vegetais logo depois de serem transferidos para a cultura *in vitro* podem exibir sinais de oxidação (escurecimento), em razão da liberação de compostos fenólicos. Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação em torno da superfície excisada tende a modificar a composição do meio de cultivo e sua absorção (ANDRADE *et al.*, 2000; VANWINKLE *et al.*, 2003). Essas substâncias tóxicas produzidas normalmente inibem o crescimento dos explantes, podendo ocasionar até mesmo a morte dos materiais cultivados (SATO *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2006), o que ressalta a importância do uso de compostos antioxidantes, como carvão ativado, e a realização de subcultivos frequentes.

Ao final desse período, obtiveram-se 1.161 embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, com um valor médio de 13 embriões somáticos por calo, geralmente, dispostos em *cluster*. É importante ressaltar que durante a etapa de diferenciação, alguns embriões somáticos germinaram (emitiram um ou mais meristemas). De modo geral, foi considerada positiva a capacidade embriogênica dos agregados estudados neste trabalho, mesmo após o longo período de cultivo em meio líquido, por volta de 6 anos.

Diferente dos resultados obtidos aqui, Ji *et al.* (2019) relataram a redução gradual ou até a perda total da capacidade embriogênica de explantes de soja com o aumento do tempo de cultivo. Similarmente, Yu *et al.* (2023) reportaram, em *Vitis vinifera*, uma significativa diminuição da taxa de indução da embriogênese somática após 10 anos de cultivo *in vitro*. Ademais, esses autores reportaram até 92,2% de embriões somáticos anormais consequentes do longo período de cultivo. Já o cultivo por longo prazo aumentou as taxas de estruturas anormais na palmeira *Areca catechu* (WANG *et al.*, 2010).

Em dendezeiro, por sua vez, Konan *et al.* (2010) reportaram que 30% dos clones avaliados, cultivados *in vitro* por 20 anos, mantiveram o potencial de multiplicação satisfatório. Contudo as plantas regeneradas apresentaram variação somaclonal ('mantled'), o que dificultou a capacidade de sobrevivência em campo. Na maioria das espécies, culturas embriogênicas crescem menos ou perdem suas características morfogênicas com acúmulo de mutações ao longo do tempo, como pinheiro bravo, oliveira e frutas cítricas (YU *et al.*, 2022).

Por outro lado, alguns trabalhos mostraram que culturas embriogênicas podem ser preservadas por muitos anos *in vitro*, por subcultura periódica. Foram reportados, com poucas anormalidades estruturais, embriões somáticos provenientes da cultura de *Catharanthus roseus* após 14 anos sob condições *in vitro*, em comparação com embriões de uma cultura embriogênica recente (GULZAR *et al.*, 2021). Já Bradaí *et al.* (2016) e Tremblay *et al.* (1999) relataram uma influência significativa da idade da cultura nas respostas *in vitro* de *Olea europaea L.* e *Picea abies*, respectivamente. Conforme esses autores o desenvolvimento da

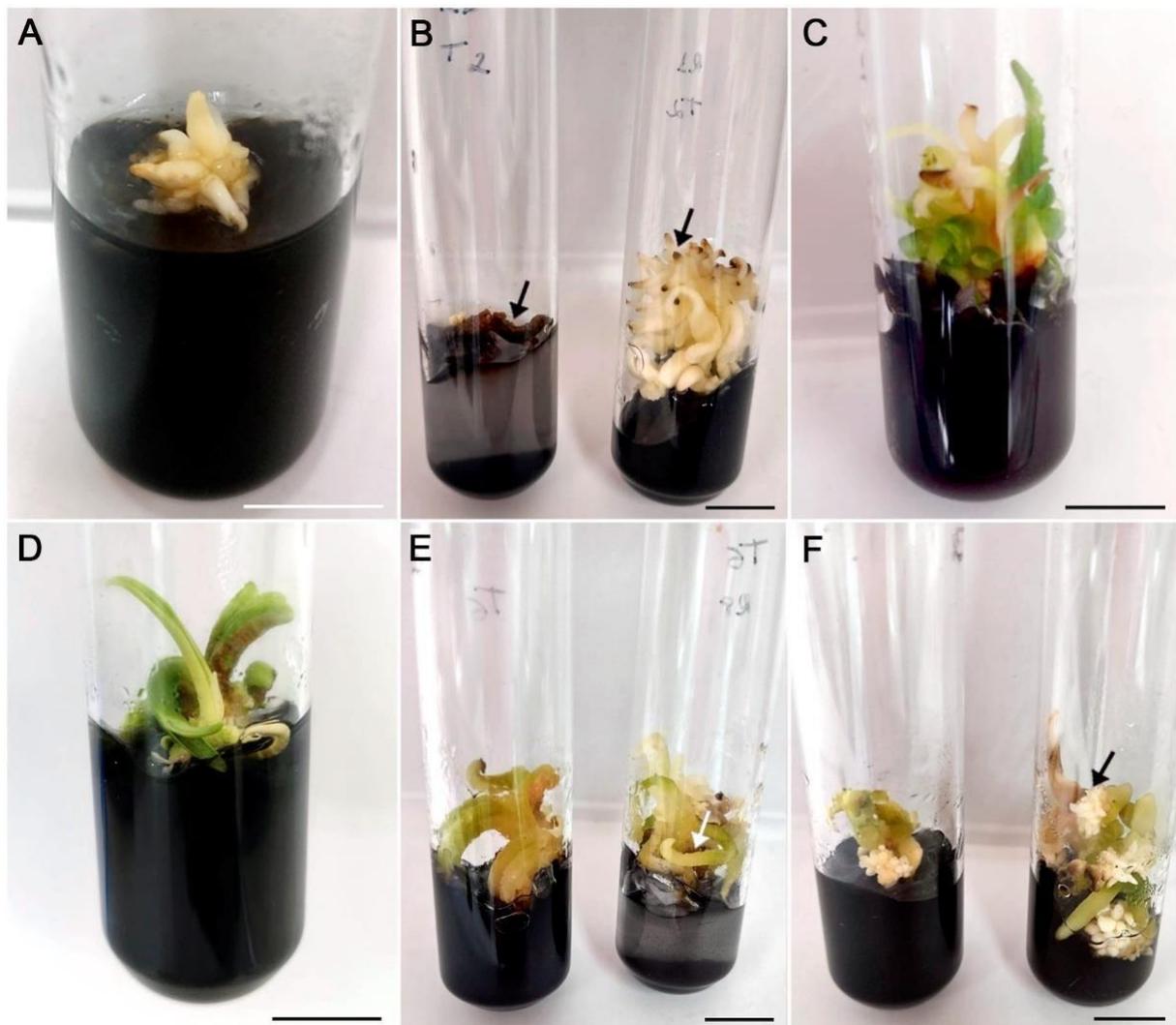
maturação na azeitona foi prejudicado pelo tempo de cultivo. Para Klimazewska *et al.*, (2009), a manutenção a longo prazo de *Pinus pinaster*, não só determinou o número total de embriões somáticos formados, mas também a diminuiu a capacidade das culturas em progredir para os próximos estágios, indicando que a integridade do processo de maturação não foi preservada completamente durante o tempo em cultura.

## 5.2 Maturação de embriões somáticos

A fase de maturação e germinação de embriões são etapas essenciais no processo de embriogênese somática, sendo considerados gargalos do processo, em diferentes espécies (MAZRI *et al.*, 2019). Nesse sentido, foram analisados os efeitos de diferentes meios de cultura, suplementados com sacarose combinada ou não com Polietilenoglicol (PEG), sobre a taxa de maturação e germinação de embriões somáticos de palma de óleo.

*Clusters* foram transferidos para o meio de maturação e, após 30 dias, foram transferidos para meio pré-germinação com carvão ativado. No primeiro mês nesse último meio, observaram-se alguns embriões somáticos com coloração branca (Fig. 4A) e alguns poucos já esverdeados, sobretudo oriundos do tratamento com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Aos 60 dias, verificaram-se embriões somáticos torpedos brancos ou amarelos, além de escurecimento de alguns embriões somáticos e do meio de cultivo, sobretudo, naqueles tratamentos suplementados com PEG (Fig. 4B). Notou-se ainda, embriões vitrificados em meios com PEG (Fig. 4C). De fato, esse agente osmótico pode promover ou inibir significativamente o crescimento e a maturação de embriões somáticos dependendo de sua concentração e da duração da exposição (MAZRI *et al.*, 2016).

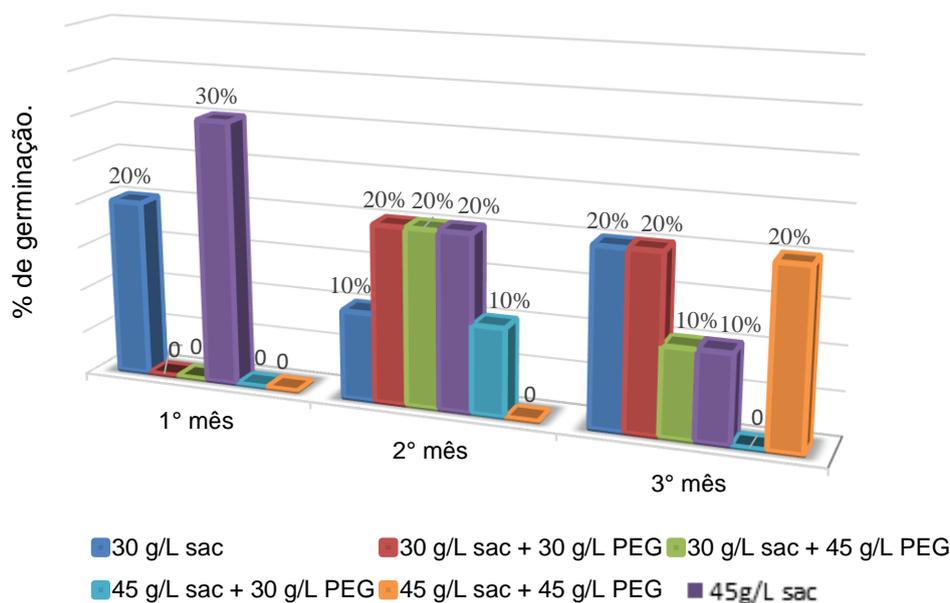
Ao longo do período de avaliação, verificou-se que uma parcela dos embriões somáticos adquiriu coloração esverdeada, concomitantemente ao alongamento expressivo, acompanhado da emissão do meristema caulinar (Fig. 4C, D). Salienta-se que ao longo do cultivo, constatou-se a manutenção do fenótipo hiperídrico de embriões somáticos em meio suplementado com PEG (Fig. 4E). Embriogênese secundária também foi observada (Fig. 4F).



**Figura 4.** Caracterização morfológica das respostas da maturação de embriões somáticos de palma de óleo (Genótipo B35-1733) oriundos de diferentes tratamentos de maturação. **A.** Maturação do embrião somático após um mês de cultivo em meio suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. **B.** Escurecimento dos embriões somáticos ao longo do tempo durante a exposição ao Polietilenoglicol (PEG). **C.** Embriões somáticos esverdeados e com sinais de vitrificação cultivados em meio suplementado com PEG. **D.** Emissão de parte aérea. **E.** Embriões somáticos com sinais de vitrificação (seta) cultivados em meio suplementado com PEG após 90 dias em meio com PEG. **F.** Ocorrência de embriogênese secundária (seta). Barras: 1,25 cm.

O acompanhamento mensal da maturação, considerando-se o critério de maturação esverdeamento do embrião somático, revela a ausência de padrão ao longo do período de avaliação (Fig. 5). Em termos numéricos, o tratamento 45 g.L<sup>-1</sup> destacou-se, proporcionando a maturação de um maior número de *clusters* de embriões somáticos. Luis *et al.* (2014), também utilizaram 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose para a maturação de embriões somáticos da palmeira *Acrocomia aculeata*, com objetivo de melhorar a sincronização e maturação dos embriões somáticos.

Já os tratamentos com menores desempenhos em termos de amadurecimento consistiram no tratamento 45 g.L<sup>-1</sup> sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> PEG e 45 g.L<sup>-1</sup> sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> PEG, com 1 e 2 *clusters* de embriões somáticos, respectivamente.



**Figura 5.** Germinação de *cluster* de embriões somáticos de *Elaeis* spp. após passagem por diferentes tratamentos de maturação, após três meses de germinação.

A sacarose tem um papel importante e deve estar presente para suprir as necessidades energéticas dos tecidos (THORPE *et al.*, 2008). Além de sua contribuição nutricional durante a embriogênese somática, as fontes de carbono afetam o potencial hídrico do meio, controlando o movimento de água e minerais nos tecidos (NETO; OTONI, 2003; SHOJI *et al.*, 2006).

De fato, a dessecação pode ser usada para aumentar a germinação quando o embrião se aproxima da maturidade fisiológica (ETIENNE *et al.*, 1993). Em alguns casos, a característica marcante dos estágios após o desenvolvimento dos embriões é a dessecação, que exerce um papel na transição entre a maturação embrionária e a germinação (KERMODE, 1990).

Os resultados relatados por Espinoza *et al.* (2018) indicaram que o meio de cultura com alto teor de sacarose promove a maturação somática dos embriões em *Tagetes erecta* L., uma planta herbácea. Observaram ainda que proembriões chegaram na fase de maturação quando reguladores de crescimento foram removidos do meio de cultura e a concentração de sacarose

foi aumentada. A influência positiva da fonte de carbono na produção e crescimento de embriões foi relatada também por outros autores (FREIRE-SEIJO, 2003; OCHATT *et al.*, 2010).

Pesquisas com *Cinnamomum camphora* mostraram que os melhores resultados obtidos para maturação de embriões somático foram com concentrações variando de 20 a 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, enquanto quantidades maiores, 70 a 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionaram diminuição no número médio de embriões somáticos (SHI *et al.* 2009). Resultados obtidos em coníferas mostram que o estresse hídrico provocado por PEG em associação ao ABA no meio de maturação levou à produção de embriões somáticos semelhantes ao embrião zigótico, em termos de conteúdo de água e com melhor habilidade de sobrevivência à dessecação (ATTREE *et al.*, 1991). Li *et al.* (1998), por outro lado, ao estudarem o efeito da maturação em embriões somáticos de *Pinus taeda* L., observaram um efeito superior de PEG em relação à maltose.

Estudos com a palmeira *Phoenix dactylifera* mostraram que o PEG, osmótico não permeante, aumenta a maturação do embrião somático, criando um ambiente de cultura semelhante à dessecação (ZHANG *et al.*, 2007). A adição de PEG, embora possa modificar perfil hídrico do embrião, induzindo o acúmulo de reservas de proteínas (SVOBODOVÁ *et al.*, 1999; SGHAIER-HAMMAMI *et al.*, 2010; HERINGER *et al.*, 2018), inclusive, constatado neste trabalho mediante as análises bioquímicas e histoquímicas (tópico posterior), não proporcionou o aumento do número de embriões somáticos considerados maduros, considerando-se o critério esverdeamento (Fig. 5).

### **5.2.1 Análises bioquímicas – proteínas solúveis totais, morfoanatômicas e histoquímicas**

Conforme as análises bioquímicas, verificou-se que os tratamentos de maturação 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG, 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de PEG e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG, proporcionaram o maior acúmulo de proteínas totais nos embriões somáticos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Teores de proteínas totais ( $\mu\text{g}$  de proteína/mg de matéria fresca) de embriões somáticos de palma de óleo (Genótipo B35-1733) oriundos de diferentes tratamentos de maturação

Sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	PEG ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$\mu\text{g}$ proteína/mg de MF
30	0	$22,6 \pm 9,7$ b
	30	$25,4 \pm 2,9$ b
	45	$49,4 \pm 4,7$ a
45	0	$29,7 \pm 13,9$ b
	30	$49,6 \pm 3,4$ a
	45	$59,8 \pm 2,6$ a

MF = matéria fresca, PEG = Polietilenoglicol. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

Os resultados das análises bioquímicas foram ratificados pelas análises histoquímicas (Fig. 6). Os tratamentos compostos somente por sacarose,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose (Fig. 6D-F), e o tratamento  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose +  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de PEG exibiram uma menor quantidade de reservas proteicas, localizadas especificamente na região distal (haustorial) dos embriões somáticos analisados. Já os demais tratamentos exibiram maior quantidade de reservas proteicas distribuídas ao longo de todo o embrião somático (regiões distal e proximal) (Fig. 6G-I).

Diferentemente dos embriões zigóticos que são envolvidos externamente por um endosperma abundante rico em reservas (MOURA *et al.*, 2019), os embriões somáticos são desprovidos dessa estrutura, e, portanto, dependentes dos compostos nutritivos disponibilizados no meio de cultura e daqueles armazenados, sobretudo, na região haustorial do embrião. Dentre desse contexto, ressalta-se a importância da condução de uma etapa de maturação eficiente, visando o acúmulo de reservas necessárias ao processo germinativo. Segundo Mazri *et al.* (2022), a maturação e germinação de embriões somáticos são consideradas as duas principais etapas envolvidas com a embriogênese somática, e, em muitas espécies, tratam-se de gargalos do processo regenerativo.

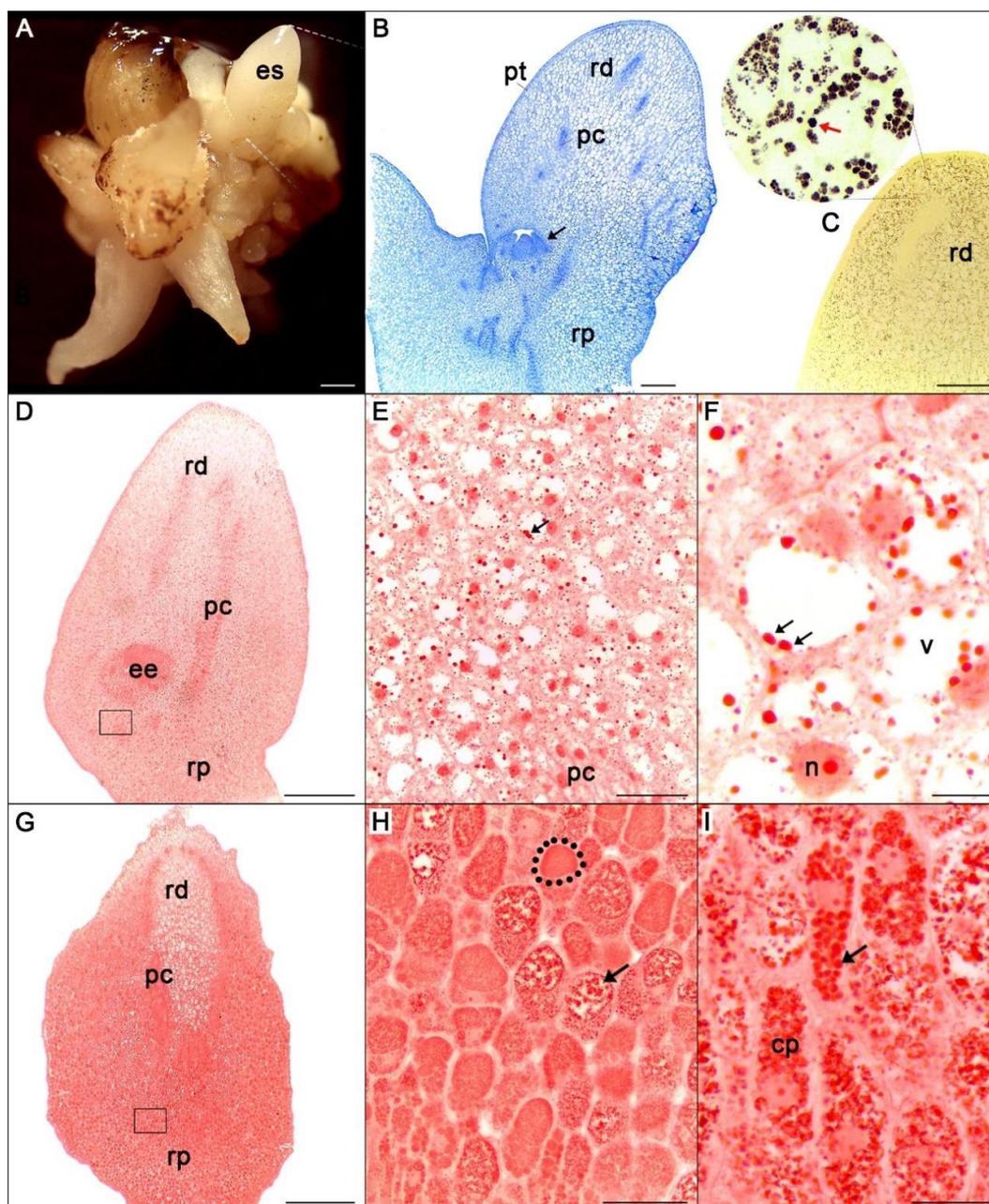
Vale ressaltar, todavia, que são escassos trabalhos em palmeiras que avaliaram o efeito de tratamentos específicos para fins de maturação na indução de modificações na produção de reservas, a exemplo do realizado por Zouine *et al.* (2005) em *P. dactylifera*. Ferreira *et al.* (2022) enfatizam a ausência de padronização dos critérios indicativos de maturação em protocolos de embriogênese somática em palmeiras, o que dificulta a interpretação dos resultados e tomada de decisão. Neste trabalho, constatou-se mediante análises bioquímicas, as quais foram ratificadas por análises histoquímicas (embriões somáticos corados com *Xylidine Ponceau* para identificação de proteínas), um aumento na produção de reservas proteicas nos

embriões somáticos de dendezeiro cultivados em meios de cultivo suplementados com sacarose e PEG (Tabela 1, Fig. 6).

Em palmeiras, há vários relatos da abundância de reservas proteicas em embriões zigóticos (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2020) e, de acordo com Ferreira *et al.* (2020), tais reservas subsidiam o crescimento durante a germinação até que a planta tenha autonomia fotossintética. As proteínas de armazenamento são consideradas as principais fontes de nitrogênio e carbono durante a germinação e posterior crescimento inicial das plântulas (MADAKADZE; SENARATNA, 2000; ELIÁŠOVÁ *et al.*, 2022). Segundo Aberlenc-Bertossi *et al.* (2008), tais compostos, em especial, as proteínas globulinas, geralmente são produzidas em baixas concentrações em embriões somáticos de *E. guineensis*. Essa baixa acumulação provavelmente está relacionada com a ação de proteases não somente durante o processo germinativo, mas também durante a embriogênese. Em concordância com os autores supracitados, Gomes *et al.* (2014) verificaram um declínio expressivo no conteúdo proteico de embriões somáticos de dendezeiro após 150 dias de cultivo *in vitro*.

A deposição de proteínas de armazenamento vem sendo relatada em embriões somáticos para variadas espécies de angiospermas e gimnospermas, incluindo alfafa (LAI *et al.*, 1995), milho (DUNCAN *et al.*, 2003) e abeto branco (MISRA *et al.*, 1993). Porém, a composição e a quantidade de proteínas de armazenamento nem sempre são parecidas entre embriões somáticos e embriões zigóticos com quantidades menores relatadas em embriões somáticos de algodão (SHOEMAKER *et al.*, 1987), alfafa (KROCHKO *et al.*, 1994) e cenoura (DODEMAN *et al.*, 1998).

Além de compostos proteicos, as análises histoquímicas identificaram grãos de amido, mediante uso do reagente Lugol, os quais foram observados, sobretudo, na região distal dos embriões somáticos, independentemente do tratamento de maturação (Fig. 6C). Enfatiza-se que não é comum a acumulação de amido em embriões zigóticos de palmeiras, com alguns relatos em *Syagrus oleracea* (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2019b) e *E. precatória* (FERREIRA *et al.*, 2020). Segundo Eliášová *et al.* (2022), os carboidratos não estruturais possuem um papel multifuncional nos vegetais. Dentre as suas várias funções, mencionam-se ação como agentes osmóticos, fonte de energia e esqueleto de carbono, regulação da expressão gênica, além de papel nas vias de sinalização.



**Figura 6.** Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões somáticos de palma de óleo (Genótipo B35-1733) submetidos a diferentes tratamentos de maturação. **A.** Cluster de embriões somáticos após 30 dias em meio de cultivo suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de Polietilenoglicol (PEG). **B.** Secção longitudinal de embrião somático apresentado na letra A; notar presença de plúmula (seta), células do procâmbio e protoderme. **C.** Embriõesomático com grãos de amido (detalhe lateral – seta) corados com Lugol. **D.** Embrião somático, após 30 dias em meio de cultivo suplementado com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, corado com *Xylidine Ponceau*. **E.** Detalhe do embrião somático apresentado na letra D (retângulo); notar reservas proteicas no interior de vacúolos. **F.** Células com reservas proteicas (setas). **G.** Embrião somático, após 30 dias em meio de cultivo suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de Polietilenoglicol (PEG), corado com *Xylidine Ponceau*. **H.** Detalhe do embrião somático apresentado na letra G (retângulo); notar abundância de reservas proteicas, corpos proteicos esféricos (pontilhado) e corpos proteicos com composição floculada (seta). **I.** Células do procâmbio com reservas proteicas (setas). Abreviações: cp, células do procâmbio, ee, eixo embrionário; es, embrião somático; n, núcleo; pc, procâmbio; pt, protoderme; rd, região distal; rp, região proximal e v, vacúolo. Barras: **A** = 2 mm; **B** = 250 µm; **C** = 200 µm; **D**, **G** = 500 µm; **E**, **H** = 50 µm; **F** = 100 µm e **I** = 20 µm.

Oliveira *et al.* (2013) ressaltam uma possível relação da presença de grãos de amido em embriões zigóticos de algumas palmeiras com o rápido processo de germinação relacionado à recalcitrância. Nesse contexto, salienta-se que *Elaeis guineensis* é considerada uma palmeira semi-recalcitrante (FOURNIÉ, 1994) ou intermediária (ELLIS *et al.*, 1991). Segundo Fournié (1994), proteínas e carboidratos presentes nos embriões zigóticos maduros de dendezeiro exercem a função protetiva durante o processo de desidratação do embrião.

Especificamente em palma de óleo, há um déficit de literatura referente à histoquímica de embriões zigóticos na fase de maturidade fisiológica (ERNAYUNITA *et al.*, 2020). Dentre os poucos trabalhos na espécie, menciona-se Kok *et al.* (2015), os quais identificaram abundância de proteínas no endosperma e embriões zigóticos da espécie, além de polissacarídeos de parede e lipídeos no endosperma. Menciona-se também o trabalho pioneiro de Alang (1988), que investigou a composição, degradação e utilização do endosperma de *E. guineensis* durante o processo germinativo. Conforme esse autor, embriões de dendezeiro armazenam carboidratos insolúveis, lipídeos e proteínas, com destaque, em termos quantitativos, para esse último componente. Segundo Alang (1988), os lipídeos são convertidos em açúcares por glicogênese na região haustorial do embrião.

Os embriões somáticos cultivados em meio de cultivo com apenas 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose, o que é comumente utilizado em protocolos em variadas espécies de palmeiras, apresentaram, tanto bioquimicamente quanto histoquimicamente, uma quantidade pouco expressiva de proteínas de armazenamento (Tabela 1, Fig. 6D-F). Similarmente, Silva-Cardoso *et al.* (2019a), mediante a realização de análises histoquímicas, não identificaram reservas (polissacarídeos e proteínas) em embriões somáticos de *Syagrus oleracea* cultivados em meio de cultivo suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose. Tais autores enfatizaram a importância da otimização da fase de maturação por meio de alterações dos componentes do meio de cultivo, de tal forma, a aumentar a taxa de sucesso do processo germinativo.

Dentre os compostos comumente adicionados ao meio de cultivo visando à maturação de embriões somáticos, menciona-se o Polietilenoglicol (PEG), composto osmótico não plasmolizante, incapaz de penetrar na membrana celular (GAO *et al.*, 2022). Materiais vegetais cultivados em meios suplementados com PEG perdem água, uma vez que, as largas moléculas de PEG não são capazes de atravessar as paredes celulares, o que reduz a pressão de turgor e torna o potencial hídrico intracelular mais negativo (BOZHKOVA; VON ARNOLD, 1998). Esse composto mimetiza as mudanças de osmolaridade que podem ocorrer no ambiente que circunda o embrião na semente, o que resulta, dentre outros efeitos, em modificações na produção de

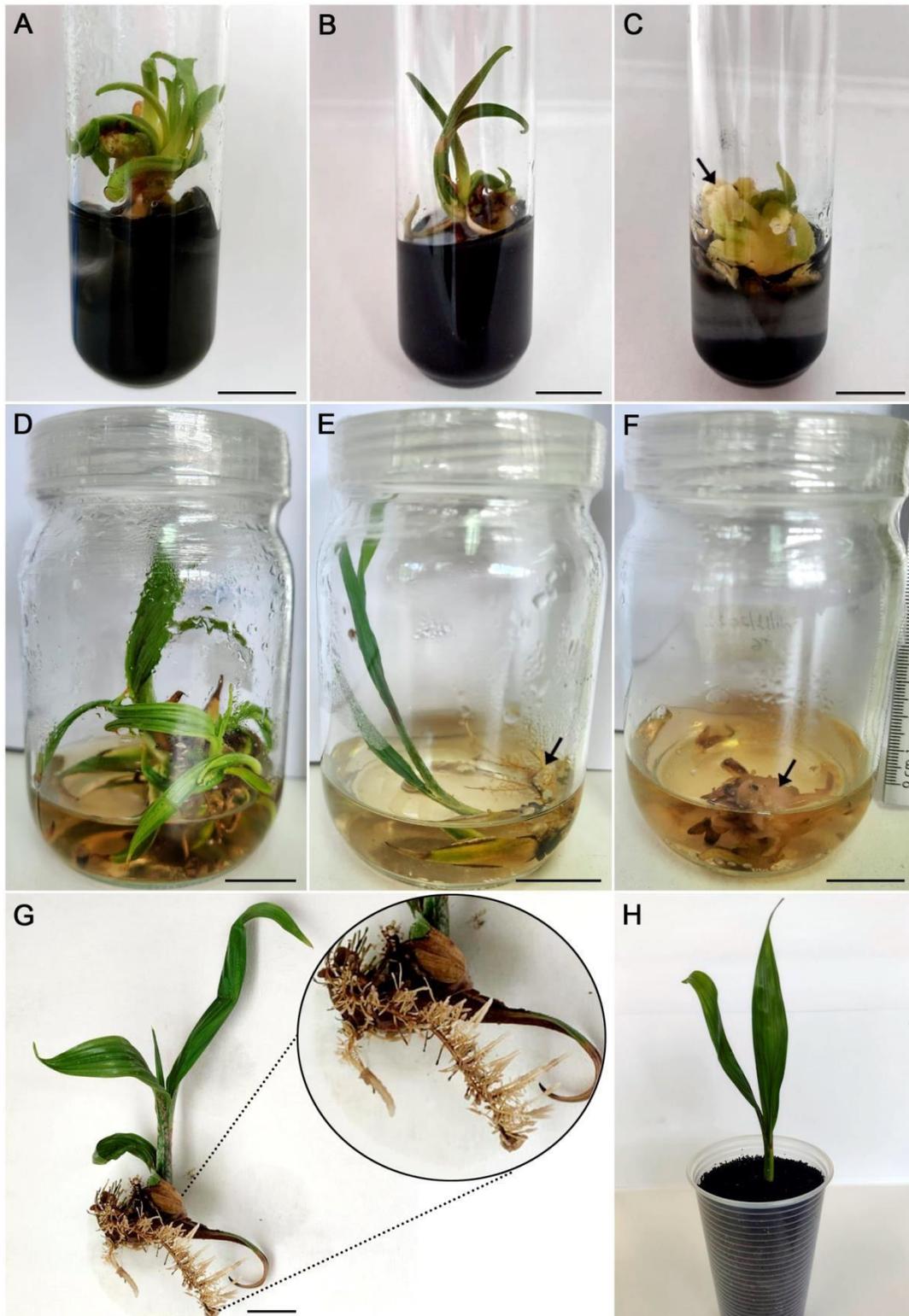
proteínas (MIERA *et al.*, 1993; SVOBODOVÁ *et al.*, 1999; MADAKADZE; SENARATNA, 2000; SGHAIER-HAMMAMI *et al.*, 2010; BUSINGE *et al.*, 2013; HERINGER *et al.*, 2018) e de triglicerídeos (ATTREE *et al.*, 1992).

Ao contrário do esperado, em algumas espécies de plantas, especialmente, em coníferas, o incremento da qualidade dos embriões somáticos tratados com PEG em termos de armazenamento de reservas não, necessariamente, aumenta a taxa de regeneração de plantas. Neste trabalho, a combinação de sacarose e PEG, com 30 e 45 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, embora tenha promovido um incremento na síntese de proteínas (Fig. 6G-I), prejudicou o desenvolvimento dos embriões somáticos, os quais, apresentaram sintomas evidentes de vitrificação (Figs. 4C, E e 7C) e ausência de germinação (Tabela 2).

### 5.3 Germinação de embriões somáticos

Após 30 dias em meio de germinação, observou-se o desenvolvimento da parte aérea e raiz, com plantas completas obtidas (Fig. 7A). Verificou-se um efeito das concentrações sobre o número de embriões germinados, com alguns tratamentos proporcionando a individualização das plantas (Fig. 7B). O número de embriões germinados diminuiu com o aumento das concentrações de PEG, apresentando embriões com sinais vitrificação e escurecidos (Fig. 7C).

Divergindo dos resultados obtidos aqui, Oliveira *et al.* (2022) relataram em seus estudos com jabuticaba (*Plinia cauliflora* Mart.) que não houve diferença nos resultados alcançados nos meios de cultura suplementado com PEG, seja para oxidação ou para sobrevivência. Também foi relatado que não houve conversão de embriões em plantas. Para Motoike *et al.* (2007), porém, a adição de PEG estimulou o desenvolvimento e maturação de embriões somáticos em jabuticaba branca (*Myrciaria aureana*). Bajpai *et al.* (2016) utilizaram para maturação de embriões somáticos de goiabeira (*Psidium guajava*) e obtiveram um número considerável de embriões somáticos cotiledonares. Da mesma maneira, Norgaard (1997) relatou que a adição de PEG ao meio de cultura proporcionou o aumento da taxa de formação de embriões somático de abeto (*Abies*).



**Figura 7.** Caracterização morfológica da germinação de embriões somáticos de palma de óleo (Genótipo B35-1733) oriundos de diferentes tratamentos de maturação. **A, B.** Regeneração de plantas. **C.** Plantas em *cluster* com 60 dias em meio de germinação e após 30 dias em meio de maturação suplementado com  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. **D, E.** Plantas isoladas após 60 dias em meio de germinação e 60 dias em meio de maturação suplementado com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose +  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de PEG. **F.** *Clusters* com embriões somáticos vitrificados (seta) e com áreas escurecidas após 90 dias em meio de maturação suplementado com  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose +  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de PEG. **G.** Plantas com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos oriundas do meio com  $45 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. **H.** Plantas aclimatizadas Barras: **A-C** = 1 cm e **D-F** = 2 cm.

Com relação ao percentual de germinação (Tabela 2), maior taxa foi verificada á partir de plantas oriundas do tratamento 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com valor médio de 4 plantas por recipiente. Já com relação ao enraizamento, não se verificou diferença entre os tratamentos de maturação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de embriões somáticos por *cluster* em palma de óleo (Genótipo B351733) com emissão de parte aérea e/ou raiz oriundos de diferentes tratamentos de maturação

Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	PEG (g.L <sup>-1</sup> )	Emissão de parte aérea	Emissão de raiz
30	0	1,4 ± 0,5 b	0,4 ± 0,4 a
	30	1,2 ± 0,4 b	0,4 ± 0,4 a
	45	0,4 ± 0,2 b	0,0 ± 0,0 a
45	0	4,0 ± 1,3 a	0,8 ± 0,8 a
	30	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 a
	45	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 a

Abreviação: PEG = Polietilenoglicol. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Média ± erro padrão.

A maior emissão de parte aérea proporcionada pelo tratamento de maturação 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Fases de estresse como a desidratação sofrida pelo explante durante o cultivo in vitro, podem promover aumento nos índices de indução, maturação e na germinação de embriões somáticos (IKEDA-IWAI *et al.*, 2003). Troch *et al.* (2009), alegam que o tipo e a concentração de carboidratos no meio de cultura são fatores que afetam expressivamente a maturação e conversão de embriões somáticos em *Aesculus hippocastanum*.

Embora os tratamentos 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG, 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 30 g.L<sup>-1</sup> de PEG e 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 45 g.L<sup>-1</sup> de PEG tenham proporcionado incremento significativo no conteúdo proteico dos embriões somáticos de *Elaeis* spp. (Tabela 1, Fig. 6), esses tratamentos prejudicaram a emissão dos meristemas (Tabela 2).

Segundo Korbes e Droste (2005) e Iraki *et al.* (1989), o PEG foi responsável pela redução no tamanho dos embriões devido ao decréscimo da razão celulose:hemicelulose na parede celular. Resultando no decréscimo da elasticidade da parede celular e na redução da habilidade de expansão celular. Tais autores levantaram hipóteses para explicar esse efeito: i) possível ocorrência de danos nas membranas devido ao elevado turgor e consequente rápido influxo de água dos embriões somáticos para o meio de germinação, ii) redução do transporte de água a partir da raiz para o meristema apical caulinar e iii) redução no tamanho dos embriões

somáticos e indução de anormalidades no sistema radicular (presença de células vacuoladas). Em termos comparativos com a sacarose, Linossier *et al.* (1997) ressaltam que o PEG, dado o seu alto peso molecular, não penetra nas células e, dessa forma, não é metabolizado, diferentemente da sacarose que se configura como uma fonte de carbono. Businge *et al.* (2013), similarmente, reportaram, em *Picea abies*, que a suplementação do meio de cultura com 30 g.L<sup>-1</sup> de maltose e 75 g.L<sup>-1</sup> de PEG, embora tenha promovido maturação dos embriões somáticos, não incrementou a frequência de germinação.

O surgimento de embriões somáticos com aspecto vitrificado foi observado neste trabalho, especialmente nos tratamentos com adição de PEG (Figs. 4C, E; 7C). A vitrificação ou hiperhidricidade é um descontrole fisiológico ocasionado por difusão passiva de água do meio ou pode ocorrer por outros distúrbios metabólicos (PAQUES, 1991). Também pode ser causado pela presença de concentração alta de amônio, o tipo e concentração de agente gelificante, crescimento e desenvolvimento de plantas em desequilíbrio, nível de umidade alto e gases como o etileno dentro do tubo de cultura (ALKHATEEB, 2008; ADEYEMI *et al.*, 2012). Os tecidos que sofre esse processo de vitrificados tem como característica serem rígidos, espessos e quebráveis (LESHEM, 1983; SHARMA e MOHAN, 2006).

A hiperhidricidade é uma anomalia comum do cultivo *in vitro* de tecidos vegetais e que apesar de ser possível ocorrer reversão desse estado, após transferência para meio ou ambiente não vitrificante (KERVERS *et al.*, 2004), também pode evoluir e levar à perda de competência dos tecidos (CAMARA e WILLADINO, 2007).

A adição de PEG no meio de maturação foi essencial para a conversão dos embriões somáticos em plântulas em espécies como em pinheiro-do-canadá (*Picea glauca*) (STASOLLA *et al.*, 2003; BELMONTE *et al.*, 2005), castanheiro da índia (*Aesculus hippocastanum*) (TROCH *et al.*, 2009) e café (*Coffea arabica*) (ALMEIDA, 2022).

Em relação ao número de raízes, os embriões que apresentaram as melhores respostas foram oriundos do tratamento com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Porém, a baixa taxa de emissão de raiz observada neste trabalho (Tabela 2) diverge com o descrito por Kerdsuwan e Te Chato (2015), observaram a formação de raízes no explante durante a indução da embriogênese somática. Segundo Zamzuri (1998) e Abahmane (2011), a qualidade do enraizamento *in vitro* pode ser influenciada pelo genótipo e pelo tipo e concentração de auxina adicionada ao meio de cultivo, explicando assim as respostas fisiológicas diferenciais em plântulas da mesma espécie.

Em estudo com *Hevea brasiliensis* utilizando diferentes concentrações de PEG (10, 15 e 20 g.L<sup>-1</sup>), mostraram que a maioria dos embriões maduros (70%) apresentaram morfologia

normal com raízes e ápice, já os outros 30% mostraram anormalidades com deformações, únicas ou cotilédones fundidos. (KALA *et al.*, 2015).

#### 5.4 Aclimatização de plantas

Em relação à fase de aclimatização das plantas de palma de óleo regeneradas, verificou-se que após o processo de enraizamento *in vitro* das brotações (Figura 7-H), houve sobrevivência das plantas aclimatizadas.

Plantas cultivadas *in vitro* podem facilmente perder umidade e murchar quando transferidas para condições *ex vitro*. Assim, essas mudas precisam de várias semanas sob sombra e submetidas a uma diminuição gradual da umidade do ar para correção da fisiologia que foi induzida por condições especiais de cultura *in vitro* (POSPISILOVA *et al.*, 2007; ASAYESH *et al.*, 2017). Portanto, mais estudos são necessários para a melhor compreensão da aclimatização de plantas submetidas a esse protocolo de maturação.

### 6- CONCLUSÕES

- Calos embriogênicos de palma de óleo (Genótipo B35-1733) podem ser estabelecidos e multiplicados em meio líquido específico sem a perda do potencial embriogênico por vários anos.
- O tratamento com 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi o que proporcionou a maior taxa de embriões somáticos regenerados em palma de óleo (Genótipo B35-1733) na fase de maturação e em menor tempo de resposta.
- As análises morfoanatômicas e bioquímicas foram importantes para se determinar a quantidade de proteínas armazenadas nos embriões somáticos após a etapa de dematuração.
- Maiores concentrações de PEG acarretam embriões hiperhídricos e oxidados, com baixa taxa de germinação e enraizamento em palma de óleo (Genótipo B35-1733).
- O protocolo desenvolvido é considerado eficiente para a produção em larga-escala de mudas de palma de óleo, embora melhorias em etapas sempre serão necessárias para otimizar a produção de mudas de alta qualidade genética.

## REFERÊNCIAS

- ABERLENC-BERTOSSI, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; TREGGAR, J. Contrasting globulin and cysteine proteinase gene expression patterns reveal fundamental developmental differences between zygotic and somatic embryos of oil palm. **Tree Physiology**, v. 28, n. 8, p. 1157-1167, 2008.
- ADAM, H.; JOUANNIC, S., ESCOUTE, J.; DUVAL, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGGAR, J. W. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). **American Journal of Botany**, v. 92, n. 11, p. 1836-1852, 2005.
- AGROPALMA, 2014. Disponível em: < <http://www.agropalma.com.br/> >. Acesso em: 22 de Janeiro de 2023.
- AHMADI, B.; SHARIATPANAH, M. E.; SILVA, J. A. T. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscísico acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus L.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, p. 343-351, 2014.
- AIDUN, C. K. Separator Device, Deposition Device, and System for Handling of Somatic Embryos. U.S. Patent No: US 10,004,189 B2. Washington, DC: U.S. **Patent and Trademark Office**, 2018.
- AL SHAMARI, M.; RIHAN, H. Z.; FULLER, M. P. An Effective Protocol for the Production of Primary and Secondary Somatic Embryos in Cauliflower (*Brassica oleraceae Var Botrytis*). **Agri Res & Tech: Open Access J**, v. 14, 2018.
- ALANG, Z. C.; MOIR, G. F. J.; JONES, L. H. Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*). **Annals of Botany**, v. 61, n. 2, p. 261-268, 1988.
- ALKHATEEB, A. A. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera L.*) cv. Sukary in response to sucrose and polyethylene glycol. **Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 466-470, 2006.

ALMEIDA, J. A. S.; NEOFTI, W. C. F.; GIOMO, G. S. Osmotic potential intensity in the control of direct somatic embryogenesis in *coffee tree*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 57, 2022.

ALMEIDA, M. **Emprego da cultura in vitro para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. p. 79, Tese (Doutorado em Botânica), São Paulo: USP. 1994.

ALMEIDA, R. F.; MEIRA, F. S.; GOMES, H. T.; BALZON, T. A.; BARTOS, P. M. C.; OLIVEIRA M. R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. *Pisifera*) from immature leaf tissues. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 229-239, 2020.

ALMEIDA, R. F.; SANTOS, I. R.; MEIRA, F. S.; GRYNBERG, P.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MEHTA, A. Differential protein profiles in interspecific hybrids between *Elaeis oleifera* and *E. guineensis* with contrasting responses to somatic embryogenesis competence acquisition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, p. 11-21, 2019.

ALVORADO, A.; STERLING, F. Seasonal Variation in the Oil Extraction Rate in Oil Palm. **ASD Oil Palm Papers**, n. 17, p. 20-30, 1998.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 174-180, 2000.

ANTONINI, J. C. A.; OLIVEIRA, A. D. Potencial de cultivo da palma de óleo irrigada nas condições do Cerrado. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2021.

ARAÚJO, P.; PAULA, D. M. T.; COLARES, L.; ARAÚJO, J. M. F.; QUOIRIN, M.; QUISEN, R. Cultura in vitro como ferramenta no melhoramento genético e na propagação do dendezeiro. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL BIOENERGIA, 5. Anais**. Curitiba: REMADE, 2010.

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEZAL, K.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 108, p. 1-16, 2012.

ASAYESH, Z.M.; VAHDATI, K.; ALINIAEIFARD, S.; ASKARI, N. Enhancement of *ex vitro* acclimation of walnut plantlets through modification of stomatal characteristics *in vitro*. **Sci. Hortic.** n. 220, p. 114–121, 2017.

ATTREE, S. M.; BUDIMIR, S.; FOWKE, L.C. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). **Can. J. Bot.** v.68, p.30- 34. 1992.

ATTREE, S. M.; POMEROY, M. K.; FOWKE, L. C. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. **Planta**, v. 187, p. 395-404, 1992.

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

BAIRU, M.W.; AREMU, A.Q.; STADEN, J.V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v.63, p.147-173, 2011.

BAJPAI, A., KALIM, S., CHANDRA, R., & KAMLE, M. Recurrent somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Psidium guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

BALICK, M.J.; BEK, H.T. Useful palms of the world: a synoptic bibliography. 1990.

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 49, n. 1, p. 41-50, 2013.

BARCELOS, E.; NUNES, C. D. M.; CUNHA, R. D. Melhoramento genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro. In: Viégas IJM, Muller AA (eds) cultura dendezeiro na

Amazônia brasileira. **Embrapa Amazônia Oriental/Embrapa Amazônia Ocidental**, Belém, p. 145 –174, 2000.

BARCELOS, E.; AMBLARD, P.; BERTHAUD, J.; SEGUIN, M. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.37: p. 1105–1114, 2002.

BARI, R.; JONES, J.D.G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, v. 69, p. 473-488, 2009.

BELMONTE, M. F.; DONALD, G.; REID, D. M.; YEUNG, E. C.; STASOLLA, C. Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*). **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2355-64, 2005.

BENSON, A. A. Plant membrane lipids. **Annual Review of Plant Biology**, v.15, p.1-16, 1964.

BEWLEY, J.D; BLACK, M. Seeds – Physiology of Development and Germination (2nd Ed.). **Plenum Press**, New York. 1994.

BOMFIM, J. P. D. A.; LIMA, L. P. D.; MELO, C. A. F. D.; CORRÊA, R. X.; GAIOTTO, F. A.; & BARBOSA, A. M. M. Otimização da extração e amplificação de DNA de dendezeiro: folhas em diferentes fases de desenvolvimento. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 916-926, 2020.

BOZHKOVA, P.V.; VON ARNOLD, S. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 211-224, 1998.

BRADAÏ, F.; PLIEGO-ALFARO, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on phenotypic stability. **Scientia Horticulturae**, v. 213, p. 208-215, 2016.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Decreto nº 7.172/2010. **Zoneamento agroecológico do dendê para as áreas desmatadas da Amazônia Legal (ZAE–Dendê)**. Brasília, DF, 2010.

BRAZILIO, M., BISTACHIO, N. J., CILLOS S. V., & NASCIMENTO, D. D. O Dendezeiro (*Elaeis guineensis Jacq.*)-Revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos** v. 2, n. 1, p. 27-45, 2012.

BRETON, D.; HARVENGT, L.; TRONTIN, J. F.; BOUVET, A.; FAVRE, J. M. Long-term subculture randomly affects morphology and subsequent maturation of early somatic embryos in maritime pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 87, p. 95-108, 2006.

BUSINGE, E.; BYGDELL, J.; WINGSLE, G.; MORITZ, T.; EGERTSDOTTER, U. The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, v. 149, n. 2, p. 273-85, 2013.

CAI, L.; FU, L.; JI, L. Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. **GM Crops & Food**, v. 2, p. 110-117, 2011.

CAMILLO, J. **Diversidade genética, conservação in vitro de germoplasma e análise do conteúdo de DNA nuclear em palma de óleo {*Elaeis guineensis* Jacq. e *Elaeis oleifera* (Kunth) Córtes}**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Tese de doutorado. 137 p. 2012.

CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 211-215, 2009.

CAMPOS, S. S. D. Embriogênese somática em *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick: descrição anatômica, histoquímica e identificação de uma sequência parcial do gene serk, 2018.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; SILVEIRA, V.; CAPRESTANO, C. A.; FLOH, E. I. GUERRA, M.P. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic

embryogenesis of *Acca sellowiana*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 50, p. 166-175, 2014.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; MALDONADO, S. B.; GUERRA, M. P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 217-224, 2009.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M.P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 24, p. 33–40, 2004.

CARVALHO, A.O.; GOMES, V.M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology - **A concise review**. *Peptides*, v. 28, p. 1144-1153, 2007.

CARVALHO, A.R.V.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. O Dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Documentos**, v. 138, p. 25, 2001.

CHAPMAN, K.D.; DYER, J. M.; MULLEN, R.T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. **Journal of Lipid Research**, v. 53, p. 215-226, 2012.

TEIXEIRA, J. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Ed. Luis Pedro Barrueto Cid. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1, 1998.

CHINCHILLA, C. The many faces of spear rots in oil palm: the need for an integrated management approach. **ASD Oil Palm Papers**, n. 32, p.1–25, 2008.

CHOO, Y.; NESARETNAM, K. Research advancements in palm oil nutrition. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 10, p. 1301-1315, 2014.

CID, L.P.B.; TEIXEIRA, J.B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L.P.B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa. p. 15-49, 2014.

COCHARD, B.; ADON, B.; REKIMA, S.; BILLOTTE, N.; CHENON, R. D.; KOUTOU, A.; NOUY, B.; OMORÉ, A.; PURBA, A. R.; GLAZSMAN, J. C.; NOYER, J. L. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. **Tree Genetics and Genomes**, v. 5, p. 493-504, 2009.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. H. B. Diseases of the oil palm. **The Oil Palm**, 5th edition. Chichester: Wiley Blackwell, p. 399-437, 2016.

CORRÊA, T. R.; MOTOIKE, S. Y.; COSER, S. M.; SILVEIRA, G.; RESENDE, M. D. V.; CHIA, G. S. Estimation of genetic parameters for in vitro oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil yield. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 1033-1038, 2015.

CORREIA, A. A.; VERÍSSIMO, P.; CANHOTO, J. Somatic Embryogenesis in Broad-Leaf Woody Plants: What We Can Learn from Proteomics. In: Germana M, Lambardi M (eds) **Methods in Molecular Biology**. **Humana Press**, New York, p. 117–129, 2016.

COSTA, A. F. Farmacognosia. 2. ed. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**. v. 3. p. 1032, 1982.

COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; P, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N6 - Benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28(2): p. 280-283, 2006.

CRUZ, K. Z. C. M.; ALMEIDA, F. A.; VALE, E. M.; BOTINI, N.; VETTORAZI, R. G.; SANTOS, R. C.; SILVEIRA, V. PEG induces maturation of somatic embryos of *Passiflora edulis* Sims ‘UENF Rio Dourado’ by differential accumulation of proteins and modulation of endogenous contents of free polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 150, n. 3, 527-541, 2022.

CUI, J.; LAMADE, E.; TCHERKEZ, G. Seed Germination in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): A Review of Metabolic Pathways and Control Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4227, 2020.

CUNHA, R. D.; LOPES, R.; ROCHA, R. D.; LIMA, W. D.; TEIXEIRA, P. C.; BARCELOS, E.; RIOS, S. D. A. Domestication and Breeding of the American oil palm. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.; Noda, H. orgs. **Domestication and Breeding - Amazon Species**. Ied.Viçosa, MG: Suprema Editora LTDA v.14: p.275-296, 2012

ARAÚJO S. C. I. M.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Cellular responses of oil palm genotypes during somatic embryogenesis involve participation of procambial cells, DNA demethylation, and auxin accumulation. **Plant Cell Reports**, v. 41, n. 9, p. 1875-1893, 2022.

CARVALHO, S. R; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v. 72, n. 1, p. 67-80, 2014.

DEBNATH, S. C. Temporary immersion and stationary bioreactors for mass propagation of true-to-type highbush, half-high, and hybrid blueberries (*Vaccinium spp.*). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Abingdon, v.92, n.1, p.72-80, 2017.

DIAS, D. S.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; MELO, G. A.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Haustorium–endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (*Arecaceae*) seeds. **Annals of Botany**, v. 122, p. 267-277, 2018.

DIAS, G. P.; MAZZOTTINI, S. H. C.; RIBEIRO, L. M.; NUNES, Y. R. F.; BRAGANÇA, G. P. P.; ISAIAS, R. M. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O. Reserve mobilization dynamics and degradation pattern of mannan-rich cell walls in the recalcitrant seed of *Mauritia flexuosa* (*Arecaceae*), **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 445-460, 2020.

DRANSFIELD, J.; ANDN, W. U. H. L. *Palmae*. In K. Kubitzki [ed.], Families and genera of vascular plants, flowering plants: monocotyledons, **Springer-Verlag**, Berlin, Germany. vol. 4, p. 306–389. 1998.

DURAN, N.; ORTIZ, R. A. Efeito de algumas propriedades físicas do solo e da precipitação sobre a produção de dendê. **Agronomia Mesoamérica**, v. 6, p. 7-14, 1995.

DUSSERT, S.; GUERIN, C.; ANDERSSON, M.; JOËT, T.; TRANBARGER, T. J.; PIZOT, M.; SARAH, G.; OMORE, A.; DURAND-GASSELIN, T.; MORCILLO, F. Comparative transcriptome analysis of three oil palm fruit and seed tissues that differ in oil content and fatty acid composition. **Plant Physiology**, v. 162, p. 1337-1358, 2013.

EGERTSDOTTER, U.; AHMAD, I.; CLAPHAMI, D. Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 109, 2019.

EL, F. A.; EL, B.; AIT, A. N.; MSANDA, F.; SERGHINI, A. M.; EL MOUSADIK, A. *In Vitro* Propagation of Three Moroccan Prickly Pear Cactus *Opuntia* and Plant Establishment in Soil. **Not Sci Biol**, v. 5, n. 1, p. 39-44, 2013.

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, p. 631- 642, 2013.

ELIÁŠOVÁ, K.; KONRÁDOVÁ, H.; DOBREV, P.I.; MOTYKA, V.; LOMENECH, A. M.; FISCHEROVÁ, L.; LELU-WALTER, M. A.; VONDRÁKOVÁ, Z.; TEYSSIER, C. Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. 823617, 2022.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H.; SOETISNA, U. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. **Seed Science Research**, v. 1, p. 99-104, 1991.

ELMEER, K. E. S. Factors regulating somatic embryogenesis in plants. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M. P. (Eds.) Somatic embryogenesis and gene expression. **New Delhi: Narosa Publishing House**, p. 56-81, 2013.

EMONS, A. M. C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, Stuttgart, v. 41, n. 1, p. 1-14, 1994.

ERNAYUNITA; TARYONO; YUDONO, P. Histochemistry of backcross 1 of oil palm seeds at different storage periods. **Ilmu Pertanian (Agricultural Science)**, v. 5, n. 1, p. 52-57, 2020.

ESPINOZA, P. E. V.; BENÍTEZ, G. I.; PERALTA, A. L. L.; PAREDES, L. O.; Del Villar, M. A. A. Somatic embryogenesis from leaf explants of *Tagetes erecta* L. **Plant Biotechnology**, 34(4), p. 187-192, 2018.

ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORRO, P.; MIRGINIAE, E.; CARRON, M. P. Comparison of endogenous ABA and IAA in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis* Mull.Arg. during ontogenesis. **Plant Science**, 92: p. 111-119, 1993.

FAISAL, M.; ABDEL, S. E. M.; ALATAR, A. A.; QAHTAN, A. A. Induction of somatic embryogenesis in *Brassica juncea* L. and analysis of regenerants using ISSR-PCR and flow cytometer. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 28(1), p. 1147-1153, 2021.

FEDEPALMA. Guia ambiental de la agroindustria de la palma de aceite em Colombia. **Relatório Técnico**. Bogotá, p. 75, 2010.

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

FERREIRA, M. A. C.; RIBEIRO, L. M.; MAZZOTTINI, S. H. C.; MERCADANTE, S. M. O.; NUNES, Y. R. F. Cytological and histochemical evaluations reveal roles of the cotyledonary petiole in the germination and seedling development of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Protoplasma**, v. 256, p. 1299-1316, 2019.

FERREIRA, C. B. B.; LOPES, M. T. G. LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MOREIRA, D. A.; BARROS, W. S.; MATIELLO, R. R. Diversidade genética molecular de progênies de dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.378-384, 2012.

FERREIRA, C. D.; SILVA-CARDOSO, I. M. D.; FERREIRA, J. C. B.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morphostructural and histochemical dynamics of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) germination. **Journal of Plant Research**, v. 133, p. 693-713, 2020.

FERREIRA, J. C. B.; ARAÚJO, S. C. I. M.; OLIVEIRA, M. R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 148(3), p. 667-686, 2022.

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA-SCHERWINSKI, J. E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 2022.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Brasília: EMBRAPA-CENARGEN**, Ed. 3. p. 220, 1998.

FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, J. M. G.; PEDRO, L. M. G.; ASCENSÃO, L. Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos. **Cell. Res**, v. 11, p. 640-643, 2007.

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

FOURNIÉ, F. Etude de la maturation des embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.): Protéines de réserve et facteurs intervenant dans la tolérance à la dessiccation. **Master’s Thesis, Université des sciences et techniques du Languedoc**, Montpellier, France, 1994.

FREIRE-SEIJO, M. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. **Biotech Veg** v. 3: p. 195–209, 2003.

FURLAN, J. J. Dendê: manejo e uso dos subprodutos e dos resíduos. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, Documento 246, p. 37, 2006.

GAO, Y.; CHEN, X.; CUI, Y.; ZHAO, H.; ZHAO, R.; LIU, C.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; KONG, L. Effects of medium supplements on somatic embryo maturation and dna methylation in *Pseudotsuga gaussenii* Flous, a Species under Protection. **Forests**, v. 13, n. 288, 2022.

GARCIA, C.; FURTADO A.; A. A.; COSTA, M., BRITO, D.; VALLE, R., ROYAERT, S.; MARELLI, J. P. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, p. 193-212, 2019.

GIBSON, S. I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.93-102, 2005.

GLIMN-LACY, J.; KAUFIMAN, P. B. Plant family (*Arecaceae*). In: Botany Illustrated – Introduction to plants, major groups, flowering plant families. p. 125–126, 2006.

GOGOI, G.; BORUA, P. K. Standardization parameters for critical problems encountered in plant *in vitro* culture technique. **Int. J. Curr. Res.**, v. 6, n. 12, p. 10964-10973, 2014.

GOH, D. K. S.; BON, M.-C.; ALIOTTI, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE, N.; MONTEUUIS, O. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, p. 375-381, 2001.

GOMES, H. T. **Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária.** 2016. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; MARTINS, A. E.; OLIVEIRA, S. O. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Assessment of mint (*Mentha spp.*) species for large-scale

production of plantlets by micropropagation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37(4), p. 405-410, 2015.

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

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

GÓMEZ-CADENAS, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F. R.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. **Planta**, v. 210, p. 636-643, 2000.

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

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres A.C., Caldas L.S., Buso, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-CBAB**. v. (2), p. 533-568, 1999.

GUTBROD, P.; REICHERT, S.; GUTBROD, K.; HAMAI, A.; BRÉHÉLIN, C.; NGANDO-EBONGUE, G; DÖRMANN, P. Fatty acid isoprenoid alcohol ester synthesis in fruits of the African Oil Palm (*Elaeis guineensis*). **Phytochemistry**, v.185, n. 112684, 2021.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v. 28, p. 74-81, 1978.

HARWOOD, J.; MOORE, J. R. T. S. Lipid metabolism in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 8, p. 1-43, 1989.

HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; KRUEGER, S. Amino acids – A life between metabolism and signaling. **Plant Science**, v.229, p.225-237, 2014.

HENDERSON, J., OSBORNE, D. J. The oil palm in all our lives: how this came about. **Endeavour**, v. 24(2), p. 63–68. 2000.

HERINGER, A. S.; STEINMACHER, D. A.; FRAGA, H. P.; VIEIRA, L. N.; MONTAGNA, T.; QUINGA, L. A.; GUERRA, M. P. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes Kunth*) using RITA® temporary immersion system. **Sci Hortic** v. 179, p. 284–292, 2014.

HERINGER, A. S.; VALE, E. M.; BARROSO, T.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 2, p. 116-124, 2013.

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

IKEDA, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 34(1), p. 107-114, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE (SIDRA) disponível em: Acesso em set. 2022.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; MURALI, M. N.; Mandal, P. K. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **Springerplus**, n. 4, p. 256, 2015.

JI, L.; MATHIONI, S. M.; JOHNSON, S.; TUCKER, D.; BEWICK, A. J.; KIM, K. SCHMITZ, R. J. Genome-wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. **The Plant Cell**, v. 31(10), p. 2315-2331, 2019.

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

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

KALA, R. G.; TISHA, L.T.; SOBHA, S.; JAYASREE, R.; L. P.THULASEEDHARAN, A. Somatic embryo germination in *Hevea brasiliensis*: Effect of embryo desiccation, phytohormones and phloroglucinol. **Rubber Science**, v. 28(1), p. 52-61, 2015.

KAMLE M, BAEK K.H. Somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava L.*): current status and future perspectives. **Plant microtechnique**. 3 Biotech, v. 7: p. 1–11, 2017.

KARNOVSKY, M. J. A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KERMODE A. R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **CRC Critical Review of Plant Science**, 9: p. 155–195, 1990.

KERVERS, O. Implications for Governments of International Cooperation and Assistance Provisions. In: The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention. **Springer**, Dordrecht. p. 233-242, 2004.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, n. 2, p. 181-191, 2004.

KHAW C.H.; NG S.K.; DREW R.A. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) plantings in Malaysia. In: **International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Part 2** v. 461. p. 251-258, 1998.

KOK, S.; MEILINA, O. A. E. C.; PARAMESWARI, N. A histological study of oil palm (*Elaeis guineensis*) endospermas during seed development. **Journal of Oil Palm Research**, v. 27, n. 2, p. 107-112, 2015.

KONAN, K. E.; DURANT-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 1-13, 2010.

KONAN, K. E.; DURAN-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; RIVAL, A. A modeling approach of the *in vitro* of palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v.84, p.99–112. 2006.

KONG, L.; YEUNG, E.; C. Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. **Physiologia Plantarum**, v. 93, n. 2, p. 298-304, 1995

KÖRBES, A.P.; DROSTE, A. Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. **Plant Physiology, Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, n. 3, 2005.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŇIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v.74, p.1301- 1322, 2011.

KOUFAN, M; BELKOURA, I; MAZRI, M. A. *In Vitro* Propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.): A Review. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 737, 2022.

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

KSHIRSAGAR, P. R.; CHAVAN, J. J.; UMDALE, S. D.; NIMBALKAR, M. S.; DIXIT, G. B.; GAIKWAD, N. B. Highly efficient *in vitro* regeneration, establishment of callus and cell suspension cultures and RAPD analysis of regenerants of *Swertia* Burkill. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 79-84, 2015.

KUMAR, S. P.; KUMARI, B. D. R. Factors Affecting on Somatic Embryogenesis of Safflower (*Carthamus tinctorius* L) at Morphological and Biochemical Levels. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.7, p.197-205, 2011.

LAKSHMANAN, P. Invited review addendum: Somatic embryogenesis in sugarcane – an addendum to the invited review “Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities,” **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** v. 41(4): p. 345–363; 2005.

LEITMAN, P.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R. C.; SOARES, K. Arecaceae in Lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015.

LELJAK-LEVANIĆ, D.; MIHALJEVIĆ, S.; BAUER, N. Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, n. 7, p. 1-14, 2015.

LEPRINCE, O.; PELLIZZARO, A.; BERRIRI, S.; BUITINK, J. Late seed maturation: drying without dying. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 4, p 827–841, 2017.

LINACERO, R.; LÓPEZ-BILBAO, M. G.; VÁSQUEZ, A. M. Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis (*Saccharum officinarum*). **Protoplasma**, v. 1, p. 199-204, 2001.

LINOSSIER, L.; VEISSEIREF, P.; CAILLOUX, F.; COUDRET, A. Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. **Plant Science**, v. 124, n. 2, p. 183-19, 1997.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis improvement. **World J Microbiol Biotechnol**, v.11: p. 416–425, 1995.

LOPES, J. M.; SAMPAIO, J. R. T.. Produção de biodiesel a partir da palma de óleo. **Cadernos de Ciências Sociais Aplicadas**, p. 23-36, 2020.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; AVILEZ, M. J. R.; AVILÉS, M. R. N.; MARQUEZ, L. R.; GALAZ, A. R.; MELLADO, M. E. “Somatic embryogenesis in *Coffea* spp,” in Somatic

Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications, eds V. M. Loyola-vargas and N. Ochoa-Alejo. **Springer International Publishing**, p. 297–318, 2016.

LOW, E. L.; ALIAS, H.; BOON, S.; SHARIFF, E. M.; TAN, C. A.; OOI, L. C. L.; CHEAH, S. RAHA, A.; WAN, K.; SINGH, R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology**, v.8, p.1-19, 2008.

LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. B.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.209-215, 2010.

MADAKADZE, R.; SENARATNA, T. Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium × hortorum*) somatic embryos. **Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 55-60, 2000.

MARASCHIN, S.F.; DE PRIESTER, W.; SPAINK, H.P.; WANG, M. Androgenic switch: An example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. **J. Exp. Bot.**, n. 56, p. 1711–1726, 2005.

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

MATSUMOTO, K. Cultura de células em suspensão: focalizando a bananeira. **EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa**, Brasília, v. 126. p. 24, 2006.

MAZAREIA, M.; AL-AHMADA, H.; RUDIS, M. R.; JOYCE, B. L.; C. STEWART JR, C. N. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cell suspension cultures: Establishment, characterization, and application. **Plant Science**, v. 181, p.712-715, 2011.

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

MAZRI, M. A., MEZIANI, R.; BELKOURA, I.; MOKHLESS, B.; NOUR, S. Uma via combinada de organogênese e embriogênese somática para uma propagação eficiente em larga escala em tamareira (*Phoenix dactylifera L.*) cv. 'Mejhoul'. **3 Biotech** v. 8(4): p. 215, 2018.

MAZRI, M. A.; MEZIANI, R. E.; FADILE, J.; EZZINBI, A. Optimization of medium composition for *in vitro* shoot proliferation and growth of date palm cv. **Mejhoul**. **3 Biotech** v. 6: p. 111, 2016.

MAZRI, M. A.; MEZIANI, R.; BELKOURA, I.; ELMAATAOUI, S.; MOKHLESS, B.; NOUR, S. Maturation and germination of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) somatic embryos. **Not Sci Biol**, v. 11, n. 1, p. 86-93, 2019.

MAZZOTTINI, S. H. C.; RIBEIRO, L.M.; OLIVEIRA, D. M. T. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata (Arecaceae)*: dynamics of reserve mobilization and accumulation. **Protoplasma**, v. 254, p. 1563-1578, 2017.

MEDEIROS, E. C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de café Conilon. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 540-543, 2007.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: *In vitro* embryogenesis in plants. **Springer**, Dordrecht. p. 155-203, 1995.

MEZIANI, R.; JAITI, F.; MAZRI, M. A.; HASSANI, A.; BEN, S.; ALEM, C. Organogenesis of *Phoenix dactylifera L.* cv. 'Mejhoul': Influences of natural and synthetic compounds on tissue browning, and analysis of protein concentrations and peroxidase activity in explants. **Scientia Horticulturae** v. 204: p. 145-152, 2016.

MICHAUX-FERRIÈRE, N.; GROUT, H.; CARRON, M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in hevea brasiliensis (*euphorbiaceae*). **American Journal of Botany**, v. 79, n. 2, p. 174-180, 1992.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 28, p. 299-329, 1977.

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

MISRA, S.; ATTREE, S.M.; LEAL, I.; FOWKE, L.C. Effect of abscisic acid, osmoticum and dessication on synthesis of proteins during the development of white spruce somatic embryos. **Annals of Botany**, v. 71, p. 1-22, 1993.

MOGHADDAM, M. R. B.; ENDE, W. V. Sugars and plant innate immunity. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.3989-3998, 2012.

MOHD.; RIZVI, Z.; KUKREJA, A. K.; BISHT, N. S. Plant regeneration in *Chorophytum borivilianum* Sant. et Fernand. from embryogenic callus and cell suspension culture and assessment of genetic fidelity of plants derived through somatic embryogenesis. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 18, n. 3, p. 253-263, 2012.

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

MONTEIRO, K. F. G.; HOMMA, A. K. O. Diferentes sistemas de produção com palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e a participação do Brasil no cenário internacional. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 200, p. 1-16, 2014.

MONTEIRO, T. R; FREITAS, E. O.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (*Jacq.*). **JOURNAL OF HORTICULTURAL SCIENCE & BIOTECHNOLOGY**, v. 93, p. 196-203, 2018.

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

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

MUKHERJEE, I.; SOVACOOOL, B. K. Palm oil-based biofuels and sustainability in southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia, and Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.37, p.1-12, 2014.

MUNIRAN, F.; BHORE, S. J.; SHAH, F. H. Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq., “Dura”: Comparison of three basal media for efficient regeneration. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p.79-82, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NETO V.B.P., OTONI W.C. Fontes de carbono e seu potencial osmótico na cultura de tecidos vegetais: isso importa? **Scientia Horticulturae**, v. 97(3- 4): p. 193-202, 2003.

NEVES, B. R.; PENHA, C. B. N.; AMARAL, M. C. A.; CARDOSO, A. D.; GUGÉ, R. M. A.; & SÃO JOSÉ, A. R. Condicionamento fisiológico de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Revista de Ciências Ambientais**, v 14(3), p. 49-59, 2020.

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

NORGAARD, J. V. Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. **Plant Science**, v. 124, n. 2, p. 211-221, 1997.

NUÑO-AYALA, A.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; GUTIÉRREZ-MORA, A. Somatic embryogenesis in Jarilla heterophylla (*Caricaceae*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 33–39, 2012.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OCHATT, S. J.; ATIF, R. M.; PATATOCHATT, E. M. *Jacas L*, Conreux C Competence versus recalcitrance for *in vitro* regeneration. **Not Bot Horti Agrobo** v.38: p. 102–108, 2010.

OLIVEIRA, F. L. R.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; FRAGA, H. P.; DEGENHARDT, J.; QUOIRIN. Embryogenic cultures and somatic embryos development from mature seeds of jaboticaba (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 94, 2022.

OLIVEIRA, L. B. MELLO, T.; ARAUJO, C. P.; OLIVEIRA, J. P. B.; FERREIRA, A.; ZANARDO, T. É. C.; CARVALHO, V. S. Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis Martius*, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. 299, p. 111051, 2022.

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCANDANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F.O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 1633-1645, 2013.

OROPEZA, C.; VERDEIL, J. L.; ASHBURNER, G. R.; CARDEÑA, R.; SANTAMARÍA J.M. (eds.) Current Advances in Coconut Biotechnology. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. **Springer**, Dordrecht, p. 341–340, 1999.

PÁDUA, M. S. **Germinação in vitro, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Tese de mestrado, p. 118, 2012.

PAIS, M. S. Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICs Data Assessment. **Frontiers in Plant Science** v. 10, 2019.

PALANYANDY, S. R.; SURANTHRAN, P.; GANTAIT, S.; SINNIHAH, U. R.; SUBRAMANIAM, S.; ABDUL A. M.; ROOWI, S. H. *In vitro* developmental study of oil palm

(*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, p. 1727-1733, 2013.

PÃQUES, M. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. In: **International Symposium on Plant Biotechnology and its Contribution to Plant Development, Multiplication and Improvement 289**. p. 283-290, 1991.

PARK, S. Y.; CHO, H. M.; MOON, H. K.; KIM, Y. W.; PAEK, K. Y. Genotypic variation and aging effects on the embryogenic capability of *Kalopanax septemlobus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, n. 105, v. 265-270, 2011.

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

PELÁEZ, E.; RAMÍREZ, D.; CAYÓN, G. Fisiología comparada de palmas africana (*Elaeis guineensis* Jacq.), americana (*Elaeis oleifera* H. B. K. Cortés) e híbridos (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) en **Hacienda La Cabaña**. *Palmas*, v. 31, n. 1, p. 29-38, 2010.

PENG, C.; GAO, F.; WANG, H.; TRETAKOVA, I. N.; NOSOV, A. M.; SHEN, H.; YANG, L. Morphological and Physiological Indicators for Screening Cell Lines with High Potential for Somatic Embryo Maturation at an Early Stage of Somatic Embryogenesis in *Pinus koraiensis*. **Plants**, v. 11(14), p. 1867, 2022.

PERÁN-QUESADA, R.; SANCHEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ, A.; PLIEGOALFARO, F. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. **Sci. Hortic.**, v. 102, p. 61-73, 2004.

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

PEREIRA, W. J. Padrões diferenciais de metilação do DNA em escala genômica de clones de *Eucalyptus* em ambientes variáveis. 2020.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; KRAUS, J. E.; FERREIRA, W. de M.; GUERRA, M. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 44, p. 289-299, 2008.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; DAL VESCO, L. L.; FRAGA, H. P. F.; GUERRA, M. P. Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.771-778, 2012.

PONTES T. C, K.; FERREIRA S. R.; FARJADO, C. G.; ALMEIDA V. F. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10(1), 2015.

POSPISILOVA, J.; SYNKOVÁ, H.; HAISEL, D.; SEMORADOVA, S. Acclimation of plantlets to ex vitro conditions: Effects of air humidity, irradiance, CO<sub>2</sub> concentration and abscisic acid (a Review). **Acta Hortic.** n. 748, p. 29, 2007

QIAO, G.; L.I, H.; LIU, M.; JIANG, J.; YIN, Y.; ZHANG, L.; ZHUO, R. Callus induction and plant regeneration from anthers of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 2013.

QUEIROZ, V. Regeneração, maturação e germinação *in vitro* de embriões somáticos em palma de óleo (*Elaeis guineenses Jacq*). 2017.

QUIROZ-FIGUEROA, F.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Embryo production through SE can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.

RAMALHO F. A.; MOTTA, P.; FREITAS, P.; TEIXEIRA, W. Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, 2010.

REBELLO, F. K.; COSTA, D. H. M. A experiência do Banco da Amazônia com projetos integrados de dendê na agricultura familiar. **Contexto Amazônico**, v. 5, n. 22, p. 1- 8, 2012.

REE, J. F.; POLES, L. G.; BACK, F.; BERTOLAZI, A. A.; SILVEIRA, V.; GUERRA, M. P. Aging peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures lose embryogenic potential and metabolic cellular function due to continuous culture in hypoxic environments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 140, p. 49-67, 2020.

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

REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; BOTELHO, C. E.; CARVALHO, S. P. Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. **Coffea Science**, v.3, p.30-37, 2008.

SALAJOVÁ, T.; SALAJ, J. Somatic embryogenesis in *Pinus nigra*: embryogenic tissue initiation, maturation and regeneration ability of established cell lines. **Biologia Plantarum**, v.49, p.333-339, 2005.

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P. *In vitro* germination and embryogenic competence acquisition of *Euterpe edulis Martius* immature zygotic embryos. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 171-178, 2012.

SAMOSIR, Y. M. S.; GODWIN, I. D.; ADKINS, S. W. The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimise the maturation of coconut somatic embryos. In: **Current advances in coconut biotechnology**. Springer, Dordrecht. p. 341-354, 1999.

SANÉ, D. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany** v. 98: p. 301-308. 2006.

SANTANA, M. C. C. B.; MACHADO, B. A. S.; FIGUEIREDO, T. V. B.; NUNES, I. L.; DRUZIAN, J. I. Dendê e seu potencial de uso: uma prospecção tecnológica. **Cadernos de prospecção**. v. 6, n. 4, p. 516-525, 2013.

SANTOS, E. A. Caracterização de Dendezeiros Subespontâneos com Base na Produção de Frutos e Cachos. Ilhéus, BA: **Universidade Estadual de Santa Cruz / Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais**, 2010.

SATO, A.Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A. Micropropagação de *Celtis sp.*: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7 (2): p. 117-123, 2001.

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

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. CULTURA DE TECIDOS APLICADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS. In Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado / Editores técnicos, Renato Fernando Amabile, Michelle Souza Vilela, José Ricardo Peixoto - Brasília, DF: Proimpress; **Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas**, p. 77- 89, 2018.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, p. 43-52, 1988.

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

SGHAIER-HAMMAMI, B.; JORRÍN-NOVO, J.V.; GARGOURI-BOUZID, R.; DRIRA, N. Abscisic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-DE profile. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11-12, p. 1223-1236, 2010.

SHI, X.; DAI, X.; LIU, G.; BAO, M. Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.): osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. **Trees**, v. 23, p. 1033-1042, 2009.

SHOJI, M.; SATOH; NAKAGAWA, R.; FUNADA, R.; KUBO, T.; OGITA S. Influência da pressão osmótica na maturação embrionária somática em *Pinus densiflora*. **Journal of Forest Research** v. 11(6): p. 449-453, 2006.

SILVA, I. M. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis as a tool for propagation of palm trees (*Arecaceae*): principles, strategies and challenges. In: Bettaieb T (ed) Micropropagation of ornamental plants, research and practice. **Nova Science Publishers**, New York, p. 139-194, 2018.

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

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v. 72, p. 67-80, 2014b.

SILVA-CARDOSO, I. M.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Cellular responses of oil palm genotypes during somatic embryogenesis involve participation of procambial cells, DNA demethylation, and auxin accumulation. **Plant Cell Reports**, v. 41, n. 9, p. 1875-1893, 2022.

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of preembryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, p. 845-875, 2019b.

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomical and histochemical studies of the somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 444-450, 2019a.

SILVEIRA, V. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da embriogênese zigótica e somática em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. e em *Pinus taeda* L.** 106 f. Tese (Doutorado em

Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

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

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

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J. Plant Lipids: Metabolism mutant and membranes. **Science**, v.252, p.80-87, 1991.

SOUZA A.; JUNGHANS T. Introdução à micropropagação de plantas. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Cruz das Almas, 2006.

SOUZA, A. E. C.; CERQUEIRA, D. A.; CARDOSO, C. R. Biorrefinaria para os frutos de *Elaeis guineensis*: uma revisão sobre produção de ecodiesel e gaseificação para tratamento de resíduos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, 2022.

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

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 74, p. 15-35, 2003.

STEFENON, V. M.; R, J. F.; PINHEIRO, M. V. M.; GOETEN, D, STEINER, N.; GUERRA, M. P. Advances and constraints in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia*, *Acca sellowiana*, and *Bactris gasipaes*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 143(2), p. 241-263, 2020.

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

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. ***Plant Cell Tissue and Organ Culture***, v. 89, p. 15-22, 2007.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. ***Annals of Botany***, v.100, p.1-11, 2007.

STEINMACHER, D.A.; PEIXOTO, M.L.; GUERRA, M.P.; KROHN, N.G.; SOUZA, M.A.; AGUILA, R.M. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de pupunha (*B. gasipaes H.B.K.*). **X Encontro Anual de Iniciação Científica. Anais** Ponta Grossa, PR, p. 28-29, 2001.

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

SUMARYONO; RIYADIA, I.; KASIA, P. D.; GINTING, G. Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in temporary immersion system. ***Indonesian Journal of Agriculture***, v. 1, n. 2, p. 109-114, 2008.

SUMATHI, S.; CHAI, S. P.; MOHAMED, A. R. Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***, v.12, p. 2404-2421, 2008.

SURRE, C.; ZILLER, R. **La palmera de aceite**, 1969.

SVOBODOVÁ, H.; ALBRECHTOVÁ, J.; KUMSTÝROVÁ, L.; LIPAVSKÁ, H.; VÁGNER, M.; VONDRÁKOVÁ, Z. Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of

embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 37, p. 209–221, 1999.

TARMIZI, A. H.; SAMSAUL, K. R.; ZAITON, R.; ROSLI, M. Y. Multiplication of oil palm liquid cultures in bioreactors. **Journal of Oil Palm Research Special Issue on Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme**, v.1, p.44-50, 2008.

TEIXEIRA, J. B. **Development of *in vitro* techniques of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. (Dissertation of Doctor of Philosophy). Graduate Program in Plant Biology. New Brunswick, New Jersey. U.S.A, 1989.

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

THELEN, J. J.; OHLROGGE, J. B. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. **Metabolic Engineering**, v.4, p.12-21, 2002.

THEODOULOU, F. L.; EASTMOND, P. J. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. **Current Opinion in Plant Biology**, v.15, p.322-328, 2012.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E. C.; KLERK, G. J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E. F. Os componentes dos meios de cultura de tecidos vegetais II: adições orgânicas, efeitos osmóticos e de pH e sistemas de suporte. George EF, Hall MA, De Klerk GJ (Eds). Propagação de plantas por cultura de tecidos, 3<sup>a</sup> ed. **Springer**, Dordrecht, p. 115-173, 2008.

THORPE, T. A. ***In Vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 557, 1995.

TIKKINEN, M; VARIS, S; ARONEN, T. Development of somatic embryo maturation and growing techniques of Norway spruce emblings towards large-scale field testing. **Forests**, v. 9, n. 6, p. 325, 2018.

TING, N.; ZAKI, N. M.; ROSLI, R.; LOW, E. L.; ITHNIN, M.; CHEAH, S.; TAN, S.; SINGH, R. SSR mining in oil palm EST database: application in oil palm germplasm diversity studies. **Journal of Genetics**, v.89, p.135-145, 2008.

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

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3. p. 417-426, 2007.

TORRES, A. C.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Embrapa-SPI; Embrapa Hortaliças**. 1998.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÀ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; ROMANO, E. **Glossario de biotecnologia vegetal**. 2000.

TOW, W. K.; GOH, A.P.-T.; SUNDRALINGAM, U.; PALANISAMY, U.D.; SIVASOTHY, Y. Flavonoid Composition and Pharmacological Properties of *Elaeis guineensis* Jacq. Leaf Extracts: A Systematic Review. **Pharmaceuticals**, v. 14, p. 961, 2021.

TREGEAR, J. W.; RIVAL, A.; PINTAUD, J. C. A family portrait: unravelling the complexities of palms. **Annals of Botany**, v.108, p.1387-1389, 2011.

TROCH, V.; WERBROUCK, S.; GEELEN, D.; VAN LABEKE, M.C. Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.98, p.115-123. 2009.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA)- National agricultural statistics service, 2021.

US-CAMAS, R.; RIVERA-SOLÍS, G.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PENA, C. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, n. 2, p. 187–201, 2014.

VALE, E. D. M.; HERINGER, A. S.; BARROSO, T.; FERREIRA, A. T. D. S.; COSTA, M. N.; PERALES, J. E. A.; SILVEIRA, V. Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. **Proteome science**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2014.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, v. 21: p. 1175-1182, 2003.

VANISREE, M.; LEE, C. Y.; LO, S. F.; NALAWADE, S. M.; LIN, C. Y.; TSAY, H. S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 1-22, 2004.

VENTURIERI, A.; FERNANDES, W. R.; BOARI, A. D. J.; VASCONCELOS, M. A. Relação entre ocorrência do amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e variáveis ambientais no Estado do Pará. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA**, v.16, 2009.

VICIENT, C. M.; MARTÍNEZ, F. X. Os usos potenciais da embriogênese somática na agrofloresta não se limitam à tecnologia de sementes sintéticas. Análise. **Rev. Brás. Fisiol. Veg** v. 10, p. 1-12, 1998.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. **Annales d'Histochemie**. v. 15, p. 289–296, 1970.

VISONÁ-OLIVEIRA, M., FERREIRA, I. C., MACEDO, J. G. D. L., SOUSA, L. F., SOUSA, J. T. L. D., & SANTOS, R. P. D. Consumo e digestibilidade de nutrientes da torta de dendê na dieta de ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, p. 179-192, 2015.

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

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

WICKE, B.; SIKKEMA, R.; DORNBURG, V.; FAAIJ, A.. Exploring land use changes and the role of palm oil production in Indonesia and Malaysia. **Land Use Policy**. v. 28: p. 193-206, 2011.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.

WITTE, L. C.; ARMBRUSTER, G. F. J.; GIELLY, L.; TABERLET, P.; STÖCKLIN, J. AFLP markers reveal high clonal diversity and extreme longevity in four key arctic-alpine species. **Molecular Ecology**, v.21, p.1081-1097, 2012.

YANG, F.; XIA, X. R.; KE, X.; YE, J.; ZHU, L. H. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* Engelm): improving initiation of embryogenic tissues and maturation of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 143, n. 1, p. 159-171, 2020.

YANG, X. Y.; ZHANG, X. L. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.

YOUSSEF, M. A.; EI-HELW, M. R.; TAGHIAN, A. S.; EI-AREF, H. M. Improvement of *Psidium guajava* L. using micropropagation. **Acta Horticulturae** n. 849: p. 223–230, 2010.

YU, X.-N.; LU, M.-J.; ZHOU, M.; WANG, H.-Y.; FENG, J.-Y.; WEN, Y.-Q. Reduction of pectin may decrease the embryogenicity of grapevine (*Vitis vinifera*) pro-embryonic masses after 10 years of in vitro culture. **Scientia Horticulturae**, v. 309, n. 5 111690, 2023.

ZAHANG, CX.; LIQ; KONG, L. Indução, desenvolvimento e maturação de embriões somáticos em pinheiro-bravo (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.). **Cultura de tecidos e órgãos de células vegetais** v. 91(3): p. 273-280, 2007.

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

ZHOU, T.; YANG, X.; GUO, K.; DENG, J.; XU, J.; GAO, W.; LINDSEY, K.; ZHANG, X. R. Os homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, p. 2108-2124, 2016.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

ZOUINE, J.; EL BELLAJ, M.; MEDDICH, A.; VERDEIL, J. L.; EL HADRAMI, I. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 82, n. 1, p. 83-92, 2005.