

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

The seal of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a bird, possibly a toucan, with its wings spread. Above the bird are three stars. The emblem is surrounded by a laurel wreath. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written along the top inner edge of the circle, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written along the bottom inner edge.

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS DA SEMENTE DE
CAIAUÉ *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés E EVENTOS DA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS**

UFAM

SUELEN CRISTINA DE SOUSA LIMA

MANAUS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

SUELEN CRISTINA DE SOUSA LIMA

ASPECTOS MORFOANATÔMICOS DA SEMENTE DE CAIAUÉ
Elaeis oleifera (Kunth) Cortés **E EVENTOS DA EMBRIOGÊNESE**
SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, na linha de pesquisa Biotecnologia, Genética e Melhoramento Vegetal, para obtenção de título de Doutor.

Orientadora: Dra. Maria Silvia de Mendonça

Co-orientadora: Dra. Regina Caetano Quisen

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor (a).

Lima, Suelen Cristina de Sousa

L732a Aspectos morfoanatômicos da semente de Caiuê *Elaeis oleifera* (Kunt) Cortés e eventos da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos/ Suelen Cristina de Sousa Lima. 2018
97 f.:il. Color; 31cm.

Orientadora: Dra. Maria Silvia de Mendonça

Coorientadora: Dra. Regina Caetano Quisen

Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas.

1.Morfologia. 2.Anatomia. 3. Palmeira. 4. Calogênese. 5.
Semente. I. Mendonça, Dra. Maria Silvia de II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

SUELEN CRISTINA DE SOUSA LIMA

ASPECTOS MORFOANATÔMICOS DA SEMENTE DE
CAIAUÉ *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés E EVENTOS DA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE
EMBRIÕES ZIGÓTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Agronomia Tropical da
Universidade Federal do Amazonas, como
requisito para obtenção do título de Doutora
em Agronomia Tropical, área de
concentração em Produção Vegetal.

Aprovada em 29 de junho de 2018

BANCA EXAMINADORA



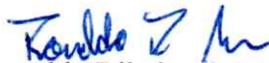
Profa. Dra. Maria Sílvia de Mendonça, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Poliana Roversi Genovese Marcomini, Membro
Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho



Dr. Ricardo Lopes, Membro
Embrapa Amazônia Ocidental



Dr. Ronaldo Ribeiro de Moraes, Membro
Embrapa Amazônia Ocidental



Profa. Dra. Maria da Glória Gonçalves de Melo, Membro
Universidade do Estado do Amazonas

Aos meus pais Silvia e Raiamar

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me proporcionou a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas - UFAM, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental, pelo aporte institucional e disponibilidade do material genético da infraestrutura para a realização dos experimentos;

A FAPEAM, pela sua importância no desenvolvimento da pesquisa e em especial neste trabalho, pela concessão da bolsa de pesquisa;

A minha orientadora, Dra. Maria Silvia de Mendonça, por acreditar em mim, pela paciência e confiança na orientação;

A minha co-orientadora, Dra. Regina Caetano Quisen, pelas sugestões no decorrer dos estudos.

Ao queridos colegas da Estação Experimental do Rio Urubu – CERU/Embrapa Amazônia Ocidental, que me auxiliaram nas coletas do material vegetal: Bruno Cruz, Ricardo Borges, Alex Cysne e Urbano Gonçalves.

As técnicas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa, Rosimar Fernandes e Pamela Harada pela colaboração na realização dos experimentos.

Ao técnico do Laboratório de Botânica Agroflorestal Manoel Viana por sanar as dúvidas e ajudar a arrumar o bloco de corte no micrótomo.

Aos colegas de laboratório que encontrei durante a realização dos experimentos pelos momentos de descontração: Lilian Loren, Keséde Pereira, Marcus Melo, Daniele Coelho, Cibele Azamora, Eduardo Dias e Anchieta Silva.

Aos amigos e parceiros de turma que durante os quatro anos estudando juntos desfrutamos de dias e noites de alegrias e angústias: Fabiana Rocha, Francisco Castro e Ednaldo Lopes.

Aos amigos de longa data que ofereceram o ombro amigo durante as etapas mais

difíceis no decorrer desta jornada: Ticiane Martins, Marcelle Larissa, Marcelo Raizer e Ydrielle Teles.

Aos anjos que aparecerem durante esse período de estudos, que me ajudaram sem nenhum ônus, Clayton Silva sempre disponível e alegre roubando-me um sorriso quando sempre que me percebia triste, devidos as dificuldades encontradas em campo. Sentirei saudades das nossas partilhas durante o trajeto para o campo experimental do Rio Urubu. Professora Tereza Cristina uma mãe que ganhei, sempre me aconselhando, me dando forças para continuar mesmo com as dificuldades encontradas no decorrer dos experimentos. Professora Anália Duarte trazia otimismo, sempre me dizia que devo acreditar, pois tudo na vida são fases que após a tempestade vem a abonaça e, a minha querida Joelma Rodrigues mulher guerreira, aluna esforçada e dedicada ao seu doutorado, entretando arrumou um tempinho para firmar parceria e me orientar nas análises, quantos fins de semanas e feriados no laboratório com o objetivo de encontrar resultados nas pesquisas, com hora pra entrar mais sem hora para sair. Quanto ensinamento tive ao seu lado. Serei eternamente grata a vocês, muito obrigada!

Não poderia deixar de agradecer ao Rayne César companheiro, amigo e parceiro que chegou no finalzinho, mas que fez toda a diferença com seu apoio e carinho.

A minha querida Comunidade Católica Via Lucis, por me levar a Deus nos momentos em que me sentia sem força para continuar.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho;

Deixo aqui expresso meu muito obrigada!

"Deus disse: "Produza a terra plantas, ervas que contenham semente e árvores frutíferas que dêem fruto segundo a sua espécie e o fruto contenha a sua semente." E assim foi feito." A terra produziu plantas, ervas que contêm semente segundo a sua espécie, e árvores que produzem fruto segundo a sua espécie, contendo o fruto a sua semente. **E Deus viu que isso era bom.**"

Gênesis 1,11-12

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Características biométricas da semente de *Elaeis oleifera*: Valores médio, amplitude, desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos diâmetros apical e basal, comprimento e massa fresca.....47

Tabela 2. Porcentagem da análise centesimal de sementes de *Elaeis oleifera*.....47

CAPITULO II

Tabela 1. Porcentagem do efeito dos reguladores de crescimento na indução de calos de *Elaeis oleifera* em diferentes genótipos.....80

Tabela 2: Porcentagem do efeito dos reguladores de crescimento na indução de calos de *Elaeis oleifera* em diferentes genótipos.....80

Tabela 3: Quadro ANOVA do ensaio 3 –Teste com diferentes genótipos e reguladores de crescimento 85

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Morfologia da semente de *Elaeis oleifera*. a) diferentes formatos da semente com poro micropilar e extensões vasculares. b) Secção da semente em corte longitudinal apresentando tegumento, endosperma e embrião. c) Embrião com região proximal e distal. (pm: poro micropilar; ev: extensões vasculares; en: endocarpo; tg: tegumento; ed: endosperma; em: embrião; rp: região proximal; rd: região distal).....48

Figura 2. Semente em corte transversal de *Elaeis oleifera*. a) Tegumento e endosperma. b) Células do tegumento. c) Células do endosperma (te: tegumento; en; endosperma).....48

Figura 3. Embrião de *Elaeis oleifera*: a) Secção longitudinal, evidenciando a região proximal (eixo embrionário) e a região distal (limbo cotiledonar ou haustório) protoderme (seta). b) Eixo embrionário, evidenciando o polo radicular e fenda cotiledonar (seta). c) Eixo embrionário, evidenciando plúmula e radícula. d) Plúmula em secção transversal. e) Distribuição do procâmbio na região distal do limbo cotiledonar. (pr: região proximal; rd: região distal ra: radícula; pl: plúmula).....49

Figura 4. Embrião de *Elaeis oleifera*. a) Detalhe do eixo embrionário evidenciando a radícula e a plúmula. b) detalhe das células do promeristema fundamental e protoderme (seta) na região proximal. c) Região distal evidenciando os feixes provasculares em pontilhado. d) Detalhe do procâmbio (seta) próximos a protoderme na região distal. (pl: plúmula; pm: promeristema; pr: protoderme; ra: radícula).....49

Figura 5. Testes histoquímicos aplicados na semente de *Elaeis oleifera*. a-e tegumento e endosperma. f-i embrião. a) parede das células do endosperma com pectina (Vermelho de Rutênio). b) endosperma corado com Xilidine Ponceau evidenciando corpos proteicos (seta). c) células do endosperma com concentração de alcalóide (Wagner). d) lipídios no interior das células do endosperma (Sudam). e) tegumento com compostos fenólicos (Cloreto Férrico). f) reação para lipídios no interior das células da protoderme e meristema fundamental. g) células da protoderme e meristema fundamental com reação para alcalóides. h) reação para pectina. i) corpos proteicos no interior das células do meristema fundamental (seta). (en: endosperma, mf: meristema fundamental, pr: protoderme, te: tegumento).....50

CAPITULO II

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na formação de calos induzidos durante a embriogênese somática de *Elaeis oleifera* ao longo de 180 dias de cultivo, sendo T1: controle (sem 2,4-D); T2: 26,6 mg L⁻¹; T3: 55,3 mg L⁻¹ e T4: 110,5 mg L⁻¹77

Figura 2. Porcentagem de formação de calos de *Elaeis oleifera* em diferentes concentrações de 2,4-D ao final de 150 dias.....77

Figura 3. Formação de calos em embrião de *Elaeis oleifera* durante a embriogênese somática. a) embrião zigótico de caiaué com região proximal e região distal: b) explante com 60 dias de cultivo em meio MS com 2,4-D a 27,6 mg L⁻¹, formação de calos não embriogênicos: c)

explante com 150 dias de cultivo em meio MS com 2,4-D a 27,6 mg L⁻¹, formação de calos não embriogênicos: d) explante com 60 dias de cultivo em meio MS com 2,4-D a 55,3 mg L⁻¹, formação de calos embriogênicos e) explante com 150 dias de cultivo em meio MS com 2,4-d a 55,3 mg L⁻¹, formação de calos embriogênicos.....78

Figura 4. Embriões de *Elaeis oleifera* durante a indução da embriogênese somática em diferentes meios de cultura acrescido de regulador de crescimento 2,4-D a 110 mg L⁻¹. a-c: meio MS; d-f: meio OPCM; g-i: meio Y3; a, d, g: embriões com 14 dias intumescidos; b, e, h: explante com 30 dias formação de calos primários; c, f, i: calos com 130 dias c) calos embriogênicos, f) calos não embriogênicos e raízes: i) calos não embriogênicos. (barras = 1cm).....78

Figura 5. Efeito dos diferentes meios de cultura na indução de calos primários de *Elaeis oleifera* ao final de 130 dias..... 79

Figura 6. Resposta dos diferentes genótipos na indução de calos de *Elaeis oleifera* ao final de 180 dias.....79

Figura 7. Resposta dos diferentes genótipos e reguladores de crescimento na indução de calos em *Elaeis oleifera* ao final de 30 dias. a-c: genótipos em meio de cultura MS acrescido do regulador 2,4-D (110 mg L⁻¹). d-e: genótipos em meio de cultura MS acrescido do regulador Picloram (108,5 mg L⁻¹). (Barras = 1cm).....80

Figura 8. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 30 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos primários; b-d: cortes longitudinais do embrião; b) embrião zigótico apresentando região proximal diferenciada em relação a região distal; c) região proximal apresentando células com características meristemáticas. d) detalhe da presença de compostos fenólicos (seta); (rp: região proximal, rd: região distal, mm: massa meristemática).....81

Figura 9. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 60 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos primários de coloração amarela; b) embrião zigótico apresentando região proximal diferenciada em relação à região distal; c) detalhe da presença de protoderme, meristema fundamental e células parenquimáticas; d) aglomerado de células meristemáticas na região proximal; e) transição entre região proximal e distal do embrião. (pd: protoderme, mf: meristema fundamental, par: parênquima, pc: procâmbio, mm: massa meristemática).....81

Figura 10. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 90 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos nodulares de coloração amarela; b) região proximal com massas meristemáticas; c) região proximal com elementos traqueais; d) fragmentação de massa meristemática com aspecto nodular; e) região meristemática com células pequenas, isodiamétricas, citoplasma denso e núcleo evidente (mm: massa meristemática; tr: elementos traqueais).....82

Figura 11. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 120 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos globulares de coloração amarela; b) aspecto geral de calos embriogênicos constituídos por células meristemáticas; c) região meristemática início da formação da protoderme (seta); d) detalhe de células meristemáticas (eg: embrião globular; mm: massa meristemática).....82

Figura 12. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 150 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos globulares de coloração amarela; b) aspecto geral de calos embriogênicos constituídos por células meristemáticas com divisões antitoclinal; c) região meristemática com divisão de células.....83

Figura 13. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 180 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos globulares de coloração amarela; b) aspecto geral de pró-embriões constituídos por células meristemáticas; c) células meristemática com divisão celular e elementos traqueais; d) detalhe das células meristemáticas em divisão (círculo).....83

Figura 14. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 60 dias de cultivo em meio de diferenciação de embriões somáticos. a) embrião zigótico com calos globulares de coloração amarela; b) embrião somático; c) detalhe da protoderme.....84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Elaeis oleifera</i> (Kunth) Cortés - Caiaué	2
1.2 Descrição morfológica.....	4
1.3 Importância do melhoramento genético para a espécie.....	6
1.4 Embriogênese somática	7
1.5 Fatores que auxiliam a embriogênese somática	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 Localização geográfica da área de seleção das matrizes	13
2.2 Isolamento e polinização de inflorescências masculinas e femininas	14
3. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO I.....	25
Aspectos morfoanatômicos e histoquímico da semente de Caiaué <i>Elaeis oleifera</i> (Kunth) Cortés Arecaceae	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CONCLUSÕES	38
AGRADECIMENTOS	39
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	47
CAPÍTULO 2	51
EVENTOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Elaeis oleifera</i> (Kunth) Cortés - ARECACEAE.....	51
RESUMO	52
ABSTRACT	53
INTRODUÇÃO.....	54
MATERIAL E MÉTODOS	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	70
AGRADECIMENTOS	71
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

As palmeiras são plantas da família Arecaceae, compreendem 188 gêneros e aproximadamente 2.585 espécies, distribuídas em áreas tropicais e subtropicais do mundo principalmente nas regiões da África, Américas e Ásia-Pacífico (PALM WEB, 2018). O Brasil possui uma riquíssima flora Arecaceae, sendo o terceiro país do mundo em diversidade de espécies nativas, com cerca de 37 gêneros e 296 espécies (FLORA DO BRASIL, 2018).

É um grupo facilmente reconhecido fazendo parte da composição da paisagem natural. Apresentam um grande número de espécies que contribuem no cotidiano das comunidades, amplamente utilizado pela população a níveis de subsistência, tanto para alimentação como para cobertura de casas, construção de residências e ornamentação (HENDERSON, 1995). As palmeiras são de grande importância econômica, são utilizadas para a produção de ceras, óleos, cremes, fibras e palmitos (TOMLINSON, 1979).

O gênero *Elaeis* pertencente a família Arecaceae desperta grande interesse agrônomo e econômico devido seu uso em vários ramos dentre eles a obtenção de dois produtos que são extraídos dos frutos e das sementes: óleo de palma ou óleo de dendê, que é extraído do mesocarpo do fruto, e o óleo de palmiste, extraído da amêndoa (semente). O beneficiamento realizado com os frutos da espécie gera uma variedade muito grande de produtos e coprodutos que são aproveitados pela indústria, sendo os produtos obtidos através da extração de 20% para o óleo de palma bruto, 1,5% para o óleo de palmiste, 3,5% para a torta de palmiste, 12% para as fibras e 5% para as cascas (HARTLEY, 2000).

O óleo de palma apresenta baixo custo de produção, boa qualidade e ampla utilização, sendo matéria prima para diferentes segmentos nas indústrias oleoquímicas, farmacêuticas, de sabões e cosméticos, mas seu principal uso é na alimentação humana no preparo de margarinas, gorduras sólidas, óleo de cozinha, maionese, panificação, leite e chocolate artificiais (FRANZ, 2000). De acordo com The Economist (2018), seu uso tem se

intensificado na indústria alimentícia, devido à substituição da gordura *trans*, sendo o óleo utilizado em cerca de 50% de todos os produtos industrializados que se pode encontrar nos supermercados, além de ser o óleo de fritura mais consumido na Ásia.

O gênero tem o reaproveitamento em fibras e cascas, utilizadas para a alimentação de caldeiras como combustíveis, assim como a torta de palmiste, tanto usada na composição de ração animal, ou como complemento de fertilizantes (LEVERMANN; SOUZA, 2014; VIEGAS; MULLER, 2000).

1.1 *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés - Caiuá

Em 1816, a espécie foi descrita por Humbolt, Bonpland e Kunth com a denominação de *Alfonsia oleifera* (CUNHA et al., 2009). Somente em 1897, Cortés reclassifica a espécie considerando o gênero *Elaeis* adotado por Jacquin (TROPICOS, 2018).

De acordo com Ooi et al. (1981), o centro de origem do *Elaeis oleifera* está na América Central, em razão do baixo nível de variabilidade encontrada nas populações do Brasil, comparadas àquelas da Costa Rica, Panamá e Colômbia. Barcelos (2002), ao realizar estudos com marcadores moleculares, indica ser a região da Alta Amazônia (Oeste do Brasil, Peru e Equador), como a zona de importante diversidade genética da espécie.

No Brasil, ocorre em solos de origem antropogênica denominados de terra preta de índio, solo este que apresenta alta fertilidade em virtude dos elevados teores de fósforo, cálcio e matéria orgânica (CORLEY; TINKER, 2003; MEUNIER, 1976; OOI et al., 1981). Quando comparada a outros países, a espécie pode ser encontrada em diferentes ambientes, sendo na Colômbia, em depressões existentes em áreas de pastagens, áreas úmidas ou mesmo alagadas e próximo as margens dos rios. No Suriname, grandes populações crescem em solos quimicamente pobres e arenosos e, na Costa Rica desenvolve-se às margens dos rios, em solos úmidos e em pastagens íngremes (CUNHA et al., 2009).

De acordo com Ooi et al. (1981), a espécie é frequente na região central do Estado do Amazonas, em áreas próximas aos rios, e segundo Clement et al. (2005), sua ocorrência também está associada a locais de anterior ocupação indígena, sugerindo assim um mecanismo de dispersão dessa espécie. Barcelos (1986), através de suas coletas observou não ter encontrado palmeira ocorrendo isoladamente nas florestas ou em clareiras, mas sempre em aglomerados de poucos indivíduos.

Na Amazônia brasileira *Elaeis oleifera* é conhecida como caiaué, que na língua indígena significa planta que anda (corozo). Em outros países possui outras denominações como *Alfonsia*, *Corozo* (LEITMAN et al., 2015) em Honduras é conhecido como óleo de ojon (MUNGUIA; COLLINS, 2006).

Apresenta produção razoável de cachos, mas com baixo conteúdo em óleo nos frutos, limitando assim o rendimento por hectare deste produto (BARCELOS et al., 2001). O comportamento procumbente não está relacionado a condições ecológicas específicas, pois ocorre em diferentes tipos de ambientes e de solo, estando relacionado ao tamanho e ao peso da coroa foliar em comparação com o limitado sistema radicular (BARCELOS, 1986; CUNHA et al., 2009).

Estudos com *Elaeis oleifera* iniciaram e intensificaram no Brasil na década de 1980, quando a Embrapa em cooperação com o IRHO (Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux) da França realizou ampla coleta de germoplasma nas principais populações nativas do Amazonas. Estas coletas foram divididas em seis grupos: Grupo I/Rio Solimões, Grupo II/Rio Negro próximo à região de Manaus-AM, Grupo III/Rio Madeira, sendo que neste grupo cerca de 70% das subamostras foram coletadas em “terra preta de ‘ Índio”, Grupo IV/Rio Amazonas, Grupo V/BR 174 e Grupo VI/Manaus (BARCELOS et al., 2001). A região mais bem representada na coleção é a do Rio Madeira (Manicoré), visto que os estudos de diversidade genética com base em caracteres morfológicos e de marcadores moleculares

com populações desta região, demonstraram ser mais promissoras em testes de progênies de meios irmãos (CUNHA et al., 2009) e hibridizações interespecíficas com dendezeiro entre outros (CUNHA et al., 2005).

1.2 Descrição morfológica

De acordo com Meunier (1976), *Elaeis oleifera* possui folhas que conferem seu aspecto típico: Os folíolos são normalmente 100 pares, dispostos em um mesmo plano sobre a raque, conferindo aspecto liso. Apresenta na parte basal do folíolo uma protuberância sem cor, que o diferencia do dendê que apresenta cor amarelo-claro (CUNHA et al., 2005) além da cor as folhas apresentam espinhos curtos e grosso no pecíolo (VALLEJO; CASSALETT, 1975). O comprimento das suas folhas é muito variável: uma planta adulta pode conter até 42 folhas funcionais e comprimento entre 1,88 e 7 m (CORLEY; TINKER, 2003; CUNHA et al., 2009). *Elaeis oleifera* é uma planta monóica, alógama, com inflorescências solitárias, curtas e unissexuais (DRANSFIELD et al., 2008). A raque floral apresenta comprimento de 15 a 20 cm, suportando as raquilas que medem de 6 a 20 cm de comprimento (WESSELS BOER, 1965). A flor feminina é formada por seis pétalas rodeadas por duas ou três pequenas brácteas e mede cerca de 8 mm de comprimento e 6 mm de largura. A inflorescência masculina é envolta por duas espatas, que se rompem por ocasião da sua emissão (CUNHA et al., 2009). As espatas são dispostas sobre uma raque floral de 10 a 15 cm de comprimento, em espiral, entre 40 e 200 raquilas, com 8 a 14 cm de comprimento e cerca de 1 cm de diâmetro, ligeiramente angulares (CORLEY; TINKER, 2003; WESSELS BOER, 1965).

O ovário é trilocular, apresentando três estigmas persistentes, que são de coloração amarelo-esverdeada quando imaturos e vermelho-alaranjada após a antese. O período da antese na inflorescência feminina é mais demorada do que em outras palmeiras podendo durar 3 ou 4 semanas (RAO; CHANG, 1982). De acordo com Ooi et al. (1981) palmeiras com longa duração da antese mostram amadurecimento desigual. A inflorescência masculina está

disposta sobre uma raque floral de 10 a 15 cm de comprimento, em espiral, contendo entre 40 a 200 raquila, medindo 8 a 14 cm de comprimento e aproximadamente 1 cm de diâmetro (CORLEY; TINKER, 2003; CUNHA et al., 2009), sempre protegida pela espata. O número de flores na inflorescência feminina é maior do que ao encontrado no dendê (*Elaeis guineensis*), contudo não tem sido encontrada a formação de grandes cachos; mesmo plantas crescendo em condições favoráveis raramente produzem cachos pesando mais de 20 kg.

As inflorescências masculinas e femininas são visitadas por várias espécies de insetos, seus principais polinizadores são os besouros nativos da família Curculionidae, dos gêneros *Celetes*, *Grasidius* e *Couturierius* (COUTURIER et al., 1999; LUCCHINI et al., 1984; O'BRIEN et al., 2004).

O fruto mede 2,5 a 3 cm de comprimento e 1,8 a 2 cm de diâmetro, é elipsoide-oblongo (HENDERSON, 1995; MIRANDA et al., 2001; MIRANDA; RABELO, 2006). Uma característica marcante são seus cachos que apresentam frutos partenocárpicos e frutos abortados (CUNHA et al., 2009). O cacho de *Elaeis oleifera* apresenta entre 8 kg a 12 kg, em plantas de subamostras de *Elaeis oleifera*, da origem Manicoré (Barcelos), usadas como genitores para produção de sementes comerciais do híbrido BRS-Manicoré, o peso dos cachos com polinização cruzada é por volta de 5,5 kg a 18 kg (CUNHA et al., 2009).

O tronco do *Elaeis oleifera* caracteriza-se por um crescimento anual em altura entre 5 e 10 cm, é cilindro e maciço. Mantém-se ereto até completar 15 anos de idade, curvando-se então sobre o solo, o que é uma característica marcante da espécie; aos poucos a parte basal se decompõe, contudo ela não morre, devido formar um novo sistema radicular adventício. Um fator limitante deste processo é que a planta passa por um período improdutivo até que reestabeleça um novo sistema radicular e se erga novamente (CUNHA et al., 2005). Em algumas coleções de *Elaeis oleifera* no Congo, algumas plantas permaneceram eretas mais de 40 anos após o plantio (HARTLEY, 1988).

O sistema radicular de *Elaeis oleifera* apresenta uma raiz primária após a germinação, às raízes laterais são finas, o sistema radicular é do tipo fasciculado, composto de raízes primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Em plantas adultas, milhares de raízes emergem do bulbo radicular, órgão volumoso hemisférico de 80 cm de diâmetro, que penetra cerca de 40 a 50 cm no solo, formado a partir de entrenós da base do estipe (HARTLEY, 1988). Com três anos de idade a planta apresenta um sistema radicular entre 10 e 50 cm de profundidade. Conforme o seu desenvolvimento as raízes vão se distanciando podendo chegar até cinco metros de distância no solo (BLANK, 1952; CUNHA et al., 2005; MEUNIR, 1976).

1.3 Importância do melhoramento genético para a espécie

Elaeis oleifera desperta interesse em programas de melhoramento genético, devido apresentar tais características: resistência ou tolerância ao amarelecimento fatal, redução do crescimento em altura do tronco e óleo mais fluido em temperatura ambiente, por apresentar maior concentração de ácidos graxos insaturados.(CAMARERO, 1981; TAM et al., 1977).

A espécie apresenta relativa facilidade de hibridação com *Elaeis guineensis* produzindo híbridos viáveis que constituem em uma fonte de grande variabilidade genética a ser explorada (CUNHA; LOPES, 2010; LOPES et al., 2012).

Por vários anos são realizados trabalhos visando a seleção de materiais com características agrônomicas de interesse, entretanto ainda é baixo o número de materiais selecionados, melhorados e lançados convencionalmente, em razão do longo ciclo da cultura (LOW et al., 2008). Uma preocupação observada nos programas de melhoramento da espécie refere-se à multiplicação dos genótipos selecionados, todavia a principal forma de propagação é via sementes, em condições naturais a germinação é baixa e desuniforme, podendo demorar anos (HUSSEY, 1958). As sementes são importantes para o melhoramento devido constituírem o centro das alterações genéticas naturais ou planejadas em programas de melhoramento genético vegetal (MARCOS-FILHO, 2005). É de conhecimento que algumas

sementes de palmeiras normalmente apresentam dormência (LORENZI et al., 2004), que é um fator interno da semente de muitas espécies de Arecaceae ocorrendo em diferentes graus (ODETOLA, 1987). A dormência pode ser: fisiológica, morfológica e física (BASKIN; BASKIN, 2004; FINNCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

Em *Elaeis oleifera* as baixas taxas de germinação ocorrem devido a dormência manifestada após a maturação fisiológica, sem a interrupção artificial, a germinação pode demorar anos. A dormência que ocorre em diásporos de *Elaeis oleifera* é a resitência física, devido o endocarpo apresentar consistência dura e densa que dificulta à absorção de oxigênio e o alongamento do embrião. Para realizar a quebra desse tipo de dormência são realizados tratamentos termicos em diásporos de *Elaeis oleifera* acelerando a germinação (LIMA et al., 2017). Não há registros de estudos que elucidem o tipo de dormência que possa ocorrer na semente (tegumento, endosperma e embrião), apenas se conhece a dificuldade que a semente encontra para germinação. Com isso, conhecer a morfologia e anatomia da semente nos permitirá fazer a identificação das suas estruturas, e oferecer subsídios a interpretação correta da germinação (GROTH; LIBERAL, 1988). Outra forma de tentar solucionar os problemas decorrentes das dificuldades de germinação *in situ*, desuniformidade das plântulas formadas, bem como clonagem de materiais selecionados no cultivo *in vitro*, seria o uso de uma técnica da cultura de tecidos que é a embriogênese somática. Esta ferramenta é de grande valia, devido ser utilizada para a propagação massal de plantas elites, pois possibilita elevadas taxas de multiplicação (GUPTA et al., 1993).

1.4 Embriogênese somática

A embriogênese somática é um processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se sem a fusão de gametas, dando origem a uma planta (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). A embriogênese somática (ES) é a resposta que mais expressa o fenômeno da totipotência celular (ETIENNE et al., 1993; SOLANO, 2001).

Pode-se dizer que, a embriogênese somática é um processo de regeneração compreendido por várias etapas que inicia pela formação de massas pró-embriogênicas de células, seguida pela formação do embrião somático, sua maturação e pela regeneração da planta (VON ARNOLD et al., 2002). Duas vias de regeneração podem ocorrer na embriogênese somática: direta e indireta. A embriogênese somática direta consiste na formação dos embriões somáticos direto do tecido do explante, sem a formação de calos. Já na embriogênese somática indireta, primeiramente ocorre intensa divisão celular com a proliferação de calos, que são massas de células desorganizadas, que se multiplicam desordenadamente podendo formar um novo tecido ou órgão em diferentes estádios de diferenciação (TORRES et al., 1998). Estes calos embriogênicos podem ser induzidos, originando assim pequenos embriões somáticos, que se individualizam e são capazes de regenerarem plantas completas (ANGELO et al., 2009). Seja na embriogênese somática direta ou indireta, o embrião segue a mesma sequência de desenvolvimento, contudo irão se diferir de embriões zigóticos por serem livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, não possuindo conexão com o tecido do explante inicial (GUERRA et al., 1999; ZIMMERMAN, 1993).

Segundo Carvalho et al. (2006) a embriogênese somática é uma opção para a propagação in vitro devido apresentar vantagens como: alta taxa de multiplicação, plantio direto da muda obtida via embriogênese somática, a planta é geneticamente igual a planta-mãe, através da técnica há possibilidade de transferência de genes através de desenvolvimento de plantas e propagação clonal e melhoramento.

De forma geral, para que ocorra o sucesso na embriogênese somática é necessário que ocorra a combinação de uma série de fatores relacionados dentre os quais: tipos de concentrações adequadas de reguladores de crescimento seja auxina ou citocininas; origem e idade fisiológica do explante a ser cultivado; estado fisiológico da planta matriz processo de

germinação em meios de cultura eficiente (DURZAN, 1988; FLOH et al., 2007; GUERRA et al., 1999; LEDO et al., 2002).

Segundo Guerra et al. (1999) a embriogênese somática consiste em dois ciclos repetitivos característicos: No primeiro ciclo, um explante da planta matriz é inoculado em meios de cultura contendo auxina, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a mais utilizada. Nas culturas são geradas complexos ou massas celulares pró-embriônicas, que por processos de embriogênese repetitiva, resultam em um ciclo repetitivo de divisões celulares, formando embriões somáticos globulares. No segundo ciclo, chamado de ciclo de maturação, esses pró-embriões são estimulados a prosseguir o seu desenvolvimento pela retirada da auxina do meio de cultura, ou pela inclusão de ácido abscísico (ABA), de citocininas e de agentes que promovam estresse osmótico. Nesta fase, as culturas são mantidas em condições de luminosidade. Esse ciclo de maturação forma embriões somáticos que podem ser convertidos em plantas. Para que ocorra a competência embriogênica é necessário que ocorra a desdiferenciação e posterior rediferenciação celular por meio de uma reprogramação genética, onde os fatores determinantes para que isso ocorra são o estágio fisiológico do explante, tipo e a concentração do regulador de crescimento que juntos atuarão como sinal químico para a ativação gênica diferencial (CHRISTIANSON; WARNICK, 1988; SUGIYAMA, 1999).

De acordo com Moura et al. (2009), a embriogênese somática vem sendo amplamente estudada em diversas palmeiras. Steinmacher et al. (2007 b), comenta que a ES é bastante utilizada, preferida em rotas regenerativas in vitro das palmeiras, devido essa via morfogênica aumentar o número de plantas regeneradas quando comparada à organogênese. Segundo Morcillo et al. (2007), é um método promissor para a multiplicação de dendzeiro, visto que através desse processo pode-se obter clones em escala comercial.

Em palmeiras alguns protocolos de embriogênese somática já foram feitos utilizando-se

preferencialmente, como explantes embriões zigóticos (LEDO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 1993), folhas e inflorescências imaturas (GUERRA; HANDRO, 1998; KARUN et al., 2004; SCHWENDIMAN et al., 1988; TEIXEIRA et al., 1994) além de ovários não fertilizados (PERERA et al., 2007).

Poucos registros são encontrados na literatura sobre a embriogênese somática com o *Elaeis oleifera*. O único trabalho descrito foi por Cid (1987), onde obteve embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Elaeis oleifera*. Chia et al. (2009), ao tentar induziu a embriogênese somática indireta, testou diferentes meios de culturas e concentrações do ácido 2,4,-D diclorofenoxiacético, em segmentos de folhas, inflorescências e embriões zigóticos obtendo somente o percentual de 0,6, 4,6 e 86% respectivamente de calos primários.

Ao contrário, diversos resultados sobre a cultura in vitro do *Elaeis guineensis* são relatados, dentre eles Corrêa (2014), que ao induzir a embriogênese somática em folíolos imaturos, observou a formação de embriões somáticos em meio com elevada concentração de 2,4-D (800 μM). Outros autores comentam que as concentrações de 2,4-D necessária para a indução da embriogênese varia entre 113 a 450 μM (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2013). Balzon et al. (2013), relata a indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos em *Elaeis guineensis* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG 1962) suplementado com auxina 2,4-D, obtendo uma frequência de 97,5% de embriões. Bonetti et al. (2016), por sua vez, relata a obtenção de embriões somáticos em meio Y3 acrescido ou não de 2,4-D (9 μM) + 1000 μM de putrescina (37,16 e 43,3% respectivamente).

Os estudos que descrevem as etapas durante a embriogênese somática indireta são restritos a poucas espécies de palmeiras. Silva et al. (2013), no gênero, *Elaeis* ao induzir embriogênese somática a partir do híbrido BRS Manicoré, observou que a maior taxa de indução de culturas embriogênicas foi obtida em 150 mg L⁻¹ de 2,4-D e que aos 14 dias de inoculação já se iniciam as primeiras divisões das células procambial. Após 135 dias

observam-se fases globulares dos embriões. Moura et al. (2009), constataram na embriogênese somática em *Acronomia aculeata* que após 50 dias de cultivo em meio de indução, o explante havia formado calo, com aspecto nodular, conferindo um modelo indireto. Esses mesmos autores evidenciaram, a partir de cortes histológicos, que as massas meristemáticas eram formadas por células pequenas, isodiamétricas, de citoplasma denso e núcleo evidente.

1.5 Fatores que auxiliam a embriogênese somática

Existem vários fatores que tem influência no processo de embriogênese somática, tais como o meio de cultivo, o tipo e a concentração de reguladores de crescimento, o genótipo, e a fonte de explante (VIÑAS; JIMÉNEZ, 2011). O efeito significativo do genótipo no sucesso da embriogênese somática sugere que fatores genéticos são primordiais na determinação do nível da resposta in vitro (HENRY et al., 1994; PAIM PINTO et al., 2011; SANÉ et al., 2012; SILVA et al., 2012). A influência do genótipo em relação à capacidade embriogênica é relatada na família Arecaceae, sendo as espécies mais estudadas *Phoenix dactylifera* (SANÉ, et al., 2012), *Elaeis guineenses* (SILVA et al., 2012) e *Bactris gasipaes* (STEIMACHER et al., 2011).

O uso das auxinas e citocininas estão associadas a indução da embriogênese somática, principais reguladores de crescimento envolvidos no controle da divisão celular e diferenciação dos tecidos (FEHÉR et al., 2003). A auxina mais utilizada na indução de embriogênese somática em palmáceas, pode ser citado o 2,4-D diclorofenoxiacético (GUEYE et al., 2009; LEDO et al., 2002; SALDANHA et al., 2006). Entretanto o Picloram e o Dicamba tem se mostrado eficientes (MACIEL et al., 2010; SANPUTAWONGE TE-CHATO, 2011; STEINMACHER et al., 2007a,b; STEINMACHER et al., 2011). A combinação de auxinas e citocininas na indução de embriogênese somática é relatada para *Elaeis guineensis* (RAJESH et al., 2003), *Cocos nucifera* (PÉREZ-NÚÑEZ et al., 2006) e *Phoenix dactylifera*

(ZOUINE et al., 2005).

No processo de embriogênese somática os diferentes meios de cultura utilizados diferem essencialmente na concentração dos macro e micronutrientes, vitaminas, compostos orgânicos, fonte de carbono e outras substâncias complexas, normalmente específicas para cada etapa do processo e para a espécie utilizada. As formulações de meio de cultura mais utilizadas para embriogênese somática em palmáceas compreendem o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) utilizado na embriogênese somática de *Elaeis guineensis* (BALZON et al., 2013; SILVA et al., 2012; THUZAR et al., 2011; STEIMACHER et al., 2011; WANG et al., 2006) e o meio Y3 (EEUWENS, 1976) em *Acrocomia aculeata* (MOURA et al., 2009) e *Cocos nucifera* (CHAN et al., 1998; PÉREZ-NÚÑEZ et al., 2006).

1.6 Estudos anatômicos

O estudo da anatomia permite conhecer a estrutura interna dos organismos vegetais, permitindo a descrição de células, tecidos e órgãos quanto a sua ontogênese, constituição e função (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2003). O uso das técnicas de análise anatômicas permite detalhar os eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas in vitro. As células vegetais ao serem expostas a essa nova condição artificial, podem expressar um potencial morfogênico que não se expressaria in vivo, com isso estudos histológicos podem ser realizados para a verificação e confirmação do desenvolvimento das gemas adventícias (organogênese) ou de embriões somáticos (embriogênese somática) e a definição da origem direta ou indireta (RODRIGUES et al., 2004).

Estudos histológicos vêm sendo desenvolvidos em diversas espécies com o objetivo de caracterizar o processo e as vias de regeneração de plantas in vitro (ALVES; XAVIER; OTONI, 2004; DIBAX et al., 2010).

A atividade das células competentes e as alterações histológicas associadas com a posição das células têm sido bastante estudadas durante a embriogênese somática. Durante a

indução da embriogênese somática de macaúba (*Acrocomia aculeata*), Moura et al. (2009) constataram que embriões somáticos obtidos a partir de embriões zigóticos, originava-se de células do procâmbio ou de células perivasculares. Estudos histológicos das culturas embriogênicas oriundas de embriões zigóticos de *Euterpe edulis* evidenciaram que a origem das massas meristemáticas foram a partir de tecidos da subepiderme (GUERRA; HANDRO, 1998).

A iniciação do desenvolvimento da embriogênese somática em *Eleais guineensis*, Silva et al. (2013), verificaram através das observações histológicas, que as primeiras divisões celulares ocorreram em células procambiais e nas parenquimáticas adjacentes ao tecido vascular.

Neste sentido, o acompanhamento e a identificação das estruturas presentes nos diferentes estágios durante a embriogênese somática, por meio de estudos anatômicos são necessários para melhor entendimento dos processos morfogênicos e maximização de protocolos eficientes de clonagem da espécie.

O estudo é exposto em dois capítulos, de acordo com as características estudadas. No primeiro capítulo (Capítulo I) foram apresentados: **Aspectos morfoanatômicos e histoquímico da semente de caiaué *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés Arecaceae**. No segundo capítulo (Capítulo II), foram descritos: **Eventos da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de caiaué *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés – Arecaceae**.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização geográfica da área de seleção das matrizes

O material utilizado para este estudo foi obtido de plantas pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da palma de óleo da Embrapa Amazônia Ocidental na Estação Experimental do Rio Urubu – CERU/Embrapa Amazônia Ocidental, localizado a 150 km ao

norte da cidade de Manaus no Estado do Amazonas, com acesso pela rodovia AM010 – km 87, distrito agropecuário da SUFRAMA (Superintendência da Zona Franca de Manaus), com latitude 2°35' S, longitude 59°28' W, e altitude 200 m. O Clima é do tipo Am (Classificação de Köppen), quente úmido, temperatura constantemente alta, valores médios de 31,2°C e 23,5°C para máxima e mínima, respectivamente, e precipitações muito elevadas (em torno de 2.200 mm ao ano). O Solo é do tipo Latossolo Amarelo de textura muito argilosa (GUILLAUMET et al., 2003).

2.2 Isolamento e polinização de inflorescências masculinas e femininas

Por se tratar de um banco ativo de germoplasma, realizou-se isolamento e polinização de inflorescências masculinas e femininas de algumas plantas matrizes de *Elaeis oleifera* para obtenção das sementes, protocolo seguido por Cunha et al. (2007). As inflorescências foram isoladas com o auxílio de sacos de lona espessos nº8, com a função de impedir a passagem de insetos e contaminação com pólen indesejado. Foram utilizados sacos com dimensões de 70 cm de altura e 60 cm de largura e uma janela de plástico de 2 mm de espessura com dimensões de 14 cm de altura e de 12 cm de largura, transparente utilizada para o acompanhamento do desenvolvimento da inflorescência isolada e identificação do momento adequado da polinização. Os isolamentos foram realizados no mínimo dez dias de antecedência da antese, caso nesse período ocorresse à antese o isolamento era eliminado.

As inflorescências masculinas foram coletadas no momento em que as flores apresentaram antese completa da base da inflorescência até o meio ou 2/3 ou mais do comprimento da espiguetta. Em sala climatizada para a secagem as inflorescências permaneceram por duas a três horas. Após esse período bateu-se na inflorescência ensacada para que o pólen desprendesse. Na caixa de manipulação os pólenes foram colocados em uma peneira coberta com papel filtro e sílica gel onde permaneceram por 18 horas. Após esse período efetuou-se o peneiramento e os pólenes ficaram armazenados por mais 24 horas. O

acondicionamento foi de 0,0625 g a 0,125 g de pólen em eppendorf®, quantidade suficiente para realizar posterior polinização.

No isolamento das inflorescências femininas retirou-se os espinhos das folhas e abaixou-se a folha da inflorescência liberando espaço para seu crescimento. Em seguida foi removida as espadas da base e a que envolve o pedúnculo. Para evitar insetos foi colocada uma porção de algodão com inseticida no pedúnculo, em seguida a inflorescência foi revestida com o saco de isolamento, dobrou-se a boca ao redor do pedúnculo e amarrrou-se com uma tira de borracha. A polinização foi realizada quando as flores apresentaram os estigmas receptivos, identificadas pela coloração creme, geralmente no segundo dia após o início da antese.

Utilizou-se 0,0625 g de pólen por inflorescência misturado com 4 g de talco inerte, usado como agente de dispersão. A quantidade de pólen foi colocada em uma pisseta, essa manipulação foi realizada dentro de uma caixa que foi limpa e desinfetada. No campo, aplica-se inseticida aerosol ao redor do saco de isolamento para afastar os insetos, limpa-se a janela com álcool, faz-se um furo suficiente para introduzir o bico da pisseta, ejetou-se o pólen no interior do saco em diferentes posições, para assegurar boa dispersão do pólen. A retirada do saco de isolamento foi realizada 15 dias após a polinização, momento no qual os estigmas apresentaram coloração escura.

Realizou-se a colheita dos cachos cinco meses após a polinização, com observações do desprendimento natural de três a cinco frutos maduros do cacho. Seguida à colheita, os frutos foram retirados manualmente do cacho, o mesocarpo foi extraído em despoldadora centrífuga elétrica. Imediatamente após a despolpa, os diásporos foram acondicionados em embalagem de polímero inerte (sacos plásticos) e levados para o Laboratório de Botânica Agroflorestral – LABAF da Faculdade de Ciências Agrárias – FCA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM ou Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – Embrapa Amazônia Ocidental.

- **Teste de viabilidade polínica**

A viabilidade dos pólenes foi realizada pelo protocolo descrito por Cysne et al. (2015).

3. REFERÊNCIAS

- ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- ANGELO, P. C. S.; LOPES, R.; MORAES, L. A. C.; CUNHA, R. N. V. Embryogenic calli induced in interspecific (*Elaeis guineenses* x *E. oleifera*) hybrid zygotic embryos. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Viçosa, MG, v. 9, p. 274-277, mar. 2009.
- APPEZZATO DA GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Anatomia vegetal. Editora UFV, Brasil, 438.2003.
- 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. Características genético-ecológicas de populações naturais de caiaué *Elaeis oleifera* (HBK) Cortés na Amazônia brasileira. 1986. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 1986.
- 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, 37(8), 1105-1114. 2002.
- BARCELOS, E.; CUNHA, R. N. V.; NOUY, B. Recursos genéticos de caiaué. In: SOUSA, N. R.; SOUZA, A. G. C. Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental. Manaus, Amazonas, AM: Embrapa Amazônia Ocidental, Cap. 3, p.41-68, 2001.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. *Seed science research*, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.
- BLANK, S. DE. A Reconnaissance of American Oil Palm. Trop. Agric. Trin. 4-6: 90- 101, 1952.
- BONETTI, K. A. P.; NESI, J.; QUISEN, R. C.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*). African Journal of Biotechnology, 15(37), 2028-2037, 2016.
- CAMARERO, P. Cultura do dendê: produção, industrialização e aplicações. [S. l.: s. n.] 169p. Não paginado. Mimeografado. 1981
- CARVALHO, J; LIMA, M.; AIRES, P.; VIDAL, M.; PIMENTEL, N. Embriogênese Somática. Campina Grande, 35 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 152), 2006.
- CHAN, J. L.; SAÉNZ, L.; TALAVERA, C.; HORNUNG, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 17: 515-521, 1998.

CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; ROCHA, R. N. C. Germinação in vitro de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. *Ciência Rural*, 39(5), 1569-1571, 2009.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis in vitro as a developmental process. *HortScience*, v. 23, p. 515-519, 1988.

CID, L. P. B. Regeneração de plantas do *Elaeis oleifera* e de seu híbrido com *Elaeis guineensis* via embriogênese somática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 22(1), 109-113, 1987.

CLEMENT, C. R.; LLERAS, E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: Acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociência*, v. 9, n. 1-2, p. 67-71, 2005.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. The oil palm. 4. ed. Great Britain: Blackwell Science, 2003.

CORRÊA, T. R. Clonagem e controle genético da embriogênese somática em palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tese. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Viçosa, MG, 2014. xi, 57f. : il 2014.

COUTURIER, G.; OLIVEIRA, M.; BESERRA, P. Insetos visitantes e polinizadores em palmeiras nativas da Amazônia. *Pesquisa em Andamento*, n. 1, p. 1-3, 1999.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; DANTAS, J. C. R.; ROCHA, R. N. C. Procedimentos para produção de sementes comerciais de dendezeiro na Embrapa Amazônia Ocidental. Embrapa Amazônia Ocidental-Documents (INFOTECA-E), 2007.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R. BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 4p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Comunicado técnico, 85), 2010.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M. R. L.; TEXEIRA, P.C.; ROCHA, R. N. C. Produção de híbridos interespecíficos dendê (*Elaeis guineenses*) x caiaué (*Elaeis oleifera*). In. III Congresso brasileiro de melhoramento de plantas, Gramado, RS, 2005.

CUNHA, R.N.V.; LOPES, R.; ROCHA, R. N. C.; LIMA, W. A. A.; TEIXEIRA, P. C., BARCELOS, E.; RODRIGUES, M. R. L. Domesticação e melhoramento de caiaué. Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas. Editora da Universidade de Viçosa, Viçosa, p. 275-296, 2009.

CYSNE, A.; KRUG, C.; GOMES, F. Teste de viabilidade polínica em dendezeiro: uma nova proposta. Embrapa Amazônia Ocidental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E). 2015.

DIBAX, R.; QUISEN, R. C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant Regeneration from Cotyledonary Explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and Histological Study of Organogenesis in Vitro. *Brazilian Archives of Biology Technology*, Curitiba, v. 53 n. 2, p. 311-318, 2010.

DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. Genera palmarum. Evolution and classification of the palms. 2nd ed. Royal Botanic Gardens: Kew Publishing 2008.

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, v.6, p. 341-378, 1988.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissues explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera* L.) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, v.36 n.1, p.23-28, 1976.

ETIENNE, H.; SOTTA, B.; MONTORO, P.; MIGINIAC, E. CARRON, M.P. Relation between exogenous growth regulators and endogenous indole-3- acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Science*, v.88, p.91-96, 1993.

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

FINNCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, v.171, p.501-523, 2006.

FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. *Rer. Bras. Horticultura Ornamental*, v.13, p. 1992-2001, 2007.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 05 Jul. 2018.

FRANZ J, K. Processamento Industrial de Cachos de Dendê para Produção de Óleos de Palma e Palmiste. In: VIÉGAS, I. J. MULLER, A, A Cultura de Dendzeiro na Amazônia Brasileira. Belém: EMBRAPA, 361-363, 2000.

GROTH, D.; LIBERAL, O.H.T. Catalogo de identificação de sementes. Campinas: Fundação Cargill, 182p. 1988.

GUERRA, M. P.; TORRES, A C.; TEIXEIRA, J. G. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, v. 2, p. 533-568, 1999.

GUERRA, M.; P., HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. *Journal of Plant Research*, 111: 65-71, 1998.

GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; TRANBARGER, T. J.; SANE, D.; TREGGAR, J. W.; BORGEL, A.; VERDEIL, J. L. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99:35-45, 2009.

- GUILLAUMET, J. L.; RODRIGUES, M. R. L.; MIRANDA, I. P. A. A Estação Experimental do Rio Urubu - Embrapa Amazônia Ocidental. In: Miranda, I.P.A.; Guillaumet, J.L.; Barbosa, E.M.; Rodrigues, M.R.L.; Silva, M.F.F. (Eds). Ecossistemas florestais em áreas manejadas na Amazônia. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM. p.30-64, 2003.
- GUPTA, P. K.; PULLMAN, G.; TIMMIS, R.; KREITINGER, M.; CARLSON, W.C.; GROB, J.; WELTY, E. Forestry in the 21st Century. Bio/Technology 11:454-459.1993.
- HARTLEY, C.W.S. The oil palm. 3a ed. Le palmier à huile. In: Tropical agriculture. Serries (GBR). Essex (GBR): Longman. 761p. 1988.
- HARTLEY, C.W.S.; The Oil Palm. 3rd Edn. Longman, London and New York, pages: 806, 2000.
- HENDERSON, A. The palms of Amazon. New York: Oxford University Press, 362p.1995.
- HENRY, Y.; VAIN, P.; BUYSER, J. Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. Euphytica, 79:45-58, 1994.
- HUSSEY, G. An analysis of the factors controlling the germination of seed of the oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.). Annals of Botany, v. 22, n. 86, p. 259-284, 1958.
- KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). Current Science, 86(12), 2004.
- LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADI, A.K.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, M.S.P.; FILHO, S.M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. Revista Brasileira de Fruticultura, 24: 601-603, 2002.
- LEVERMANN, R. A.; SOUZA, J. P. M. Óleo de palma: O crescimento da indústria global. Agroanalysis, fev. 2014.
- LEITMAN, P.; SOARES, K.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R.C. Areaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB44110>>.
- LIMA, W. A. A.; GREEN, M.; ZEVIANI, W. M.; LOPES, R.; RIOS, S. A. Teor de água e tempo de exposição ao tratamento térmico na germinação de sementes de caiaué. Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 60(2), 192-198. 2017.
- LOPES, R.; CUNHA, R.N.V.; RESENDE, M.D.V. Produção de cachos e parâmetros genéticos de híbridos de caiaué com dendezeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.47, p.1496-1503, DOI: 10.1590/S0100-204X2012001000012. 2012.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; COSTA, J.T.M.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Plantarum, 416p., 2004.

- LOW, E.; ALIAS, H.; BOON, S.; SHARIFF, E.M.; TAN, C.A.; OOI, L.C.; CHEAH, S., RAHA, A.; WAN, K.; SINGH, R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. *Plant Biology*, 8:62. 2008.
- LUCCHINI, F.; SANTOS, M. M.; MORIN, J. P.; SILVA, E. B.; Overal, W. L. Curculionídeos polinizadores do "caiaué", *Elaeis oleifera*, sua importância e distribuição geográfica no Estado do Amazonas, Manaus, EMBRAPA-CNPSD. 1984.
- MACIEL, S. D. A.; JUNIOR, F.; POETA, P. C.; SILVA, R. A. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32(2), 263-267, 2010.
- MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, 2005.
- MEUNIER J.; HARDON, J.J. Interspecific hybrids between *Elaeis guineensis* and *Elaeis oleifera*. In: Corley, R.H.V.; Hardon, J.J.; Wood, B.J. Oil palm research. Elsevier Scientific Publishing Company. 532pp, 1976.
- MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A. Guia de identificação das palmeiras de um fragmento florestal urbano. Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas no Amazonas. 228p. 2006.
- MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M.N.S. Frutos de palmeiras da Amazônia. Manaus: MCT/INPA, 120p. 2001.
- MORCILLO, F.; GALLARD, A.; PILLOT, M.; JOUANNIC, S.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; COLLIN, M.; TREGGAR, J. W. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. *Planta*, 226(6), 1353-1362, 2007.
- MOURA, E.F.; MOTOIKE, S.Y.; VENTRELLA, M.C.; JUNIOR, A.Q.S.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, 119: 447-454, 2009.
- MURASHIGE, R.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- MUNGUIA, O.; COLLINS, J. Óleo de ojon. *Revista Passo a Passo*, n. 65, p. 10, 2006.
- O'BRIEN, C. W.; BESERRA, M.; COUTURIER, G. Taxonomy of *Couturierius*, new genus and *Grasidius*, genus new to South America, palm flower weevils in the Derelomini [Coleoptera, Curculionidae]. *Revue Française d'Entomologie*, 26(4), 145-156. 2004.
- ODETOLA, J.A. Studies on seed dormancy, viability and germination in ornamental palms. *Principes*, 31: 24-31, 1987.
- OOI, S. C.; SILVA, E. B.; MULLER, A. A.; NASCIMENTO, J. C. Oil palm genetic resources native *E. oleifera* populations in Brazil offer promising sources. *Pesquisa Agropecuária*

Brasileira, Brasília, v. 16, n. 3, p. 385-395, maio/jun. 1981.

PALMWEB: Palms of the World Online. Published on the internet . Acesso em: 03 de julho de 2018. Disponível em: <http://palmweb.org/node/9>

PAIM PINTO, D. L. P.; ALMEIDA, A. M. R.; RÊGO, M. M.; SILVA, M. L.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107:521-530, 2011.

PERERA, P. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOOM, L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 26:21–28, 2007.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SAENZ, L.; GONZÁLEZ, T.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 42(1), 37-43, 2006.

RAJESH, M.K.; RADHA, E.; KARUN, A.; PARTHASARATHY, V.A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm - the effect of exogenous polyamines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75: 41-47, 2003.

RAO, V.; CHANG, K. C. Anthesis and fruit set in *Elaeis oleifera* (HBK) [Humboldt Bopland Kunth] Cortes. *PORIM Bulletin (Malaysia)*, 1982.

RODRIGUES, L.R.; OLIVEIRA, J.M.S.; MARIATH, J.E.deA. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 2, n. ¾, p. 159-167, 2004.

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. In vitro morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* M. (Arecaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 6, p. 228-235, 2006.

SANÉ, D.; BERTOSSI, F. A.; DIATTA, L. I. D.; GUÈYE B.; DAHER, A.; SAGNA, M.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Influence of Growth Regulators on Callogenesis and Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian Cultivars. *The Scientific World Journal*, Article ID 837395, 2012.

SANPUTAWONG, S.; TE-CHATO, S. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of in vitro oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Agricultural Technology*, 7(2), 531-545, 2011.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; GUEDES, R.S.; FERMINO, P.C.P.; SILVA, T.L.; COSTA, F.H.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 46:378-385, 2010.

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

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*, 111:59-67, 2012.

SILVA, R.C.; LUIS, Z.G.; SCHERWINKI-PEREIRA, J.E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Growth Regul.* 72, 67-80, 2013.

SOLANO, W. Efecto de las Características de Cultivo en Suspensión Celular y en Biorreactor con Inmersión Temporal sobre la Propagación masiva de *Coffea arábica* por Embriogénesis Somática. Tesis Licenciatura en Ingeniería en Agronomía com énfasis en Fitotecnia. Turrialba, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 87 p. 2001.

STEINMACHER D. A.; GUERRA M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A. Temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Ann Bot* 108:1463-1475, 2011.

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*. 89:15-22, 2007 b.

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*, 100(4), 699-709, 2007a.

SUGIYAMA, M. Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Plant Biology*. v.2, p.61-64, 1999.

TAM, T. K.; LIM, C. S.; YEOH, G. H.; OOI, S. C. The oil and other characteristics of interspecific (*Elaeis guineensis* X *Elaeis oleifera*) hybrids planted in Malaysia and their significance for future breeding programmes. 27-38. 1977.

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHLL, M. R.; KIRB, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 227-233, 1993.

TROPICOS. ORG. MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/50231656>. Acesso em: 20 JULHO 2018.

THE ECONOMIST. The campaign against palm oil: The other oil spill. Disponível em <http://www.economist.com/node/16423833>. Acesso em: 15 de Abril de 2018.

THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. *Acta physiologiae plantarum*, 33(1), 123-128, 2011.

TORRES A. C.; CALDAS L. S.; BUZZO J. A. (Eds). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. v.1 e 2. Brasília, Embrapa, 864p. 1998.

- TOMLINSON, P. B. Systematics and ecology of the Palmae. Annual review of ecology and systematics, v. 10, n. 1, p. 85-107, 1979.
- VALLEJO, R. G.; CASSALETT, D. C. Perspectivas del cultivo de los híbridos interespecíficos de noli (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortez) x palma africana de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Colombia. Revista Instituto Colombiano de Agricultura, v. 10, n. 1, p. 19-35, 1975.
- VIEGAS, I.; MULLER, A. A Cultura do Dendzeiro na Amazônia Brasileira, 1ª ed., Embrapa Amazônia Oriental. Belém, Pará, 2000.
- VIÑAS, M.; JIMÉNEZ, V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). Revista Colombiana de Biotecnología, 13(2), 229, 2011.
- VON ARNOLD, S. S. I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69:233-249, 2002.
- WANG, H. C.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. Biologia Plantarum, v. 50, n. 2, p. 279-282, 2006.
- WESSELS BOER, J. G. The indigenous palms of suriname. E.J. Brill, Leiden. 1965.
- WILLIAMS, E.S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Ann. Bot., 57:443-462, 1986.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant cell, Oxford, v. 5, p1411-1423, Oct. 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, 82(1), 83-92. 2005.

CAPÍTULO I

ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E HISTOQUÍMICO DA SEMENTE DE CAIAUÉ *Elaeis oleifera* (KUNTH) CORTÉS ARECACEAE

Elaborado de acordo com as normas revista Journal of Seed Science

**Aspectos morfoanatômicos e histoquímico de semente de Caiaué *Elaeis oleifera* (Kunth)
Cortés Arecaceae**

**Suelen Cristina de Sousa LIMA^{1*}; Regina Caetano QUISEN²; Maria Silvia de
MENDONÇA³**

RESUMO

Elaeis oleifera é uma palmeira nativa das Américas cujo óleo da polpa do fruto contém elevadas quantidades de ácidos graxos insaturados. As pesquisas com a espécie são motivadas, principalmente, pelo interesse em genes que conferem resistência a pragas e doenças e reduzido crescimento vertical do estipe para uso no melhoramento genético do dendezeiro (*Elaeis guineensis*), principal fonte mundial de óleo vegetal. O cultivo de híbridos entre essas espécies (HIE OxG) é realizado principalmente pela resistência desse material a anomalia denominada "amarelecimento fatal" do dendezeiro, presente no caiaué e transmitida aos híbridos F1. A propagação de *Elaeis oleifera* é realizada por sementes que exigem procedimentos para superação da dormência para obtenção de alta e uniforme taxa de germinação. Conhecer as estruturas das sementes bem como os compostos estruturais é importante para entender o processo da germinação. Após coleta das sementes realizou-se observações, descrevendo a forma, coloração e textura. O estudo anatômico foi feito pelo método de inclusão em resina. Foram aplicados testes histoquímicos para detecção dos principais metabólitos. As sementes apresentaram variação biométrica e morfológica com conteúdo proteico e lipídico. Embrião é reto, em posição apical, pequeno, com polo radicular indiferenciado e polo caulinar com três primórdios foliares. O estudo morfoanatômico e histoquímico da semente de *Elaeis oleifera* identificou características importantes para entender e otimizar o processo germinativo da espécie, fornecendo subsídio para o desenvolvimento de novos métodos de germinação, necessário para a manutenção e conservação de progênies da espécie na condução de programas de melhoramento genético e produção de sementes híbridas.

Palavras-chave: morfologia, anatomia, palmeira.

1* Autor para correspondência: Doutoranda em Agronomia/Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Lab. Botânica Agroflorestal/CEP: 69067-005, Manaus, AM – Brasil.: suelen.biologa23@gmail.com

2 Doutora Pesquisadora Embrapa Florestas - Colombo, Paraná

3 Professora Titular, Doutora. LABAF/FCA/UFAM - Universidade Federal do Amazonas

**Morphoanatomic and histochemical aspects of seed Caiáue *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés
Areaceae**

**Suelen Cristina de Sousa LIMA^{1*}; Regina Caetano QUISEN²; Maria Silvia de
MENDONÇA³**

ABSTRACT

Elaeis oleifera is a native palm in the Americas whose fruit pulp oil contains high amounts of unsaturated fatty acids. Research on the species is mainly motivated by the interest in genes that confer resistance to pests, diseases and reduced vertical growth of the sprig to use in the genetic improvement of the oil palm (*Elaeis guineensis*), the world's leading source of vegetable oil. Hybrid cultivation among these species (HIE O×G) are carried out mainly by the resistance of this material to the anomaly called Fatal yellowing of the oil palm, present in the Caiáué and transmitted to F1 hybrids. The propagation of the Caiáué is performed by seeds that require procedures to overcome dormancy to obtain a high and uniform germination rate. Knowing the structure of seeds as well as the structural compounds is important to understand the germination process. After the seeds were collected, observations were made, describing the shape, color and texture. The anatomical study was done by the inclusion method in resin. Histochemical tests were performed to detect the main metabolites. The seeds showed biometric and morphological variation with protein and lipid content. Embryo is straight, apical, small, with protein and lipid contents, undifferentiated poles and three-leaf poles. The morphological and histochemical study of the *Elaeis oleifera* seed identified important characteristics to understand and optimize the germination process of the species, providing subsidy for the development of new germination methods, necessary for the maintenance and conservation of the progenies of the species in the conduction of breeding programs and production of hybrid seeds.

Keywords: morphology, anatomy, palm tree

INTRODUÇÃO

A família Arecaceae, está entre os grupos de plantas mais importantes da região Amazônica (Passos e Mendonça, 2006). As palmeiras são importantes para a manutenção da fauna e flora nativa, interagindo com outras espécies de plantas e servindo de alimento e abrigo para animais (Oliveira et al., 2010). Tem grande utilidade para as populações tradicionais, que utilizam seus frutos e palmito como fonte de alimento, sementes e palha para a produção de artesanato, madeira e palha para a construção de habitações, entre outras aplicações, além dos óleos com amplo uso na indústria de alimentos, cosméticos e remédios (Oliveira e Rios, 2014). Muitas palmeiras têm importante participação econômica no mercado nacional e internacional no comércio de polpa, palmito, fibras e óleo (Uhl e Dransfield, 1987), com destaque para o dendezeiro, principal fonte mundial de óleo vegetal (Usda, 2017).

Elaeis oleifera (Kunth) Cortés, conhecida vulgarmente como caiaué no Brasil, pertence ao mesmo gênero do dendezeiro africano, é nativa das Américas, com ocorrência relatada do Sul do México até o Leste do Estado do Amazonas, incluindo os países: Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname e Venezuela (Corley e Tinker, 2003; Cunha et al., 2012; Leitman et al., 2018; Meunier, 1975). No Brasil, ocorre com mais frequência na região central do Estado do Amazonas, em locais úmidos e altos de terra firme (Oliveira e Rios, 2014). A espécie não é cultivada em escala comercial e sua exploração é realizada por comunidades tradicionais somente para autoconsumo (Corley e Tinker, 2015).

Além das populações naturais, plantios da espécie são realizados com fins experimentais e para manutenção de germoplasma, principalmente por representar recurso genético de alto interesse para os programas de melhoramento genético do dendezeiro (Arias et al., 2015). As características de interesse na espécie são resistência a pragas e doenças, com destaque para o " amarelecimento fatal ", menor taxa de crescimento vertical da estipe e óleo

de qualidade diferenciada (Rios et al., 2012; Valois, 1997).

Diversos programas de melhoramento já disponibilizaram no mercado híbridos interespecíficos do caiaué com o dendezeiro (HIE OxG) e plantios comerciais desse material são encontrados, principalmente, na Colômbia, Brasil e Equador, entre outros. O programa de melhoramento genético do dendezeiro conduzido pela Embrapa lançou em 2009 o primeiro HIE OxG nacional registrado como cultivar no Brasil, denominado BRS Manicoré (Cunha e Lopes, 2010), que é cultivado principalmente em regiões do estado do Pará onde a ocorrência da anomalia amarelecimento fatal inviabiliza o cultivo do dendezeiro africano.

A reprodução de populações ou progênies de *Elaeis oleifera* é realizada por via sexuada, ou seja, por sementes, necessária para manutenção e conservação *ex situ* do germoplasma da espécie, na condução dos programas de melhoramento genético e na formação dos campos de genitores para produção comercial de sementes híbridas. Em condições naturais a germinação das sementes do gênero *Elaeis*, ao qual pertencem o caiaué e o dendezeiro, em geral, é baixa e desuniforme, podendo demorar anos (Hussey, 1958). Com uso do método de superação de dormência por tratamento térmico são obtidas altas e uniformes taxas de germinação dessas sementes (Lima et al., 2017), no entanto, aumentam os custos de produção destas sementes, principalmente porque requerem períodos de aquecimento entre 60 e 75 dias, durante o qual deve-se manter temperatura constante de 39 °C +/-2 °C.

O estudo morfoanatômico e histoquímico da semente irão identificar peculiaridades que existem na semente, que certamente contribuirão para o desenvolvimento de novos métodos de germinação. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo descrever a morfoanatomia e a histoquímica da semente de *Elaeis oleifera*, fornecendo auxílio na compreensão da sua estrutura, como subsídio para buscar novas técnicas de produção de mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos foram obtidos de plantas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da palma

de óleo da Embrapa Amazônia Ocidental, na Estação Experimental do Rio Urubu – CERU, localizado a 150 km ao norte da cidade de Manaus no Estado do Amazonas, com latitude 2°35' S, longitude 59°28' W, e altitude 200 m.

A produção dos frutos foi realizada nos anos de 2016 e 2017. Para manter a identidade genética das sementes foram realizadas polinizações controladas conforme descrito por Cunha et al. (2007). Como genitores masculinos e femininos foram utilizadas plantas de *Elaeis oleifera* da origem Manicoré. Os cachos foram colhidos em torno de cinco meses após a polinização, quando atingiram a maturação fisiológica, determinada indiretamente pelo desprendimento natural de três a cinco frutos maduros, conforme tem sido adotado na produção comercial de sementes, e processados para obtenção das sementes de acordo com procedimentos apresentados por Lima et al. (2014). Após o beneficiamento obteve-se os diásporos, formados pelo endocarpo e a semente verdadeira (endosperma+embrião) (Lima et al., 2014), que foram acondicionados em sacos de polietileno e levados para o Laboratório de Botânica Agroflorestal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas para realização do estudo.

Morfologia e anatomia das sementes

No laboratório, os diásporos foram prensados em uma morsa para quebra do endocarpo e retirada da semente. Em seguida as sementes foram cortadas longitudinalmente com o auxílio de uma faca. Foram observadas a coloração, consistência e forma do tegumento, endosperma e embrião com o auxílio da lupa e microscópio Olympus sz40.

Para análise biométrica foram misturados 100 sementes de três indivíduos, usando paquímetro digital (0,01 mm) para verificação do comprimento e diâmetro (basal e apical) e balança de precisão (0,0001 g) para determinação da massa individual.

Considerou-se como comprimento a região entre a porção basal e a apical e para a

largura foi tomada a parte intermediária das sementes (Brasil, 2009).

O estudo anatômico do tegumento e endosperma, foram realizados cortes de material fresco, obtidos em micrótomo de mesa, conforme técnicas usuais em anatomia vegetal. Os embriões foram fixados em FAA 70% (formalina, ácido acético e álcool etílico) (Kraus e Arduin, 1997), desidratados em série etílica (70%-95%), embebidos em 2-hydroxyethyl-methacrylate (Historesin[®] Leica), e emblocados de acordo com as instruções do fabricante. O material emblocado foi cortado em micrótomo rotatório manual com espessura de 5 a 7 µm e corados com azul de toluidina 0.5% em tampão citrato buffer, pH 4.0 (O'Brien et al., 1964), as lâminas montadas em água (Genovese-Marcomini et al., 2013).

Os parâmetros empregados nas descrições morfoanatômicas e os termos colocados nas estruturas estão de acordo com os trabalhos de Dransfield et al. (2008), Werker (1997), Tomlinson (1990) e Martin (1946).

Análise centesimal e histoquímica da semente

As análises da composição centesimal para determinar em porcentagem a umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos foram realizadas de acordo com metodologia descrita por (Horwitz e Latimer, 2000; Lutz, 1985).

Os testes histoquímicos do tegumento endosperma e embrião foram aplicados em cortes de material fresco, obtidos em micrótomo de mesa, conforme técnicas usuais em anatomia vegetal. Foram aplicados os testes de Lugol, para detecção de amido (Jensen, 1962); Xilidine Ponceau para detecção de proteínas totais (O'Brien e McCully, 1981); Vermelho Sudan III para detecção de lipídeos totais (Brundett et al., 1991); Vermelho de Rutênio para detecção de pectinas e mucilagens (Johansen, 1940); Cloreto de Ferro III para detecção de compostos fenólicos gerais (Gabe, 1968); Reagente de Wagner para detecção de alcalóides (Furr e Mahlberg, 1981) e floroglucina para detecção de lignina (Johansen, 1940).

As visualizações e fotomicrografias referentes ao estudo anatômico e histoquímico foram obtidas por meio microscópio óptico Zeiss Primo Star com câmera fotográfica digital acoplada Canon Power Shot A650 IS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes apresentam em média 14,15 mm de comprimento, 10,12 mm de diâmetro apical, 10,75 mm de diâmetro basal e 0,93 g de massa fresca (Tabela 1). A variável com maior amplitude de variação foi a massa da semente (CV = 41,9%), corroborando com os resultados obtidos por Camillo et al. (2014), que analisando característica de sementes de cachos de 18 diferentes plantas de *Elaeis oleifera* também verificaram ser a massa da semente a característica com maior amplitude de variação (31,9%). A massa média das sementes verificada no presente estudo, 0,93 g, também foi similar a média verificada por Camillo et al. (2014), 0,9 g, indicando que os cachos amostrados para o estudo representam bem os valores médios das características das sementes para a espécie.

A massa das sementes, além de ser uma variável descritiva utilizada para caracterizar as sementes da espécie, tem sido relacionada em algumas espécies com as taxas de germinação. Moura et al. (2010) indicam relação entre tamanho e massa das sementes da palmeira *Butia capitata*, sementes com maior tamanho e massa apresentaram altas taxas de germinação. Estudando sementes de *Archontophoenix cunninghamii* Pivetta et al. (2008) observaram relação entre o tamanho das sementes e o desenvolvimento de parte aérea e raiz nas plântulas após a germinação, relação também descrita por Reis et al. (2010) para sementes de *Copernicia prunifera*.

A relação entre as medidas longitudinais e transversais indicam variação no formato das sementes de *Elaeis oleifera*, sendo observadas sementes achatadas dorso ventralmente, ovadas ou oblongas (Figura 1a).

O tegumento apresenta coloração marrom, com extensões vasculares em sua superfície

de tonalidade mais clara e poro micropilar puntiforme (Figura 1-a). Em sementes de *Oenocarpus minor* ocorre variação em sua forma e mesma coloração do tegumento (Mendonça et al., 2008). Verifica-se tal coloração do tegumento em *Astrocaryum aculeatum* (Elias, 2011) e *Attalea maripa* (Matos, 2010).

O endosperma é branco, de aspecto oleoso, sólido, abundante, está em contato direto com o tegumento (Figura 1-b), característica também observada por Oliveira et al. (2013) em *Butia capitata* e Souza et al. (2016) em *Acrocomia aculeata*.

O embrião é reto e ocupa na semente uma posição apical. Apresenta duas regiões distintas separadas por uma leve constrição: região proximal, porção mais estreita de coloração amarelo-esbranquiçada e a região distal, porção mais alargada de cor branco-pálida (Figura 1-c). Segundo Tomlinson (1990), os embriões de sementes de palmeiras apresentam uma região proximal, que aloja o eixo embrionário, e uma região distal, que corresponde ao limbo cotiledonar. Em algumas palmeiras observam-se que as regiões proximal e distal podem ser distinguíveis pela diferença na tonalidade da coloração como verificado em *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2010), *Mauritia flexuosa* (Silva et al., 2014) e *Butia capitata* (Oliveira et al., 2013). Na palmeira *Bactris gasipaes* o embrião apresenta coloração homogênea, com região distal e proximal distintas morfologicamente (Nazário et al., 2013). Coloração não observada em *Attalea maripa* (Araújo et al., 2000), devido não se distinguir nitidamente estas regiões proximal e distal dada a coloração uniforme do embrião, contudo vislumbra-se uma tênue constrição na região da curvatura. Nota-se que as regiões proximal e distal podem ser distinguíveis no embrião de algumas espécies de palmeiras pela diferença na tonalidade da coloração e/ou por uma constrição. Os embriões das palmeiras podem ter diferente formas, como observado em *Syagrus oleracea* (Batista et al., 2011), onde o embrião é periférico, reto e pouco diferenciado. Em *Bactris marajá* (Rodrigues et al., 2015) o embrião é cônico, pequeno, de coloração branco-leitosa homogênea. Aguiar e Mendonça (2003)

descrevem o embrião de *Euterpe precatoria* como indiviso e cônico, apresentando diferente coloração entre região distal e proximal.

O tegumento é constituído por células com tamanho e formas variadas, em vários estratos (Figura 2-a). As paredes das células do tegumento são lignificadas (Figura 2-b), característica que pode atuar como regulador da germinação, protegendo o embrião durante o processo de dispersão da sementes.

O endosperma é formado por células de forma arredondada com paredes espessas, sem espaços intercelulares e ocupam quase todo o interior da semente (Figura 2-c). Essas paredes celulares são tipicamente espessadas devido à deposição de polissacarídeos de reserva na forma de mananos como observado em *Euterpe edulis* (Panza et al., 2004), *Washingtonia filifera* (De Mason, 1986) e *Phoenix dactylifera* (De Mason et al., 1983). Entretanto em *Acrocomia aculeata* as paredes celulares não apresentam demasiada espessura, não obstante, são notadas as paredes celulares bem como lamela media constituídas por pectinas, as quais também são identificadas em pequenas quantidades na parede interna (Moura et al., 2010).

O embrião é revestido pela protoderme formada por células justapostas, paredes retas e núcleo evidente (Figura 3-a e 4-b). Apresenta na região proximal o eixo embrionário de posição oblíqua composto por dois polos meristemáticos, o polo radicular e o polo caulinar (plúmula) (Figura 3-c e 4-a). Na região do polo caulinar que corresponde à plúmula há três primórdios foliares que formarão o primeiro e segundo catafilo e o eofilo, sequencialmente (Figura 3-d e 4-a), revestidos por uma protoderme, como observado em *Acrocomia aculeata*, *Euterpe precatória*, *Syagrus inajai* (Souza et al., 2017; Aguiar; Mendonça, 2003; Genovese-Marcomini et al., 2013). A fenda cotiledonar é evidenciada na direção do ápice dos primórdios foliares, através da qual ocorrerá a emergência plumular na ocasião da germinação (Figura 3-b).

O polo radicular localiza-se na região central e periférica da região proximal do embrião

(Figura 3-b), onde um grupo de células iniciais que posteriormente originarão a protoderme, meristema fundamental e procambio (Fig. 3d-e). A região distal, que corresponde ao limbo cotiledonar contribuem com a função haustorial, possuindo superfície irregular e feixes provasculares corroborando com o observado em *Acrocomia aculeata* e *Syagrus inajai* (Genovese-Marcomini et al., 2013; Ribeiro et al., 2012).

O promeristema fundamental é composto por células com diâmetro maior em relação às da região proximal, com vários feixes provasculares (Figura 4-d) direcionados para a periferia, próximo a protoderme, como observado em *Syagrus inajai*, onde os feixes provasculares se tornavam progressivamente periféricos (Genovese-Marcomini et al., 2013).

As sementes apresentaram umidade de 25,92% (Tabela 2). Marcos-Filho (2015), relata que o teor de água do óvulo recém fecundado é de no mínimo 80%. Em monocotiledôneas, esse valor decresce durante o processo de maturação. Em 1986, Priestley já mencionava a fundamental importância da água para a preservação e vitalidade das sementes, que em quantidade adequada irá desempenhar funções essenciais para a atividade normal e sobrevivência dos tecidos embrionários. Estudos demonstram que o teor de umidade tem influência na germinação em sementes de *Elaeis oleifera* e de sementes hibridizadas do dendê com o caiaué, observou-se 70% de germinação em sementes com o grau de umidade entre 20 e 23% para o *Elaeis oleifera* e 19 e 22% para sementes de híbrido (Lima et al., 2014; 2017).

Nos estudos realizados com os compostos químicos da reserva nas sementes de *Elaeis oleifera*, observa-se que carboidratos 39,51% seguido de lipídeos 24,40% são os compostos presentes em maior quantidade, fato este verificado em outras espécies de palmeiras como em *Syagrus coronata* (Crepaldi et al., 2001) e *Syagrus oleracea* (Bora e Moreira, 2003). Carboidratos e lipídios são valores nutricionais mais encontrados em palmeiras, estes compostos são sintetizados nas sementes como materiais de reserva a serem utilizados pelo

embrião durante a germinação e para a constituição de novas estruturas celulares (Henderson, 2002).

Os carboidratos, lipídeos e proteínas são as principais substâncias de reserva em sementes e a proporção irá variar de acordo com a espécie (Marcos-Filho, 2015). Segundo Barton e Crocker (1957), o endosperma de dendê contem os seguintes compostos: carboidratos 28%, lipídeos 49% e proteínas 0,9%.

Machado et al. (2014) ao estudar duas subespécies, *Acrocomia aculeata sclereocarpa* e *Acrocomia aculeata sub.totai* verificaram que a semente é rica em lipídeos apresentando respectivamente 55,42 e 47,76%, dados que demonstram a capacidade das espécies de fornecer óleo para a produção de biodiesel. O teor de óleo pode variar em função das características genética de cada espécie bem como em função do ambiente em que a espécie se encontra Carvalho e Nakagawa (2012). Nas subespécies *A. aculeata* subsp. *sclereocarpa* e *A. aculeata* subsp. *totai* estudadas por Machado et al. (2015), relatam que para carboidrato encontraram 40,61% e 33,40% respectivamente, valores próximos ao encontrado em *Elaeis oleifera* e para proteínas 6,70 e 5,66%, teores abaixo ao encontrado na espécie estudada.

Em monocotiledôneas o endosperma é o tecido de reserva para o embrião durante a formação da semente, germinação e estabelecimento da plântula (Davide e Silva, 2008). Teste para detecção de pectina em endosperma de *Elaeis oleifera* foi positiva na parede celular (Figura 5-a). Entretanto em *Bactris maraja* (Rodrigues et al., 2015), *Bactris gasipaes* (Nazário et al., 2013) e *Attalea microcarpa* (Melo et al., 2017) foram encontradas pectinas no conteúdo celular. As pectinas são polissacarídeos componentes da parede celular que contém açúcares ácidos e neutros, frequentemente contém cálcio como componente estrutural e contribuem para a adesão entre células e para resistência mecânica da parede celular (Taiz e Zeiger, 2009).

Corpos protéicos foram observados em um grande número de células do endosperma (Figura 5-b). As proteínas são requeridas pelas plantas em períodos distintos, dando suporte inicial das plântulas até que se torne um organismo autotrófico. São moléculas constituídas de nitrogênio e que atuam como fonte de energia durante a germinação da semente (Buckeridge et al., 2004). São geralmente armazenadas no endosperma de sementes de palmeiras como em *Attalea microcarpa* (Melo et al., 2017), *Bactris maraja* (Rodrigues et al., 2015), *Bactris gasipaes* (Nazário et al., 2013), *Euterpe oleraceae* (Gonçalves et al., 2010), *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2010) e *Euterpe edulis* (Panza et al., 2004).

Uma grande concentração de corpos lipídicos foi encontrada no endosperma (Figura 5-d), caracterizando-o como oleoso. Este composto é uma característica de sementes que são produtoras de óleo. Estudos realizados por Sundram et al. (2003), em *Elaeis oleifera* revelam a grande presença de lipídeos no endosperma através de testes histoquímicos. Entretanto em outras espécies de palmeiras que não são utilizadas para extração de óleo como *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2010), *Euterpe edulis* (Panza et al., 2004) *Butia capitata* (Oliveira et al., 2013) e *Phoenix dactylifera* (De Mason et al., 1983) foi comumente verificada a presença de lipídios. A presença de lipídios e proteínas encontrado no endosperma e embrião zigótico são reservas consumidas nos estágios iniciais de germinação e estabelecimento da plântula (Bewley e Black, 1982).

No tegumento, revelou-se a presença de alcaloides (Figura 5-c), substâncias pertencentes ao metabolismo secundário, que apresentam rotas metabólicas interconectadas com as rotas que sintetizam metabólitos primários (Fumagali et al., 2008). Esses metabólitos exercem importante papel como substâncias de defesa contra insetos herbívoros, patógenos e possuem, também, ação alelopática (Taiz e Zeiger, 2009).

Compostos fenólicos foram evidenciados no tegumento da semente de *Elaeis oleifera*, a presença desse composto está ligada a dormência das sementes inibindo a germinação

(Tokuhisa et al., 2007). Em sua composição encontram-se inibidores solúveis em água, que prevenem a germinação da espécie (Weber et al., 2005). Em algumas espécies a presença do composto fenólico tanino no tegumento controla a entrada de oxigênio para o interior da semente. Estes compostos fixam o O₂ que a semente está absorvendo, impedindo sua chegada no interior da semente (Dietrich, 1986). Em estudos realizados com *Bactris maraja*, a organização e a estrutura espessada das células do tegumento, em conjunto com sua composição fenólica, podem atuar como reguladores da germinação (Rodrigues et al., 2015). Outras espécies de palmeiras como *Astrocaryum acaule* (Araújo, 2005) e *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2010), apresentam um tegumento composto por células impregnadas de compostos fenólicos que dificultam a germinação. O arranjo das células do tegumento reduz os espaços intercelulares, contribuindo para a impermeabilidade da água dificultando a difusão de gases e afetando a germinação (Esau, 1977).

Identificou-se na protoderme e meristema fundamental do embrião de *Elaeis oleifera* a presença de lipídios (Figura 5-f), alcalóides (Figura 5-g), pectina (Figura 5-h) e proteínas (Figura 5-i). Moura et al. (2010), em *Acrocomia aculeata* verificaram a presença da proteína em todas as regiões do embrião. Estudos realizados por Scherwinski-Pereira et al. (2012) verificaram a presença e o acúmulo de pectinas no embrião do *Euterpe oleracea*. De acordo com Buckeridge et al. (2000) este fator pode estar relacionado com a possível metabolização do polissacarídeo durante a germinação do embrião.

CONCLUSÕES

Esse estudo, possibilitou o conhecimento das estruturas da semente de *Elaeis oleifera*, podendo ser realçado a composição do tegumento, sua organização e a estrutura espessada das suas células que, sem espaços intercelulares, contribuem para a impermeabilidade da água, dificultando a difusão de gases e afetando a germinação. Ao mesmo tempo, a sua composição fenólica que tem como função conter inibidores solúveis em água, pode estar atuando também

como reguladores no processo germinativo.

Proteínas e lipídios encontrado no endosperma e no embrião, são reservas consumidas nos estágios iniciais de germinação e no estabelecimento da plântula, enquanto a presença de 24,40% de lipídios, evidencia seu possível potencial para extração de óleo.

Assim, o estudo morfoanatômico e histoquímico da semente de *Elaeis oleifera* identificou características importantes para entender e otimizar o processo germinativo da espécie, fornecendo subsídio para o desenvolvimento de novos métodos de germinação, necessário para a manutenção e conservação de progênes da espécie na condução de programas de melhoramento genético e produção de sementes híbridas.

Entretanto, se faz necessário ampliar e dar continuidade a pesquisa no que tange a relação entre massa da semente e taxa de germinação, bem como estudo do processo germinativo, para buscar dados que forneçam bases para acelerar a germinação em condições naturais, ou novos métodos de superação de dormência com menores custos.

AGRADECIMENTOS

À fundação de amparo à pesquisa do estado do Amazonas (FAPEAM), a concessão de bolsa de estudo à primeira autora.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. O.; MENDONÇA, M.S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* Mart.(Palmae). *Revista Brasileira de Sementes*, V. 25, N. 1, P. 37-42, 2003.
<http://www.scielo.br/pdf/%0d/rbs/v25n1/19628.pdf>

ARAÚJO, M. G. P.; A. M. LEITÃO; M. S. MENDONÇA. Morfologia do fruto e da semente de Inajá (*Attalea maripa* (Aubl.) Mart.) Palmae. *Revista Brasileira de Sementes* 22.2:3138,2000.
https://www.researchgate.net/profile/Maria_Araujo19/publication/285032502_Morfologia_do_fruto_e_da_semente_de_inaja_Attalea_maripa_Aubl_Mart_Palmae/links/5890ee03458515aeac92ce97/Morfologia-do-fruto-e-da-semente-de-inaja-Attalea-maripa-Aubl-Mart-Palmae.pdf

ARAÚJO, M. G. P. Morfo-anatomia e desenvolvimento dos frutos e sementes de três espécies da subfamília Arecoideae (Arecaceae). *Tese de Doutorado*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 189p, 2005.
<http://bdtd.inpa.gov.br/handle/tede/1921>

ARIAS, D.; GONZÁLEZ, M.; PRADA, F.; AYALA-DIAZ, I.; MONTOYA, C.; DAZA, E.; ROMERO, H. M. Genetic and phenotypic diversity of natural American oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortés) accessions. *Tree Genetics Genomes* 11, 1–13, 2015.
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11295-015-0946-y.pdf>

BATISTA, G. S.; COSTA, R. S.; GIMENES, R., PIVETTA, K. F. L.; MÔRO, F. V. Aspectos morfológicos dos diásporos e das plântulas de *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc–Arecaceae. *Comunicata Scientiae*, 2(3), 170-176, 2011.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3985477>

BARTON, L. V.; CROCKER, W. *Physiology of seeds*. 1957.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, vol. 2: Viability, dormancy and environmental control. *Springer*, Berlin Heidelberg New York. 1982. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3040.1984.tb01202.x>

BORA, P. S.; MOREIRA, R. V. Catolé palm (*Syagrus oleracea* Mart) fruits: fatty and amino acids composition. *Grasas y aceites*, 54(2), 145-150, 2003.
<http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/257/258>

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para Análise de Sementes. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise__sementes.pdf

BRUNDRETT, M. C.; KENDRICK, B.; PETERSON, C. A. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic e Histochemistry*, vol. 66, p. 111-116, 1991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1716161>

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P., TINÉ, M.A. *Acúmulo de Reservas*. In: Ferreira, A.G; Borghetti, F. (Orgs). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre. Artmed, p.31-50. 2004.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P. LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, função e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12: 137-162, 2000
https://www.researchgate.net/profile/henrique_pessoa_dos_santos/publication/237618879_polissacarideos_de_reserva_de_parede_celular_em_sementes_estrutura_metabolismo_funcoes_e_aspectos_ecologicos1/links/0046351c04dc8b5266000000/polissacarideos-de-reserva-de-parede-celular-em-sementes-estrutura-metabolismo-funcoes-e-aspectos-ecologicos1.pdf

CAMILLO, J.; BRAGA, V. C.; MATTOS, J. K. D. A.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. D.; PADILHA, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Seed biometric parameters in oil palm accessions from a Brazilian germplasm bank. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49(8), 604-

612, 2014. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v49n8/0100-204X-pab-49-08-00604.pdf>

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 5 ed. Jaboticabal: Funep,. 590p. 2012.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. *The Oil Palm*; WILEY: CHICHESTER, UK, 2015.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. *The oil palm*. 4. ed. Great Britain: Blackwell Science, 2003.

CREPALDI, I. C.; ALMEIDA-MURADIAN, L. D.; RIOS, M. D. G.; PENTEADO, M. V. C.; SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). *Revista Brasileira de Botânica*, 24(2), 155-159, 2001.
<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v24n2/a04v24n2>

CUNHA, R.N.V.; LOPES, R. BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento fatal. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 4p. Embrapa Amazônia Ocidental. *Comunicado técnico*, 85. 2010.

CUNHA, R.N.V.; LOPES, R.; ROCHA, R.N.C. ; LIMA, W.A.A.; TEIXEIRA, P.C.; BARCELOS, E.; RODRIGUES, M.R.L; RIOS, S.A. *Domestication and breeding of the American oil palm*. In: BORÉM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R.; NODA, H. (Ed.). *Domestication and breeding: Amazonian species*. Viçosa: UFV, p.275-296. 2012.

CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; DANTAS, J. C. R.; ROCHA, R. N. C. Procedimentos para produção de sementes comerciais de dendezeiro na Embrapa Amazônia Ocidental. Embrapa Amazônia Ocidental-*Documentos*, 2007.
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/681648/1/Doc54.pdf>

DAVIDE, A. C.; SILVA, E. D. Produção de sementes e mudas de espécies florestais. *Lavras: Ufla*. 2008.

De MASON, D. A. Endosperm structure and storage reserve histochemistry in the palm, *Washingtonia filifera*. *American journal of botany*, P. 1332-1340, 1986.
https://www.jstor.org/stable/2444067?seq=1#page_scan_tab_contents

De MASON D.A.; THOMSON W.W. Structure and ultrastructure of the cotyledon of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Plant Sciences*. 142:320–328, 1983.
<https://www.journals.uchicago.edu/doi/pdfplus/10.1086/337230>

DIETRICH, S. D. C. Inibidores de crescimento. *Fisiologia vegetal*, 2, 193-212. 1986.

DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B. A.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. *Genera Palmarum – The Evolution and Classification of Palms*. Royal Botanic Gardens, Kew Publishing. 2008.

ELIAS, M. E. D. A. Maturação fisiológica de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* g. Mey. Arecaceae) em uma área da Amazônia central. *Tese Doutorado em agronomia tropical*. Manaus:UFAM.121p. 2011.

<https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/3048/1/tese%20maria%20elizabeth%20de%20assis%20Oelias.pdf>

ESAU, K. Anatomy of seed plants. 2nd ed. Edgard Blucher, New York. 350p. 1977.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 44(2), 153-159, 1981.
<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np50014a002>

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.4, p.627-641, 2008.
https://www.researchgate.net/profile/Arildo_Oliveira/publication/247854774_Producao_de_metabolitos_secundarios_em_cultura_de_celulas_e_tecidos_de_plantas_O_exemplo_dos_generos_Tabernaemontana_e_Aspidosperma/links/0f31753a82e30827fa000000.pdf

GABE, M. *Techniques histologiques*. Masson e Cie, Paris. 1113p. 1968.

GENOVESE-MARCOMINI, P. R.; MENDONÇA, M. S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Morphoanatomy of the flower of *Syagrus inajai* (Spruce) Becc. (Arecaceae-Arecoideae-Attaleinae), Amazon. *Brazilian Journal of Biology*, 73(3), 649-661, 2013.
<http://www.scielo.br/pdf/bjb/v73n3/1519-6984-bjb-73-03-649.pdf>

GONÇALVES, J. F. D. C.; LIMA, R. B. S.; FERNANDES, A. V.; BUCKERIDGE, M. S. Physiological and biochemical characterization of the assai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) during seed germination and seedling growth under aerobic and anaerobic conditions. 2010. *Revista Árvore*, 34(6), 1045-4053. <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v34n6/a10v34n6.pdf>

HENDERSON, A. J. Phenetic and phylogenetic analysis of reinhardtia (Palmae). *American journal of botany*, V. 89, N. 9, P. 1491-1502, 2002.
http://www.jstor.org/stable/pdf/4124067.pdf?seq=1#page_scan_tab_contents

HORWITZ, W.; LATIMER, G. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Gaithersburg MA, USA. Association of Official Analytical chemist, 2000.

HUSSEY, G. An Analysis of the Factors Controlling the Germination of the Seed of the Oil Palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.). *Annals of Botany* 22: 259-284.1958.
<https://academic.oup.com/aob/article-abstract/22/2/259/168532?redirectedFrom=fulltext>
https://www.researchgate.net/profile/Arildo_Oliveira/publication/247854774_Producao_de_metabolitos_secundarios_em_cultura_de_celulas_e_tecidos_de_plantas_O_exemplo_dos_generos_Tabernaemontana_e_Aspidosperma/links/0f31753a82e30827fa000000.pdf

JENSEN, W.A. *Botanical histochemistry: principles and practice*. W.H. Freeman. San Francisco. 408p. 1962.

JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. McGraw- Hill., New York, 523p. 1940.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal* (p.198). Seropédica: Edur. 1997.

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. Acessado 05 abril 2018.

LIMA, W. A. A.; GREEN, M.; ZEVIANI, W. M.; LOPES, R.; RIOS, S. A. Teor de água e tempo de exposição ao tratamento térmico na germinação de sementes de caiaué. *Revista de Ciências Agrárias /Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 60(2), 192-198. 2017. <https://periodicos.ufra.edu.br/index.php/ajaes/article/view/2625/1440>

LIMA, W. A. A.; LOPES, R.; GREEN, M.; CUNHA, R. N. V.; ABREU, S. C.; CYSNE, A. Q. Heat treatment and germination of seeds of interspecific hybrid between American oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés) and African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Seed Science*, v. 36, n. 4, p. 451-457, 2014. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v36n4/a10v36n4.pdf>

LUTZ, I. A. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3ª ed. São Paulo/SP, IAL, v. 1, p. 245-266,1985.

MARCOS-FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*, 2.ed.-Londrina, PR: Abrates, 660p. 2015.

MACHADO, W.; GUIMARÃES, M. F.; LIRA, F. F.; SANTOS, J. V. F.; TAKAHASHI, L. S. A.; LEAL, A. C.; COELHO, G. T. C. P. Evaluation of two fruit ecotypes (*Totai* and *sclerocarpa*) of macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Industrial Crops and Products*, 63, 287-293. 2015. https://ac.elscdn.com/S0926669014006888/1s2.0S0926669014006888main.pdf?_tid=c02a608a538a4b349d4ac650082d6961&acdnat=1529189127_54224f6968e7edeadd83c47f8e526ba4a

MACHADO, W.; GUIMARÃES, M. F.; LIRA, F. F.; SANTOS, J. V. F.; TAKAHASHI, L. S. A.; LEAL, A. C.; COELHO, G. T. C. P. Evaluation of two fruit ecotypes (*totai* and *sclerocarpa*) of macaúba (*Acrocomia aculeata*). *Industrial Crops and Products*, 63, 287-293. 2014. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014006888>

MATOS, A. K. M. G. *Biometria e morfologia de Attalea maripa* (Aubl.) Mart.(Inajá) em sistemas silvipastoril no nordeste Paraense. 90 f. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal Rural da Amazônia, Manaus. 93p. 2010.

MARTIN, A.C. The comparative internal morphology of seeds. *The american Midland naturalist*, Indiana. v.36, n.3, p.513-660. 1946.

MELO, G. A. M.; ARAÚJO, M. G. P.; STAUFFER, F. Fruit development and histochemistry of *Attalea microcarpa* Mart.(Arecaceae-Arecoideae). *Flora*, v. 235, p. 10-17,2017. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/031FF0294034BC624F0D600FFC662672B5FF81B278CD0C49CD91065694105641DE6A7DD86A9942C1C5600DAE33D12E1F>

MENDONÇA, M. S. D.; OLIVEIRA, A. B. .; ARAÚJO, M. G. P. D.; ARAÚJO, L. M. Morpho-anatomy of the fruit and seed of *Oenocarpus minor* mart.(arecaceae). *Revista brasileira de sementes*, 30(1), 90-95. 2008. <Http://www.scielo.br/pdf/rbs/v30n1/a12v30n1.pdf>

MEUNIER, J. *Le "palmier a huile" americain, Elaeis melanococca*. Oléagineux, v.30, p.51-61, 1975.

MOURA, R.C.; LOPES, P.S.N.; BRANDÃO JUNIOR, D.S.; GOMES, J.G.; PEREIRA, M.B. Biometria de frutos e sementes de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae), em vegetação natural no Norte de Minas Gerais, Brasil. *Biota Neotropica* 10: 414-419, 2010. <http://www.redalyc.org/html/1991/199115791040/>

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola*, 67(4), 399-407. 2010. <http://www.scielo.br/pdf/sa/v67n4/v67n4a04.pdf>

NAZÁRIO, P.; FERREIRA, S. A. D. N.; GENOVESE-MARCOMINI, P. R.; MENDONÇA, M. S. D. Anatomical And Histochemical Aspects Of The Peach Palm (*Bactris Gasipaes* Kunth) Seed. *Journal Of Seed Science*, 35(2), 171-178, 2013. [Http://Www.Scielo.Br/Pdf/Jss/V35n2/05.Pdf](http://Www.Scielo.Br/Pdf/Jss/V35n2/05.Pdf)

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59(2): 368-373, 1964. [Https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fbf01248568.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fbf01248568.pdf)

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. *The study of plant structure: principles and selected methods*. Termarcaphi Pty Ltd, Melbourne. 46p. 1981.

OLIVEIRA, M. S. P.; RIOS, A. S. *Potencial econômico de algumas palmeiras nativas da Amazônia*. in: encontro amazônico de agrárias. Belém, PA. Atuação das ciências agrárias nos sistemas de produção e alterações ambientais. UFRA, 2014. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/985080/1/potencial20econc394mico20de20algumas20palmeiras20nativas20da20amazc394nia1.pdf>

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*, 27(6), 1633-1645.2013. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00468-013-0910-0.pdf>

OLIVEIRA, A. B.; MENDONÇA, M. S.; ARAÚJO, M. G. P.; Aspectos anatômicos do embrião e desenvolvimento inicial de *Oenocarpus minor* Mart: uma palmeira da Amazônia. *Acta botânica brasílica*, 2010. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062010000100003&script=sci_abstract&tlng=pt

PANZA.V.; LÁINEZ.V.; MALDONADO.S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *botanical journal of the linnean society*, 145 , 445–453 2004. <https://academic.oup.com/botlinnean/article/145/4/445/2420270>

PASSOS, M. A. B.; MENDONÇA, M. S.: Epiderme dos segmentos foliares de *Mauritia flexuosa* L. f.(Arecaceae) em três fases de desenvolvimento. *Acta Amazonica*, v. 36, n. 4, p. 431-436, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/aa/v36n4/v36n4a05>

PIVETTA, K. F. L.; SARZI, I.; ESTELLITA, M.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z. Tamanho do diásporo, substrato e temperatura na germinação de sementes de

- Archontophoenix cunninghamii* (arecaceae). *Revista de biologia e ciências da terra*. 8(1). 2008. <http://www.redalyc.org/pdf/500/50080114.pdf>
- PRIESTLEY, D. A. *Seed aging: implications for seed storage and persistence in the soil*. Comstock Associates. 1986.
- REIS, R. G. E.; BEZERRA, A. M. E.; GONÇALVES, N. R.; PEREIRA, M. S.; FREITAS, J.B.S. Biometria e efeito da temperatura e tamanho das sementes na protrusão do pecíolo cotiledonar de carnaúba. *Revista Ciência Agronômica* 41: 81-86, 2010. <http://www.redalyc.org/pdf/1953/195314910011.pdf>
- RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; SOUZA G. Q.; Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. *Trees*, 26(3), 851-863, 2012. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2fs00468-011-0659-2.pdf>
- RIOS, S. D. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; SILVA, E. B. Recursos genéticos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* jacq.) e *Elaeis oleifera* (*Elaeis oleifera* (hbk) Cortes). Embrapa Amazônia Ocidental-*Documentos*, 2012. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/949588/1/doc96a5.pdf>
- RODRIGUES, J. K.; MENDONÇA, M. S.; OLIVEIRA GENTIL, D. F. Aspectos biométricos e morfoanatômicos do pireno e da semente e histoquímica da semente de *Bactris maraja* Mart.(Arecaceae). *Rodriguesia*-Instituto de pesquisas Jardim botânico do Rio de Janeiro, V. 66, N. 1, P. 075-085, 2015. http://rodriguesia.seer.jbrj.gov.br/index.php/rodriguesia/article/view/944/pdf_156
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; SILVA GUEDES, R.; SILVA, R. A.; FERMINO, P. C. P.; LUIS, Z. G.; OLIVEIRA FREITAS, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(3), 501-508.2012. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11240-012-0115-z.pdf>
- SILVA, R. S.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y. R. F.; LOPES, P. S. N. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*), the Swamp palm. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209(11), 674-685. 2014. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367253014001212>
- SOUZA, J. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O. Ontogenesis and functions of saxophone stem in *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Annals of botany*, 119(3), 353-365, 2017. <https://academic.oup.com/aob/article/119/3/353/2901737>
- SUNDRAM, K.; SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Yew-Ai. Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, v. 12, n. 3, p. 355-362, 2003. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.655.5312&rep=rep1&type=pdf>
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4a ed. Artmed, Porto Alegre. 848p. 2009.
- TOKUHISA, D.; DIAS, D. C. F. D. S.; ALVARENGA, E. M.; DIAS, L. A. D. S.; MARIN, S. L. D. E. D. S. H. Tratamentos para superação da dormência em sementes de mamão. *Revista Brasileira de Sementes*. 2007. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v29n1/18.pdf>

TOMLINSON, P. B. *The structural biology of palms*. Clarendon Press, Oxford. 477p. 1990.

USDA – United States Department of Agriculture. Oil Seeds: World Markets and Trade. *Foreign Agricultural Service*.

<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>. Acesso: 03 Julho 2017.

UHL, N.W.; DRANSFIELD, J. *Genera Palmarum*. A Classification of Palms Based on the Work of Harold E. Moore, Jr. Allen Press, Lawrence, Kansas. 610 pp. 1987.

VALOIS, A.C.C. Possibilidades da cultura do dendê na Amazônia. Brasília: Embrapa-Cenargen. (Embrapa-Cenargen. *Comunicado Técnico*, n.19). 7p. 1997.

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/90613/1/1736.pdf>

WERKER, E. *Seed anatomy*. Berlin: Stuttgart, Borntraeger, 424P. 1997.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 253-279. 2005.

[www.annualreviews.org/doi/full/10.../annurev.arplant.56.032604.144201](http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201)

ANEXOS

Tabela 1. Características biométricas da semente de *Elaeis oleifera*: Valores médio, amplitude, desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos diâmetros apical e basal, comprimento e massa fresca.

Variáveis	Média	Amplitude	Desvio padrão	CV%
Diâmetro apical (mm)	10,12	5,4±15,2	1,97	19,5
Diâmetro basal (mm)	10,75	5,4±17,5	2,96	27,6
Comprimento (mm)	14,15	8,6±18,9	2,13	15,1
Massa (g)	0,93	0,4±1,9	0,39	41,9

Tabela 2. Porcentagem da análise centesimal de sementes de *Elaeis oleifera*.

Estimativa	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)
Média	25,92	1,82	24,40	8,35	39,51
Desvio padrão	0,29	0,04	0,01	0,30	1,31

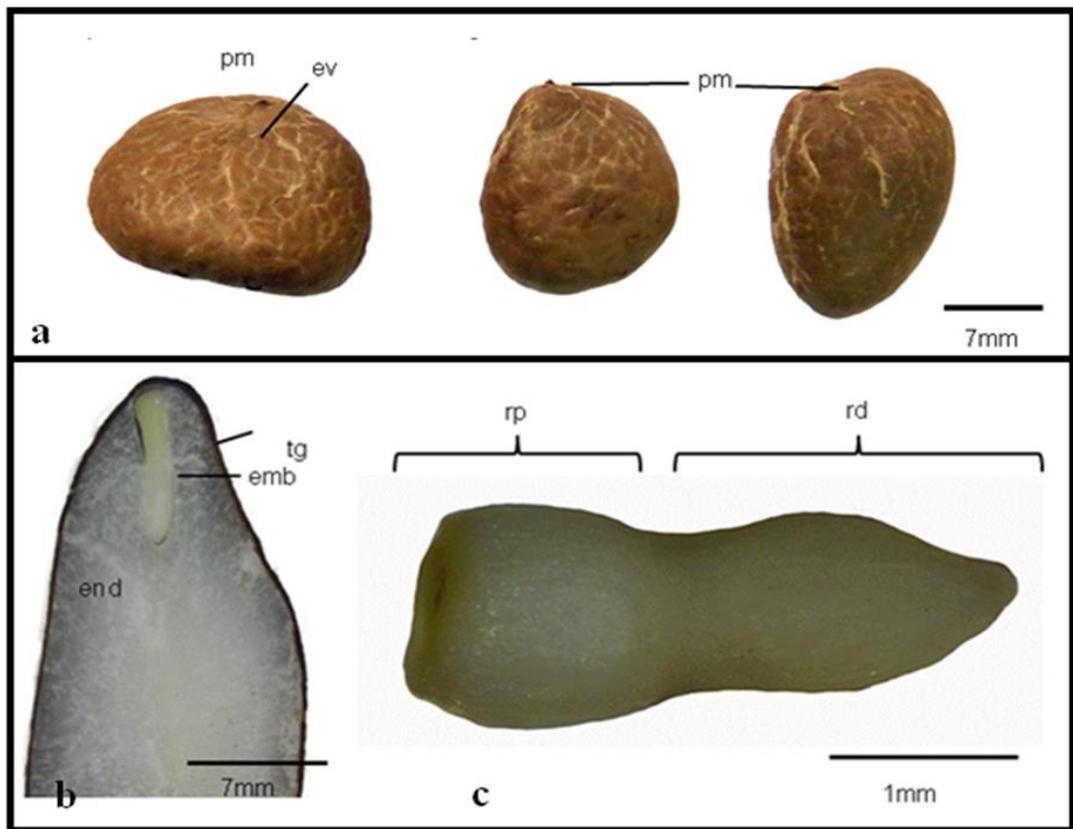


Figura 1. Morfologia da semente de *Elaeis oleifera*. a) diferentes formatos da semente com poro micropilar e extensões vasculares. b) Secção da semente em corte longitudinal apresentando tegumento, endosperma e embrião. c) Embrião com região proximal e distal. (pm: poro micropilar; ev: extensões vasculares; en: endocarpo; tg: tegumento; ed: endosperma; em: embrião; rp: região proximal; rd: região distal).

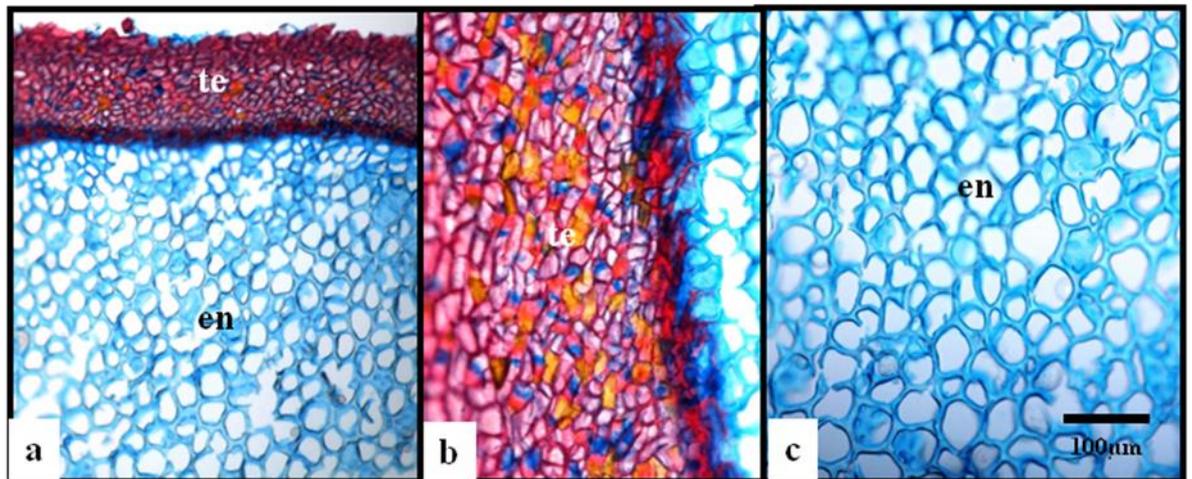


Figura 2. Semente em corte transversal de *Elaeis oleifera*. a) Tegumento e endosperma. b) Células do tegumento. c) Células do endosperma (te: tegumento; en; endosperma).

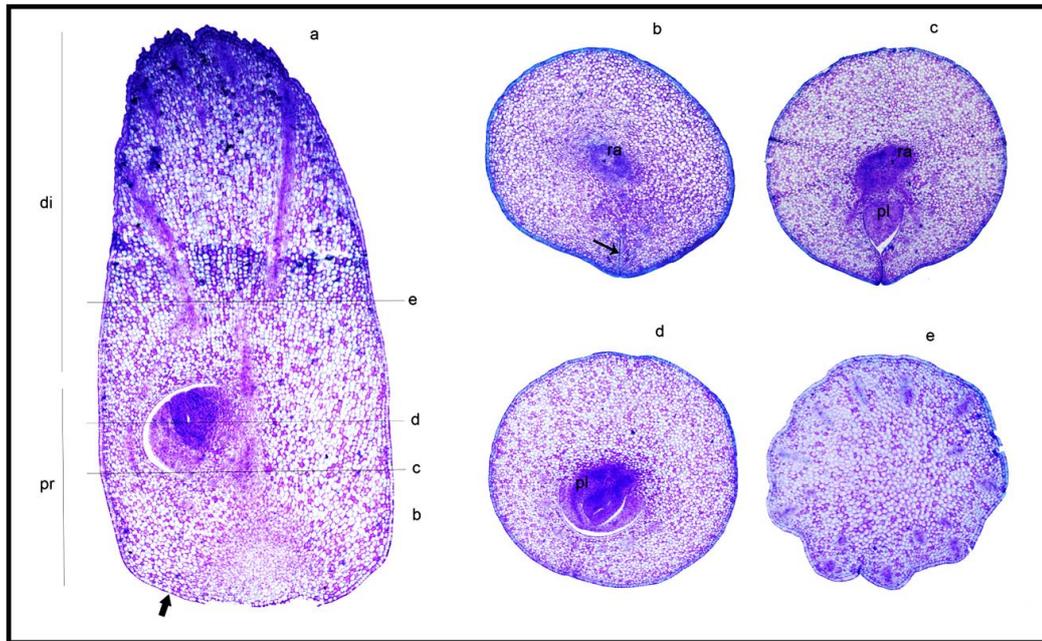


Figura 3. Embrião de *Elaeis oleifera*: a) Secção longitudinal, evidenciando a região proximal (eixo embrionário) e a região distal (limbo cotiledonar ou haustório) protoderme (seta). b) Eixo embrionário, evidenciando o polo radicular e fenda cotiledonar (seta). c) Eixo embrionário, evidenciando plúmula e radícula. d) Plúmula em secção transversal. e) Distribuição do procâmbio na região distal do limbo cotiledonar. (pr: região proximal; rd: região distal ra: radícula; pl: plúmula).

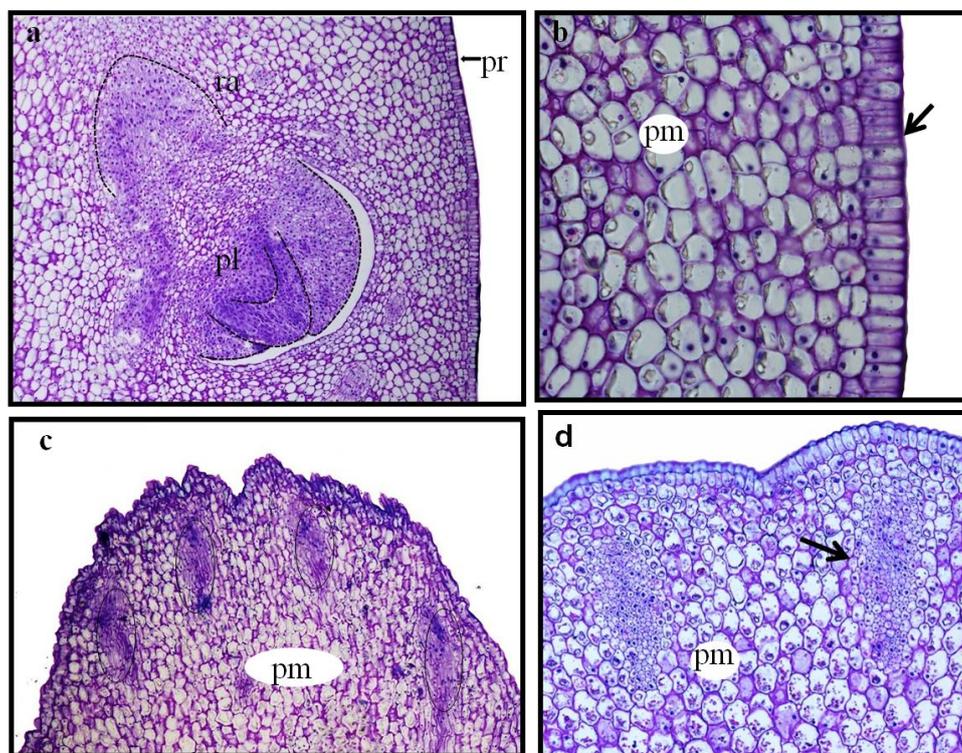


Figura 4. Embrião de *Elaeis oleifera*. a) Detalhe do eixo embrionário evidenciando a radícula e a plúmula. b) detalhe das células do promeristema fundamental e protoderme (seta) na região proximal. c) Região distal evidenciando os feixes provasculares em pontilhado. d) Detalhe do procâmbio (seta) próximos a protoderme na região distal. (pl: plúmula; pm: promeristema; pr: protoderme; ra: radícula).

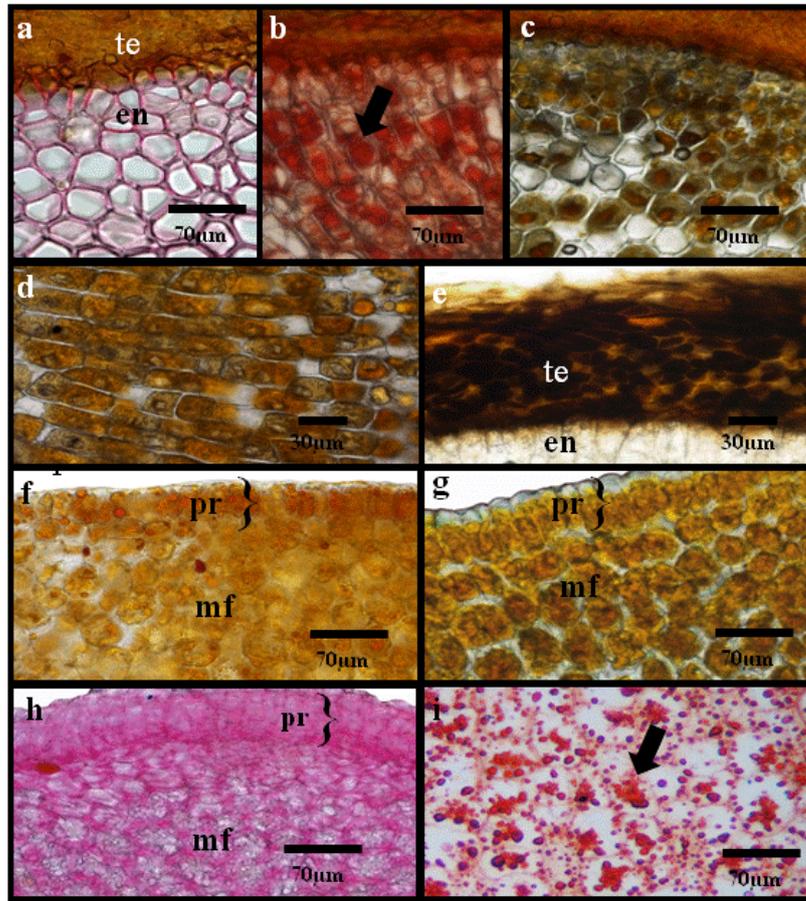


Figura 5. Testes histoquímicos aplicados na semente de *Elaeis oleifera*. a-e tegumento e endosperma. f-i embrião. a) parede das células do endosperma com pectina (Vermelho de Rutênio). b) endosperma corado com Xilidine Ponceau evidenciando corpos proteicos (seta). c) células do endosperma com concentração de alcalóide (Wagner). d) lipídios no interior das células do endosperma (Sudam). e) tegumento com compostos fenólicos (cloreto férrico). f) reação para lipídios no interior das células da protoderme e meristema fundamental. g) células da protoderme e meristema fundamental com reação para alcalóides. h) reação para pectina. i) corpos proteicos no interior das células do meristema fundamental (seta). (en: endosperma, mf: meristema fundamental, pr: protoderme, te: tegumento).

CAPÍTULO 2

EVENTOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis oleifera* (KUNTH) CORTÉS - ARECACEAE

Elaborado de acordo com as normas da revista Plant Cell Culture & Micropropagation

EVENTOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Elaeis oleifera* (Kunth) cortés - ARECACEAE

Suelen Cristina de Sousa LIMA^{1*}; Regina Caetano QUISEN²; Maria Silvia de MENDONÇA³

RESUMO

Elaeis oleifera é uma espécie nativa da região amazônica que desperta grande interesse em relação a outras palmeiras tropicais, por ser uma espécie de fácil hibridização com o dendezeiro africano (*Elaeis guineensis*) constitui-se em uma fonte de grande variabilidade genética explorada no programa de melhoramento genético do dendezeiro da Embrapa Amazônia Ocidental. Dentre as características importantes na formação destes híbridos interespecíficos, citam-se a resistência ao ataque de pragas e doenças, em especial ao amarelecimento fatal, porte reduzido e qualidade de óleo devido possuir maior teor de ácidos graxos insaturados. A espécie apresenta baixa taxa de germinação, sendo sua única forma de propagação via sementes, que apresentam dormência. O objetivo deste estudo foi descrever as etapas da embriogênese somática a partir do embrião zigótico de *Elaeis oleifera*. Os embriões foram inoculados em meio de cultura, acrescidos de regulador de crescimento para a indução de calos, com subcultivo a cada 30 dias. A análise morfoanatômica foi realizada durante todo o processo embriogênico. Aos 30 dias em meio de indução observou-se a formação das primeiras divisões nas células procâmbiais na região proximal do embrião. Calos primários surgiram após 30 dias de cultura, seguidos da progressão para calos embriogênicos somente aos 150 dias. Aos 180 dias ocorreu a formação do pro-embrião delimitada pela protoderme. Os pró-embriões apresentaram-se isolados do tecido de origem, pelo leve espessamento da parede celular, indicando sua origem unicelular. As análises permitiram evidenciar o local da formação dos calos a partir da região distal do embrião e a origem da divisão celular a partir do tecido do procâmbio.

Palavras-chave: anatomia, picloram, calogênese

1* Autor para correspondência: Doutoranda em Agronomia/Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Lab. Botânica Agroflorestal/CEP: 69067-005, Manaus, AM – Brasil.: suelen.biologa23@gmail.com

2 Doutora Pesquisadora Embrapa Florestas - Colombo, Paraná

3 Professora Titular, Doutora. LABAF/FCA/UFAM - Universidade Federal do Amazonas

EVENTS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM ZYGOTIC EMBRYOS OF *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés – ARECACEAE

Suelen Cristina de Sousa LIMA^{1*}; Regina Caetano QUISEN²; Maria Silvia de MENDONÇA³

ABSTRACT

Elaeis oleifera is a species native to the Amazon region that arouses great interest in relation to other tropical palms. The easy hybridization of this species with the African oil palm (*Elaeis guineensis*) is a source of great genetic variability in the genetic improvement program of the oil palm of Embrapa Amazônia Ocidental. Among the main tools in the selection of interspecific factors, the cycle of attack against pests and diseases, especially the fatal yellowing, the lightness and the leadership in relation to the attack, the higher content of unsaturated fatty acids. This species have a low germination rate, being its only form of seed propagation, which presents dormancy. The objective was to describe the stages in the somatic embryogenesis from the *Elaeis oleifera* zygotic embryo. The embryos were inoculated in culture media, induced to grow inductively, with subculture every 30 days. Morphological analysis was performed throughout the embryogenesis process. At 30 days in the induction media culture were observed the formation of the first divisions in the procambial cells in the proximal region of the embryo. Primary callus were form after 30 days of culture, with progression to embryogenic callus only at 150 days. At 180 days occurred the of formation of the pro-embryo delimited by the protoderm. The pro-embryos showed to be isolated from the tissue of origin, by the slight thickening of the cell wall, following its unicellular origin. The analysis showed the location of the callus formation from the distal region of the embryo and the origin of cell division from the procambium tissue.

Keywords: Anatomy, picloram, calogenesis

INTRODUÇÃO

Elaeis oleifera (Kunth) Cortés é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, o caráter oleaginoso do fruto confere a espécie, potencial para extração do óleo, devido a presença de maior proporção de ácidos graxos insaturados em sua composição e óleo com bastante fluidez (Rajanaidu et al., 2000). Apesar de não ser um bom produtor quantitativo de óleo, a importância da espécie ocorre devido *Elaeis oleifera* possuir características desejáveis para programas de melhoramento genético como: menor taxa de crescimento, resistência ambiental e pequeno porte, qualidades levadas em consideração quando ocorre a hibridização com *Elaeis guineensis*, obtendo plantas resistentes, de baixo porte e com alta qualidade de óleo (Valois, 1997). Devido a espécie apresentar facilidade de hibridação com *Elaeis guineensis*, pesquisadores vem ao longo dos anos realizando trabalhos visando a seleção de materiais com características agrônomicas de interesse, contudo o número de materiais ainda é baixo. A única forma de reprodução da espécie ocorre por via sexuada, maneira esta que gera plantas desuniformes, germinação baixa e demorada. Uma forma de aumentar a sua reprodução seria por meio da clonagem in vitro, com o uso de uma técnica da cultura de tecidos, que é a embriogênese somática. Existem relatos com sucesso descritos na literatura para algumas palmeiras: *Elaeis guineensis* (Schwendiman et al., 1988; Teixeira et al., 1994), *Euterpe edulis* (Guerra e Handro, 1998), *Euterpe oleracea* (Ledo et al., 2002), *Areca catechu* (Karun et al., 2004) e *Elaeis guineensis* (Scherwinski-Pereira et al., 2010). Esta técnica permite que sem a fusão dos gametas, células somáticas diferenciadas ou indiferenciadas tornem-se competentes e determinem uma rota morfogênica para que ocorra o desenvolvimento do embrião somático (Gueye et al., 2009). A embriogênese somática reduz diretamente o tempo necessário para a multiplicação de plantas (Neumann et al., 2009).

A embriogênese pode ser induzida a partir de qualquer tipo de explante, entretanto o uso de embriões zigóticos vem a ser algo promissor para o desenvolvimento de protocolos de

clonagem, devido ser um tecido jovem mais responsivo, que reduz o tempo para a obtenção do processo (Abdullah et al., 2005; Thuzar et al., 2011).

O ponto de partida para a realização da embriogênese somática se dá com a formação de células com competência embriogênica, capazes de responder a sinais específicos como presença de reguladores de crescimento, condições do meio de cultura, estresses osmóticos, alterações de pH e tratamentos com diferentes substâncias (Guerra et al., 1999; Von Arnold et al., 2002; Yeung, 1995). O processo de indução da embriogênese somática está associado ao uso de auxinas, que quando adicionadas ao meio de cultura são consideradas substâncias responsáveis por desencadear a desdiferenciação e rediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes (Guerra et al., 1999). Em estudos bem sucedidos para a indução da embriogênese em palmeiras foram utilizadas duas auxinas: o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) com *Elaeis guineensis* (Duval et al., 1995; Teixeira et al., 1993) e o picloram com *Elaeis guineensis* (Teixeira et al., 1995; Scherwinski-Pereira et al., 2010) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007).

Como forma de compreender melhor a formação do embrião somático, o uso de observações histológicas seria uma ferramenta útil para a compreensão e entendimento do processo embriogênico. Realizar o acompanhamento do desenvolvimento celular e dos tecidos nas diferentes fases da embriogênese irá ajudar a melhorar a eficiência dos protocolos de multiplicação, identificar qual posição no embrião zigótico irá iniciar a divisão celular e qual célula terá competência embriogênica bem como todas as etapas envolvidas na formação do embrião somático.

O estudo do desenvolvimento dos embriões somáticos desde o início da divisão celular até a sua completa formação varia de acordo com a espécie. Em *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2009), constatou-se que as células responsivas aos estímulos originavam-se de células do procâmbio. Já em *Elaeis guineensis* (Kanchanapoom; Domyoas, 1999), a iniciação do

desenvolvimento da embriogênese somática teve origem subepidermal, resultados que discordam daqueles obtidos por Silva et al. (2014), ao estudar a embriogênese somática na mesma espécie, evidenciando a origem das células provindas das células do procâmbio.

Ao realizar o estudo da morfoanatomia durante o desenvolvimento do embrião somático é possível identificar o tempo do desenvolvimento embrionário como observado em *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2008; Granja et al., 2018), com o processo de indução por 120 dias. Silva et al. 2014, observaram que para a indução em *Elaeis guineensis* os embriões permaneceram por 150 dias em meio de indução enquanto para *Cocos nucifera*, foram necessários somente 56 dias para a indução de embriogênese somática (Verdeil et al. 2001). Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a origem e o desenvolvimento dos embriões somáticos obtidos durante a indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *Elaeis oleifera* .

MATERIAL E MÉTODOS

Assepsia e extração dos embriões zigóticos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas localizado no Km 29 da AM-010, município de Manaus, Estado do Amazonas pertencente a Embrapa Amazônia Ocidental. Inicialmente os diásporos tiveram o endocarpo removido com auxílio de martelo, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio NaClO (2,5% de cloro ativo) a 50% (v/v) por 10 minutos, seguido de lavagens em água destilada e autoclavada. Os embriões foram cuidadosamente retirados das sementes com o auxílio de pinça e bisturi. Em ambiente de câmara de fluxo laminar, a assepsia consistiu na imersão dos embriões em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) a 5% (v/v) por 5 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Os embriões permaneceram sob agitação a 100 rpm por 2 horas em solução biocida comercial PPM[®] (Plant Preserve Mixture[®]) a 5%.

Ensaio para a indução da embriogênese somática

- **Ensaio I** - Ensaio com diferentes concentrações do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)

Para a indução de culturas embriogênicas, os embriões zigóticos foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 6,0 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de glutamina, 100 mg L⁻¹ de caseína, 100 mg L⁻¹ de ácido pantotênico, 100 mg L⁻¹ de asparagina, 100 mg L⁻¹ de arginina, e 2,4-D em diferentes concentrações (T1: 0; T2: 27,6 mg L⁻¹; T3: 55,3 mg L⁻¹ e T4: 110 mg L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e o meio de cultura autoclavado a 120°C por 15 minutos.

As culturas foram mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, sendo realizados cinco subcultivos para meio de mesma composição a cada 30 dias, totalizando 150 dias. Os resultados foram avaliados considerando-se ao final de cada subcultura o porcentual de explantes com formação de calos primários, embriogênicos e não embriogênicos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos com 20 repetições cada. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, sendo analisados com o emprego do programa de análises estatísticas Rbio (Bhering, 2017).

- **Ensaio II** - Ensaio com diferentes meio de cultura

Embriões zigóticos de *Elaeis oleifera* foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de diferentes meio de cultura, sendo: MS (Murashige; Skoog, 1962); OPCM (Heedchim, 2014) com modificações e Y3 (Eeuwens, 1976) com ou sem o regulador de crescimento 2,4-D a 110 mg L⁻¹, suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, 6,0 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de glutamina, 100 mg L⁻¹ de caseína, 100 mg L⁻¹ de

ácido pantôtenico, 100 mg L⁻¹ de asparagina e 100 mg L⁻¹ de arginina. Os tratamentos para este ensaio foram realizados da seguinte maneira: T1: MS+(2,4-D) 110 mg L⁻¹, T2: OPCM+(2,4-D) 110 mg L⁻¹, T3: Y3+(2,4-D) 110 mg L⁻¹, T4: MS sem regulador, T5: OPCM sem regulador e T6: Y3 sem regulador.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C em condição de escuro, sendo realizados quatro subcultivos para meio de mesma composição a cada 30 dias, totalizando 130 dias. A cada subcultivo foram determinadas a porcentagem de explantes com formação de calos primários, embriogênicos e não embriogênicos.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos com 20 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, com auxílio do programa de análises estatísticas Rbio (Bhering, 2017).

- **Ensaio III** – Ensaio com diferentes genótipos e reguladores de crescimento

Neste ensaio foram utilizados embriões zigóticos obtidos de sementes de três genótipos de *Elaeis oleifera*, os quais foram inoculadas em placas de petri contendo 15 ml de meio de cultura MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado, 6,0 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de glutamina, 100 mg L⁻¹ de caseína, 100 mg L⁻¹ de ácido pantôtenico, 100 mg L⁻¹ de asparagina e 100 mg L⁻¹ de arginina acrescido de dois reguladores de crescimento com diferentes concentrações. Os tratamentos foram divididos da seguinte forma:

T1: Genótipo 0806 com 108,5 mg L⁻¹ de picloram;

T2: Genótipo 0806 com 110 mg L⁻¹ de 2,4-D;

T3: Genótipo 1102 com 108,5 mg L⁻¹ de picloram;

T4: Genótipo 1102 com 110 mg L⁻¹ de 2,4-D;

T5: Genótipo 0704 com 108,5 mg L⁻¹ de picloram;

T6: Genótipo 0704 com 110 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e em condição de escuro, com subcultivos a cada 30 dias, totalizando 180 dias. A cada subcultivo foram determinadas a porcentagem de explantes com formação de calo primários, embriogênicos e não embriogênicos.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, três genótipos e dois reguladores de crescimento, sendo 4 placas com 5 embriões com 20 repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, com auxílio do programa de análises estatísticas Rbio (Bhering, 2017).

Após 180 dias em meio de cultura de indução, as culturas embriogênicas foram transferidas para meio de cultura de diferenciação dos embriões somáticos, sendo os tratamentos T1, T3 e T5 transferidos para meio de cultura MS, sendo suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $2,0\text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, $6,0\text{ g L}^{-1}$ de ágar, 100 mg L^{-1} de glutamina, 100 mg L^{-1} de caseína, 100 mg L^{-1} de ácido pantotênico, 100 mg L^{-1} de asparagina e 100 mg L^{-1} de arginina e acrescido de picloram a $9,64\text{ mg L}^{-1}$, e 2ip isopentiladenina a $2,03\text{ mg L}^{-1}$. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e em condição de escuro, foram realizados dois subcultivos a cada 30 dias, o material permaneceu por 60 dias, após esse período encerrou-se o experimento.

Análises anatômicas

Para as análises histológicas foram realizadas coletas de duas amostras do material vegetal in vitro obtidos aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias em meio de indução da embriogênese somática e ao final de 60 dias em meio de diferenciação de embriões somáticos. As amostras foram imersas em solução fixadora FAA 70% (formaldeído, ácido acético e etanol 70%, em razão de 1:1:18 v/v) (Johansen, 1940), sob vácuo por 24h. Subsequentemente,

as amostras foram desidratadas em uma série alcoólica crescente (70-95%), infiltradas e incluídas em historresina (Leica[®]) de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes seriados em longitudinais (5µm) foram obtidos em micrótomo rotatório manual (Leica[®] modelo RM 2125), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40°C. Os cortes foram corados com azul de Toluidina, tampão citrato buffer, pH 4.0 (O'Brien e Mc Cully 1981) e as lâminas montadas foram analisadas em microscópio ótico Carl Zeiss[®], para descrição anatômicas e as fotomicrografias das diversas fases de desenvolvimento dos calos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio I - Ensaio com diferentes concentrações do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)

Após 14 dias de cultivo em meio de indução verificou-se o intumescimento dos embriões zigóticos, este comportamento é comum nesta fase inicial sendo descritas por alguns autores outras palmeiras como: *Elaeis guineensis* (Silva et al., 2012), *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2009) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007).

Com 30 dias de estabelecimento in vitro os explantes dos tratamentos 1, 3 e 4 diferiram estatisticamente entre si, apresentaram a formação de calos primários (Figura 1), o mesmo observado em outras palmeiras como *Elaeis guineensis* (Balzon et al., 2013), *Acrocomia aculeata* (Luis e Scherwinski-Pereira, 2014) e *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2006) com o uso do regulador 2,4-D na indução da embriogênese somática.

Estes calos evoluíram do aspecto primário ao nodular ao longo do cultivo, sendo que ao final de 150 dias apresentavam características globulares embriogênicas. Os tratamentos aplicados diferiram estatisticamente entre si (Figura 2), sendo o tratamento 4 com 110,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, o mais responsivo e superior aos demais, com a formação de 88% de calos globulares embriogênicas. Os demais tratamentos apresentaram médias inferiores de 28%,

24% e 33% para os tratamentos T1 (controle), T2 (26,6 mg L⁻¹) e T3 (55,3 mg L⁻¹), respectivamente. Este mesmo comportamento também foi observado por Guerra e Handro (1998) em embriões zigóticos de *Euterpe edulis*, ao testarem o meio MS com o regulador 2,4-D a 110 mg L⁻¹. Os autores comentam a inibição da germinação e o desenvolvimento de estruturas granulares translúcidas que caracterizaram os estágios iniciais da embriogênese somática, sendo um processo embriogênico contínuo e não sincrônico.

As baixas concentrações do regulador utilizadas nos tratamentos 2 e 3 induziram à formação de uma massa celular de coloração branca-amarelada com características de calos não embriogênicos (Figura 3), assim permaneceram por 150 dias até iniciar a oxidação e degeneração dos tecidos.

Em todos os tratamentos realizados foi observada a proliferação de calos que foram classificados como embriogênicos ou não embriogênicos. A classificação foi feita por meio da coloração, formato e textura dos calos. Tais características foram observadas com o uso do mesmo regulador 2,4-D, utilizado em estudo realizado com *Acrocomia aculeata* (Granja et al., 2018; Luis e Scherwinski-Pereira, 2014; Moura et al., 2008), *Elaeis guineensis* (Mattia, 2013) e *Euterpe oleracea* (Ledo et al., 2002). Os autores nomearam como calos não embriogênicos aqueles que apresentavam característica de coloração branca e esponjosa e os calos embriogênicos com coloração amarelada e aparência de aspecto globular. O regulador de crescimento 2,4-D está envolvido na ativação e regulação da divisão e diferenciação celular (Namasivayam, 2007). Único capaz de realizar o transporte polar célula a célula de um modo dependente de energia. Esta auxina é capaz de induzir respostas dependentes da concentração específica em tecidos alvos (Taiz e Zeiger, 2017). O uso do 2,4-D é comumente utilizado e bem sucedido na indução da embriogênese somática em *Elaeis guineensis* (Besse et al., 1992; Jayanthi et al., 2011; Konan et al., 2010; Kanchanapoom e Domyoas, 1999; Thuzar et al., 2011; Thawaro; Te-Chato 2009).

Em todos os tratamentos observou-se a paralisação da formação dos tecidos entre 60 e 150 dias, sem progressão para os estádios subsequentes. Acredita-se que o uso de altas concentrações de 2,4-D possam ter inibido a progressão das culturas, fato este observado em estudo realizado na indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* por Mattia, (2013). Neste estudo verificou-se a paralisação da formação do calo em estágio globular em grande parte dos explantes sem progressão para outros estádios. A autora recomenda a redução do tempo de permanência dos explantes em culturas com altas concentrações de 2,4-D.

Após 150 dias de cultivo em meio de indução de calos nos tratamentos 1, 2 e 3, observou-se a perda dos explantes por oxidação dos tecidos. De fato a oxidação é comum em várias espécies de palmeiras quando cultivadas em elevadas concentrações de auxinas (Moura et al., 2009; Scherwinski-Pereira et al., 2010). Tal oxidação ocorre em resposta a algum estresse induzido ou injúria, a qual caracteriza-se pelo escurecimento das partes excisadas do explante, impedindo a absorção dos constituintes do meio pelo explante em virtude da obstrução do tecido oxidado (Van Winkle et al., 2003). Em estudo com outras espécies de palmeiras como *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2009) e *Elaeis guineensis* (Balzon et al., 2013) constataram que a adição do carvão ativado diminuíram as taxas de oxidação dos tecidos em relação com os meio de cultura desprovido de carvão, contribuindo para a formação dos embriões somáticos.

Ensaio II - Ensaio com diferentes meio de cultura

Aos 14 dias após a inoculação dos embriões zigóticos, os explantes responderam aos diferentes tratamentos testados, visualizando-se o intumescimento dos embriões zigóticos, dando destaque ao meio Y3 que apresentou maior tamanho em relação aos demais embriões, tendo praticamente toda a sua região distal dobrado de tamanho (Figura 4-g).

Com 30 dias, em todos os tratamentos testados houve formação e/ou aumento dos calos primários com crescimento não organizado, bem como mudança de coloração amarelada por toda região proximal e distal do embrião (Figuras 4 b, e, h). Comparando os meios de culturas testados não houve diferença estatística para formação de calos primários, o meio OPCM apresentou 75%, enquanto que Y3 55% e o MS 70% de calos primários (Figura 5).

Apesar de os meios de culturas apresentarem 2.0 g L^{-1} de carvão ativo, aos 90 dias observou o início da oxidação nos explantes em todos os tratamentos. As partes afetadas foram aquelas em que as estruturas estavam em contato com o meio de cultura. O carvão ativo é uma substância comumente utilizada para a diminuição das intoxicações de cultura pelos fenóis oxidados que são produzidos pelos próprios tecidos, e adsorção de substâncias tóxicas presentes no meio (Caldas et al., 1998).

Desde o início do cultivo in vitro até finalização do experimento com 130 dias, os embriões nos meios de culturas testados MS, OPCM e Y3, apresentaram algumas particularidades. No meio MS foi constatada a formação de calos embriogênicos de aparência nodular e coloração amarelada (Figura 4-c). Em se tratando do meio OPCM, visualizou-se o surgimento de raízes ao longo de todo o período do cultivo in vitro, inclusive a formação de calos não embriogênicos esponjosos e coloração branca (Figura 4-f). Kerdsuwan e Te-Chato (2015), observaram a formação de raízes no explante durante a indução da embriogênese somática. Os referidos autores relatam que a presença das raízes acontece certamente por que o meio OPCM apresenta uma concentração maior de $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. No meio Y3 houve a formação de calos nos primeiros dias de cultivo como já descrito, no decorrer do experimento houve a multiplicação dos mesmos, entretanto sua coloração, textura e formato foram classificados como calos não embriogênicos (Figura 4-i).

Ao final de 130 dias comparando os meios de cultura testados não houve diferença estatística para formação de calo nodular. O meio de cultura MS e Y3 apresentaram 25% de

formação de calo nodular enquanto que o OPCM apenas 15%. Bonetti et al. (2016), ao testar os meios de cultivo MS e Y3 acrescido com 2,4-D a 110 mg L^{-1} , na indução de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, observaram aos 90 dias de cultivo in vitro a formação de calos friável 62% e 44,59%, em meios de cultivo MS e Y3. Em *Acrocomia aculeata*, Luis e Scherwinski-Pereira (2014), verificaram diferença no percentual na formação de calos primários após 90 dias testando os meios de cultura MS e Y3 acrescido de 2,4-D, 10 e 75%, respectivamente. Thuzar et al. (2011) ao indurizem a embriogênese somática em *Elaeis guineensis* Jacq. cv. 'Tenera', testando diferentes meio de cultura encontraram melhores resultados na formação de calos embriogênicos quando usaram o meio de cultura MS com o regulador 2,4-D. Muniran et al. (2008), cultivando embriões zigóticos de *E.guineensis* "Dura", observaram que os meios Y3 e MS são eficientes na formação de calos quando suplementados de 2,4-D, obtendo 98 e 80% de explantes formando calos com características embrionárias, respectivamente. O meio Y3 apresenta em sua composição outros macronutrientes como (KCL, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , além de outros) em relação ao meio MS. A presença desses macronutrientes em sua composição possa ter influenciado na formação de calos com características embriogênicas nos trabalhos citado acima, contudo com *Elaeis oleifera* não mostrou-se eficiente.

Ensaio III – Ensaio com diferentes genótipos e reguladores de crescimento

Após 15 dias de cultivo os explantes de todos os genótipos responderam ao tratamento aplicado. Nesse período observou-se o intumescimento dos embriões zigóticos. Com 30 dias de cultivo, percebeu-se o rompimento da região proximal do embrião em todos os genótipos avaliados, fato este já observado em outros ensaios descritos neste trabalho. Respostas diferenciadas na morfologia dos calos entre os genótipos foram observadas em condições de cultivo semelhantes (Figura 7). Nota-se a formação de calos primários com coloração amarela e crescimento desorganizado. Podemos observar que o genótipo 0806 acrescido do regulador

picloram foi o que apresentou maior tamanho do calo primário em relação ao demais genótipos (Figura 7-d).

Entre 60 e 150 dias ocorre continuidade do crescimento e incremento do tamanho dos calos. Alguns apresentaram coloração amarela outros branca, um pequeno número exibiu calos com características globulares, outros apenas massas de células desorganizadas. Durante esse período pôde-se observar que alguns células tiveram competência para formar calos com características embriogênicas ou não. Após 180 dias do processo de indução da embriogênese somática, os genótipos 0806 e 0704 apresentaram 13,5% e 13%, respectivamente, na formação de calos com características embriogênicas, diferindo estatisticamente do genótipo 1102, com 4,5% (Tabela 1). Estudo que corrobora com Silva et al. (2012), onde verificaram diferenças na formação de calos embriogênicos em nove genótipos de *Elaeis guineensis* Granja et al. (2018), ao avaliar 19 genótipos de *Acrocomia aculeata* comentam a variabilidade que ocorre quanto à responsividade do tecido em relação à calogênese in vitro.

Através desses estudos foi constatado que genótipos de uma mesma espécie apresentam diferenças de respostas quando cultivadas nas mesmas condições de cultivo. Este fator pode estar ligado às variações no conteúdo de hormônios endógenos entre os genótipos (Silva et al., 2012). Abreu et al. (2012) relata que na família *Arecaceae* as diferentes respostas dos genótipos podem está relacionada com a alta diversidade genética dos materiais vegetais que são propagados via semínifera.

Em outras culturas uma explicação para as diferenças genotípicas seria a forma que cada genótipo reage com o conteúdo de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, de acordo com Somleva et al. (1995). Guzzo et al. (1994), descrevem que a reação do tecido do calo com os reguladores presentes no meio de cultura pode estar relacionada com a existência de receptores hormonais, que ativam genes específicos relacionados à resposta embriogênica.

Os reguladores de crescimento picloram e 2,4-D, acrescidos ao meio de cultura promoveram diferentes respostas aos 30 dias de cultivo in vitro nos genótipos. O regulador picloram promoveu a formação de calos primários com 87,33%, diferindo do regulador 2,4-D com 65% (Tabela 2). Aos 180 dias de cultivo in vitro observou-se que o regulador picloram propiciou 17,33% de calo com aspecto nodular, enquanto o regulador 2,4-D apenas 3,33% (Tabela 2). O regulador picloram tem sido usado com sucesso em algumas espécies de palmeiras obtendo calos com características nodulares como em *Elaeis guineensis* (Balzon et al., 2013; Scherwinski-Pereira et al., 2010; Silva et al., 2012), *Euterpe oleracea* (Scherwinski-Pereira et al., 2012) e *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007).

Para a indução da embriogênese somática as auxinas são adicionadas ao meio de cultura para formação de calos embriogênicos (Eshraghi et al., 2005; Portilho et al., 2007). A auxina 2,4-D foi utilizada para indução de ES com formação de calos embriogênicos em algumas espécies de palmeiras: *Acrocomia aculeata* (Luis e Scherwinski-Pereira, 2014), *Elaeis guineensis* (Thuzar et al., 2011), híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.) e *Phoenix dactylifera* (Gueye et al., 2009), entretanto esses dados não foram obtidos neste estudo.

As auxinas 2,4-D, dicamba e picloram, são responsáveis em influenciar a atividade celular, interagir com hormônios endógenos e modificar a expressão gênica, promovendo assim desdiferenciação e rediferenciação em estágio embriogênico durante a indução da embriogênese somática (Jiménez et al., 2005). Guerra e Handro (1998), observaram que a rota do embriogênese somática em *Euterpe edulis* ocorre através da interação entre o estágio fisiológico do explante com o tipo e concentração de reguladores de crescimento presentes meio de cultura.

Durante o cultivo *in vitro* observou-se que os explantes em meio acrescido de 2,4-D apresentaram maior percentual de calos não embriogênicos 29,66% e oxidação lenta que acabou levando a necrose e perda do explante.

Análises anatômicas

Aos 30 dias de cultivo dos embriões zigóticos em meio de indução da embriogênese somática, verificou-se na região proximal do explante divisão celular, que resultaram na formação de massas celulares meristemáticas primárias. Essas massas meristemáticas são formadas por células pequenas, isodiamétricas, de citoplasma denso e núcleo evidente (Figura 8-c). Entre a região distal e proximal do embrião. As divisões das células ocorreram no sentido periclinal e anticlinal no meristema fundamental e contribuíram para o intumescimento e colapso da região proximal (Figura 8-b). Nesta fase a ativa divisão celular na região proximal provocou a ruptura da protoderme, onde se encontrava o eixo embrionário. A formação de massas celulares meristemáticas primárias na região proximal foi também observado em embriões zigóticos de *Bactris gasipaes* por Steinmacher et al. (2007) e *Acrocomia aculeata*, por Moura et al. (2009). Resultado diferente foi encontrado por Silva et al. (2014) em embriões de *Elaeis guineensis*, evidenciaram que a formação de massas de células meristemáticas ocorreram na região distal.

Calos primários de coloração amarelada foram observados após 60 dias em meio de indução (Figura 9-a). Massas meristemáticas se fragmentaram, levando o início da formação de estruturas globulares (Figura 9-b). Células de tamanho maior e aspecto parenquimático são observados na região próxima a protoderme e as células do meristema fundamental da região proximal do embrião (Figura 9-c). Nas proximidades do procâmbio observa-se um aglomerado circular de células isodiamétricas, com núcleo evidente em diferenciação, ocorrendo intensas divisões mitóticas (Figura 9-d). Em secção longitudinal nota-se o aumento

das células meristemáticas próximas ao procâmbio (Figura 9-e). Os resultados deste trabalho corrobora com os realizados por Silva et al. (2014) em *Elaeis guineensis*, através de análise histológica evidenciaram que os embriões somáticos se originavam de células procambiais e nas células parenquimáticas adjacentes ao tecido vascular. Não obstante Schwendiman et al. (1988) em estudo com a mesma espécie verificaram que os eventos da divisão celular durante a embriogênese somática foram observados em células adjacentes ao tecido vascular. Já Kanchanapoom e Domyoas (1999) em estudos com *Elaeis guineensis* comentam que a origem das massas de células meristemáticas são a partir de células subepidérmicas. Em *Acrocomia aculeata* Moura et al. (2009) constataram que as células meristemáticas originavam-se de células do procâmbio ou de células perivasculares que proliferavam produzindo massas meristemáticas. Estudos realizados com *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2006) e *Euterpe edulis* (Guerra e Handro, 1998), mostrou que os eventos da divisão celular durante a embriogênese somática surgiram a partir de células adjacentes ao tecido vascular, resultando em calos meristemáticos primários. Através desses trabalhos realizados com espécies da mesma família constatou-se que a origem das massas celulares com competência para originar embriões somáticos podem surgir a partir de diferentes células do embrião zigótico.

Aos 90 dias de cultivo, pode-se observar a continuação da divisão celular levando ao aumento na formação de calos e progressão para calos embriogênicos nodulares (Figura 10-b). Nesta fase visualizou-se a presença de elementos traqueais (Figura 10-c), o mesmo observado por Maciel et al. (2010) em *Bactris gasipaes*. Os calos nodulares são constituídos somente por células meristemáticas (Figura 10-e). Em *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007) e *Elaeis guineensis* (Silva et al., 2014) foi evidenciado que os calos formados nas espécies estudadas eram constituídos de células meristemáticas. Entretanto, essa formação ocorreu por volta de 45 dias de cultivo in vitro, resposta do tecido bem mais rápida do que em embriões da espécie em estudo.

Com 120 dias de cultivo *in vitro* houve o aumento de massa meristemática (Figura 11-a), e mudança para a formação de calos globulares, constituídos de células meristemáticas em contínua divisão (Figura 11-b e d). Visualizou-se o início também da formação da protoderme (Figura 11-c). Estudos realizados com *Bactris gasipaes* (Maciel et al., 2010, Steinmacher et al., 2011), *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2010) indicam que a formação da protoderme durante a indução da embriogênese somática de estruturas globulares já são características de pequenos embriões imaturos. Estes apresentam estruturas lisas e redondas, células procambiais e uma protoderme bem definida, estruturas não visualizadas no presente estudo.

Com 150 dias são visíveis calos globulares de coloração amarelada (Figura 12-a). Divisões celulares no sentido anticlinal são evidentes (Figura 12-b). Verifica-se tecido embriogênico proliferativo contendo células isodiamétricas pequenas, com citoplasma denso e um núcleo volumoso (Figura 12-c). Em outras espécies de palmeiras como *Euterpe oleracea* (Ledo et al., 2002), *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007) e *Elaeis guineensis* (Silva et al., 2014), observa-se a formação de embriões somáticos neste mesmo período.

Aos 180 dias de cultivo ocorreu o início da formação de pró-embriões em estágio globular constituídos por células meristemáticas delimitadas por uma protoderme que está se estruturando (Figura 13-b). Neste estágio os pró-embriões não estão conectados ao tecido de origem. Esse isolamento demonstra independência do tecido de origem, evidenciando origem unicelular. A origem dos embriões somáticos em palmeiras tem sido descrita pelos autores como sendo de origem unicelular ou multicelular, dependendo da espécie como em: *Cocos nucifera* (Chan et al., 1998; Dussert et al., 1995; Sáenz et al., 2006, Verdeil et al., 1994), *Elaeis guineensis* (Balzon et al., 2013; Kanchanapoom e Domyoas 1999; Silva et al., 2014) e *Acrocomia aculeata* (Luis e Scherwinski-Pereira 2014).

Após 60 dias de cultivo em meio de diferenciação, observou-se a formação da protoderme (Figura 14), que irá compor o embrião somático (Figura 14-b). Em *Acrocomia*

aculeata, Granja et al. (2018), relata a formação de embrião somático, evidenciando apenas a formação de uma protoderme bem definida e cordões procambiais. Já em *Elaeis guineenses*, Silva et al. (2014), evidenciaram a formação de embriões somáticos totalmente diferenciado, caracterizando-o pela formação da protoderme, do haustório, meristema apical e duas bainhas foliares.

CONCLUSÕES

A embriogênese somática induzida a partir de embriões zigóticos em *Elaeis oleifera* pode ser considerada uma forma alternativa e promissora para a formação de mudas. Nas condições em que foi desenvolvido o presente estudo pode-se concluir que:

- Altas concentrações do regulador 2,4-D são efetivas na indução de calos primários, contudo a permanência do explante no meio de cultura com elevada concentração de 2,4-D leva a oxidação;
- O meio de cultura MS foi mais eficiente na formação de calos com características embrionárias;
- O genótipo 1102 de *Elaeis oleifera* foi o mais responsivo que os genótipos 0704 e 0806 quanto à formação de calos, evidenciando o efeito genotípico diferenciado na indução da embriogênese somática;
- Diferentes estádios embrionários foram obtidos e confirmados pelas análises histológicas;
- A origem das células meristemáticas durante a indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de *Elaeis oleifera* provém das células procâmbiais;
- Durante a indução da embriogênese somática os calos primários se originam aos 30 dias de cultivo em meio de cultura de indução;
- Embriões zigóticos de *Elaeis oleifera* induzidos à embriogênese somática originaram pró-embriões aos 180 dias de cultivo em meio de cultura de indução;

- Após 60 dias em meio de diferenciação observou-se o início da formação de estruturas que irão formar um embrião somático.
- As etapas da embriogênese somática estudadas neste trabalho, corroboram com o entendimento dos eventos que ocorrem no início da formação de embrião somático a partir de zigótico e contribuem com o aprimoramento de protocolos das técnicas de cultivo in vitro.

AGRADECIMENTOS

À fundação de amparo à pesquisa do estado do Amazonas (FAPEAM), a concessão de bolsa de estudo à primeira autora.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R.; ZAINAL, A.; YEW HENG, W.; CHUI LI, L.; CHEE BENG, Y.; MEI PING, L.; ABDULLAH SIRAJUDDIN, S.; YAP SOO PING, W.; Lourdes Joseph, J. Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. **Electronic Journal of Biotechnology**, 8:24-35, 2005.
- ABREU, A. G.; PRIOLLI, R. H.G.; AZEVEDO-FILHO, J. A.; NUCCI, S. N.; ZUCCHI, M. I.; COELHO, R. M.; COLOMBO, C. A. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Biology**, 35:119-121, 2012.
- 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 & Developmental Biology-Plant**, 49(1), 41-50. 2013.
- BESSE, I.; VERDEI, J. L.; DUVAL, Y.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; MIGINIAC, E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. **J Exp Bot** 252:983–989. 1992.
- BHERING, L. L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.17: 187-190p, 2017.
- BONETTI, K. A. P.; NESI, J.; QUISEN, R. C.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* × *Elaeis oleifera*). **African Journal of Biotechnology**, 15(37), 2028-2037.2016.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CADAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**.Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, p. 87-131. 1998.

- CHAN, J. L.; SÁENZ, L.; TALAVERA, C.; HORNING, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, 17(6-7), 515-521.1998.
- DUSSERT, S.; VERDEIL, J. L.; RIVAL, A.; NOIROT, M., BUFFARD-MOREL, J. Nutrient uptake and growth of in vitro coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. **Plant Science**, 106(2), 185-193. 1995.
- DUVAL, Y.; ENGELMANN, F.; DURAND-GASSELIN, T. Somatic Embryogenesis in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I**. Y.P.S Bajaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 30, 1995.
- EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 23-28, 1976.
- ESHRAHGI, P.; ZARGHAMI, R.; MIRABDULBAGHI, M. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. **African Journal of Biotechnology**, 4 (11): 1309-1312, 2005.
- GRANJA, M. M.; MOTOIKE, S. Y.; ANDRADE, A. P. S.; CORREA, T. R.; PICOLI, E. A.; KUKI, K. N. Explant origin and culture media factors drive the somatic embryogenesis response in *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., an emerging oil crop in the tropics. **Industrial Crops and Products**, 117, 1-12. 2018.
- GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 65-71, 1998.
- GUERRA, P.M.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, A.T. Embriogênese somática e semente sintética. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, p. 533-568, 1999.
- GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; TRANBARGER, T. J.; SANE, D.; TREGGAR, J. W.; BORGEL, A.; VERDEIL, J. L. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 99:35-45, 2009.
- GUZZO F., BALDAN B., MARIANI P., LO SCHIAVO F., TERZI M. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. J. **Exp. Bot.** 45: 1427–1432, 1994.
- HEEDCHIM, V. **Molecular markers and flow cytometry for identification of abnormal oil plantlet in vitro** (in Thain). Dissertação de mestrado. Universidade Prince of Sonkla, Tailândia, 119p. 2014.
- JAYANTHI, M.; MOHAN, N. M.; MANDAL, P. K. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. **J. Plant Biochem Biotechnol** 20:249–251. 2011.
- JIMÉNEZ, V. M.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Evolution of endogenous

- hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. v.23, p.567–572, 2005.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., 523p. 1940.
- KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. **Sci Asia** 25:195–202. 1999.
- KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, 1623-1628. 2004.
- KERDSUWAN, S; TE-CHATO, S. Direct somatic embryo formation from roots of in vitro-seedlings of oil palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.). **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, v. 13, n. 1, p. 45-53, 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 yr on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell. Rep** 29:1–13. 2010.
- LEDO A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADI, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; FILHO, S. M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura** 24:601–603. 2002.
- LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Published online, may, 2014.
- MACIEL, S. D. A.; JUNIOR, F.; POETA, P. C.; SILVA, R. A. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 32(2), 263-267. 2010.
- MATTIA, R. C. **Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de dendezeiro** (*Elaeis guineensis* Jacq.). Monografia. Universidade Federal do Paraná. 2013.
- MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, 67(4), 399-407. 2010.
- MOURA, E.F.; MOTOIKE, S.Y.; VENTRELLA, M.C.; JUNIOR, A.Q.S.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, 119: 447–454, 2009.
- MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; JUNIOR, A.Q.S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E.. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos

of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 95:175–184, 2008.

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 bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497. 1962.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 90:1–8, 2007.

NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. Plant propagation-meristem cultures, somatic embryogenesis. In Neumann K.H. Kumar A and Imani J (eds.) **Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology: basics and application**. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 75-135. 2009.

O’BRIEN, T.P.; McCully, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Termarcaphi Pty Ltd, Melbourne. 46p. 1981.

PORTILLO, L.; SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; GUTIÉRREZ-MORA, A.; RODRÍGUEZ-GARAY, B. Somatic embryogenesis in Weber cultivar azul **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 43:569–575, 2007.

RAJANAIDU, N.; KUSHAIRI, A.; RAFIL, M.; HOHD DIN, A.; NAIZURA, I. B. S.. Oil palm breeding and genetic resources. In: BASIRON, B.S.; CHAN, K. W. **Advances in oil palm research**. v.1, p.171. 2000.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histochemical analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, 98(2), 301-308. 2006.

SÁENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J. L.; VERDEIL, J. L. HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 42(1), 19-25. 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA J. E.; GUEDES R. S.; FERMINO P. C. P; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cell Dev Biol Plant** 46:378–385. 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A. FERMINO JR, P. C. P.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 109:501-508, 2012.

- SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, n. 1, p. 43-52, 1988.
- SILVA, R. C.; GOMES, L. Z.; 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.
- 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 Organ Cult** 111:59–67. 2012.
- SOMLEVA, M. M.; KAPCHINA, V.; ALEXIEVA, V.; GOLOVINSKY, E. Anticytokinin effects on in vitro response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylis glomerata* L. **Plant Growth Regulat.**, 16: 109–112, 1995.
- STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, 108(8), 1463-1475. 2011.
- STEINMACHER, D.A.; CANGAHUALA-INOCENTE, G.C.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. In Vitro Cell. Dev. **Biol.—Plant**, 43:124–132, 2007.
- TAIZ, L.; Zeiger, E.; Møller, I. M.; Murphy, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora. 2017.
- TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; NAKAMURA, T., KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell Tissue, and Organ Culture**, v. 40, p.105 - 111, 1995.
- TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 247-250, 1994.
- TEIXEIRA, J. B.; SONDAHLL, M. R.; KIRB, E. G.. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tiss Org Cult** 34:227–233.1993.
- THAWARO, S.; TE-CHATO, S. Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. **J Agric Technol** 5:167–177. 2009.
- THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C.. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. ‘Tenera’ through somatic embryogenesis. **Acta Physiol Plant** 33:123–128. 2011.
- VALOIS, A.C.C.. **Possibilidades da cultura do dendê na Amazônia**. Brasília: Embrapa-Cenargen (Embrapa-Cenargen. Comunicado Técnico, n.19). 7p. 1997.
- VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G.S.. The impact of Gelrite and activated

carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media **Plant Cell Reports**, 21:1175-1182, 2003.

VERDEIL, J. L.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant cell reports**, 13(3-4), 218-221. 1994.

VERDEIL, J.P.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M.. Ultrastructural Changes in Coconut Calli Associated with the Acquisition of Embryogenic Competence. **Annals of Botany**, 88: 9-18, 2001.

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

YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 16:205-248, 1995.

ANEXOS

Ensaio 1

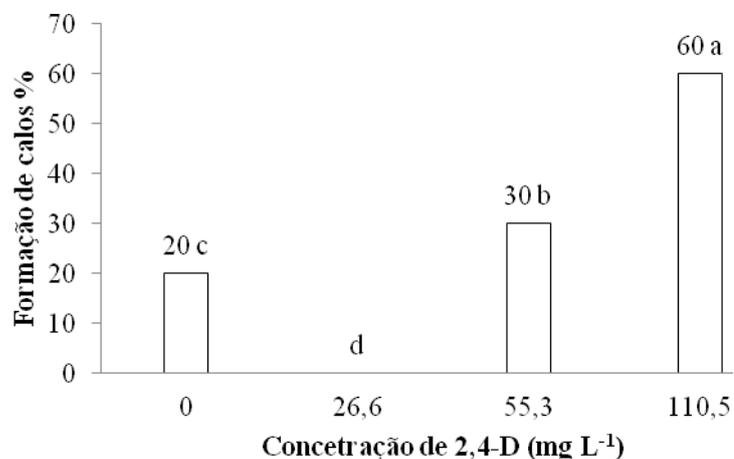


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na formação de calos primários induzidos durante a embriogênese somática de *Elaeis oleifera* aos 30 dias de cultivos. T1: controle; T2: 26,6 mg L⁻¹ T3: 55,3 mg L⁻¹ e T4: 110,5 mg L⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

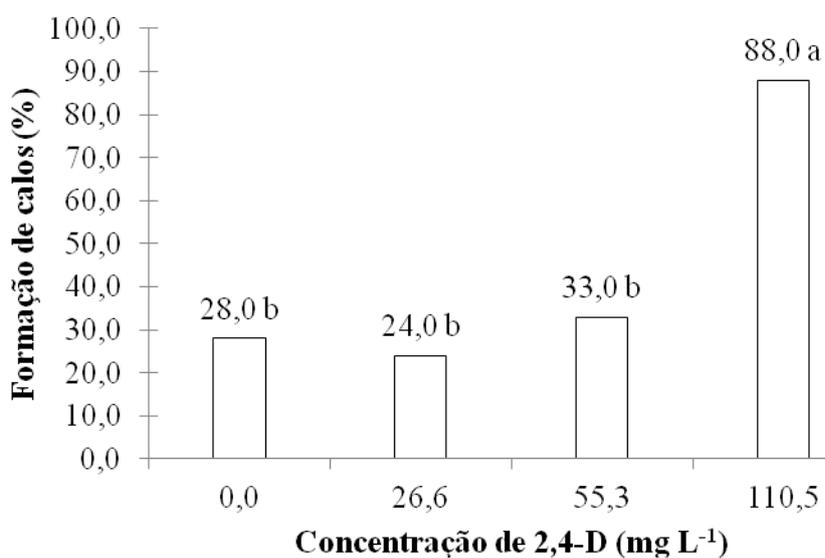


Figura 2. Porcentagem de formação de calos globulares de *Elaeis oleifera* em diferentes concentrações de 2,4-D ao final de 150 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

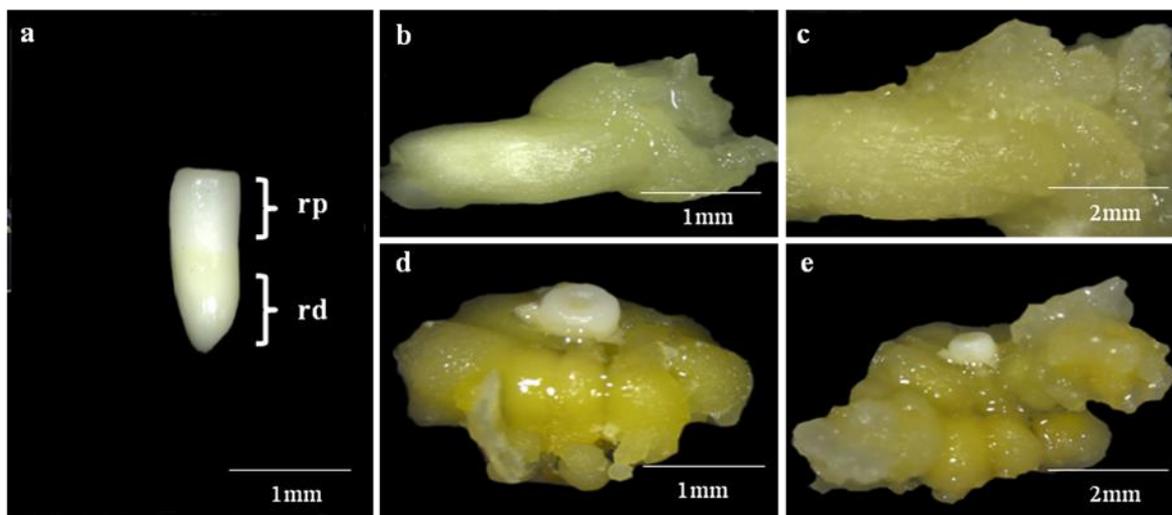


Figura 3. Formação de calos em embrião de *Elaeis oleifera* durante a embriogênese somática. a) embrião zigótico de *Elaeis oleifera* demonstrando região proximal e região distal do explante; b) explante com 60 dias de cultivo em meio MS com 2,4-D a 27,6 mg L⁻¹ com formação de calos com características não embriogênicas; c) explante com 150 dias de cultivo em meio MS com 2,4-D a 27,6 mg L⁻¹ com calos não embriogênicos; d) explante com 60 dias de cultivo em meio MS com 2,4-D a 55,3 mg L⁻¹, formação de calos embriogênicos e) explante com 150 dias de cultivo em meio MS com 2,4-d a 55,3 mg L⁻¹, formação de calos embriogênicos. (rp: região proximal; rd: região distal).

Ensaio 2

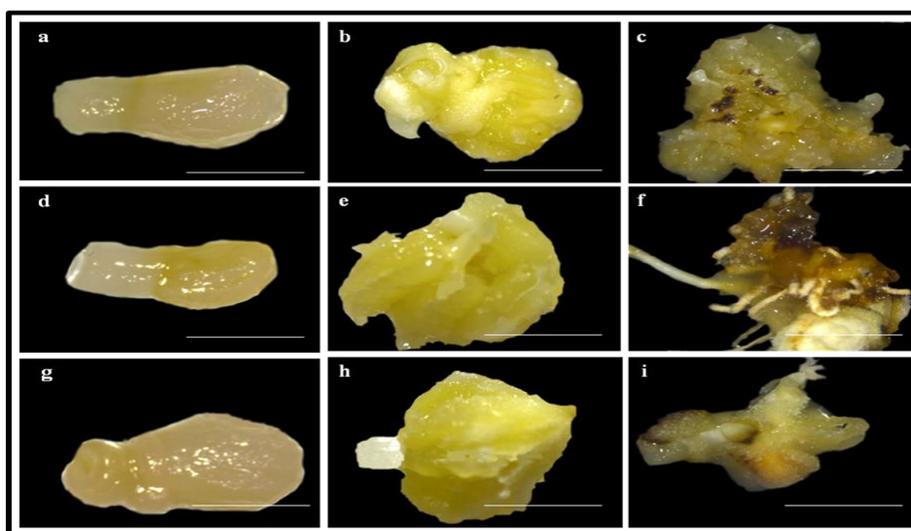


Figura 4. Embriões de *Elaeis oleifera* durante a indução da embriogênese somática em diferentes meios de cultura acrescido de regulador de crescimento 2,4-D a 110 mg L⁻¹. a-c: meio MS; d-f: meio OPCM; g-i: meio Y3; a, d, g: embriões entumescidos com 14 dias de cultivo; b, e, h: explante com 30 dias com formação de calos primários; c, f, i: calos aos 130 dias, onde c) calos embriogênicos, f) calos não embriogênicos e com formação de raízes; i) calos não embriogênicos. (barras = 1cm).

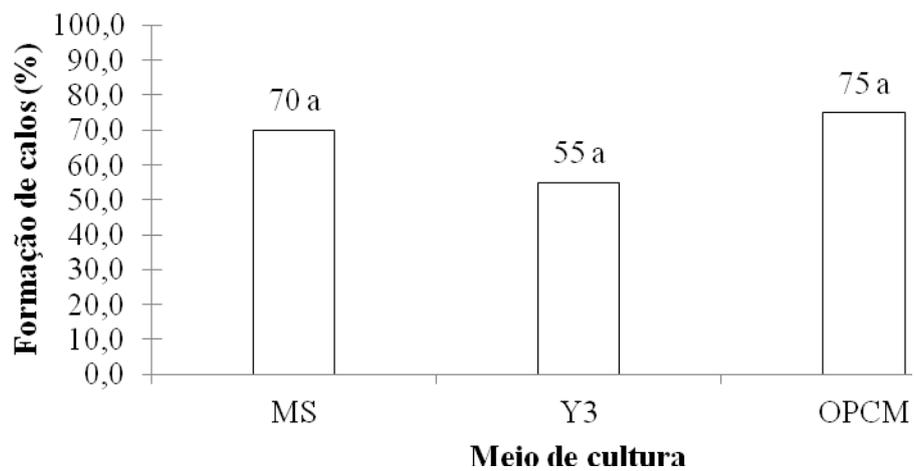


Figura 5. Efeito dos diferentes meios de cultura na indução de calos primários de *Elaeis oleifera* ao final de 30 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

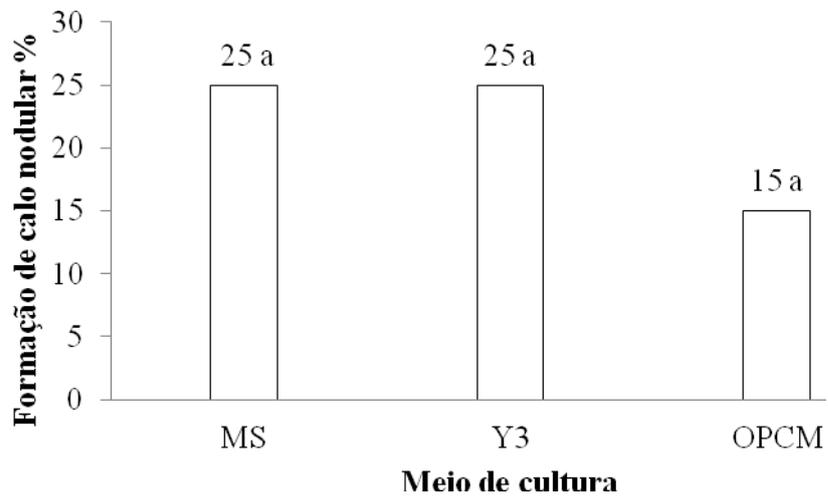


Figura 6. Efeito dos diferentes meios de cultura na formação calos nodular de *Elaeis oleifera* ao final de 30 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ensaio 3

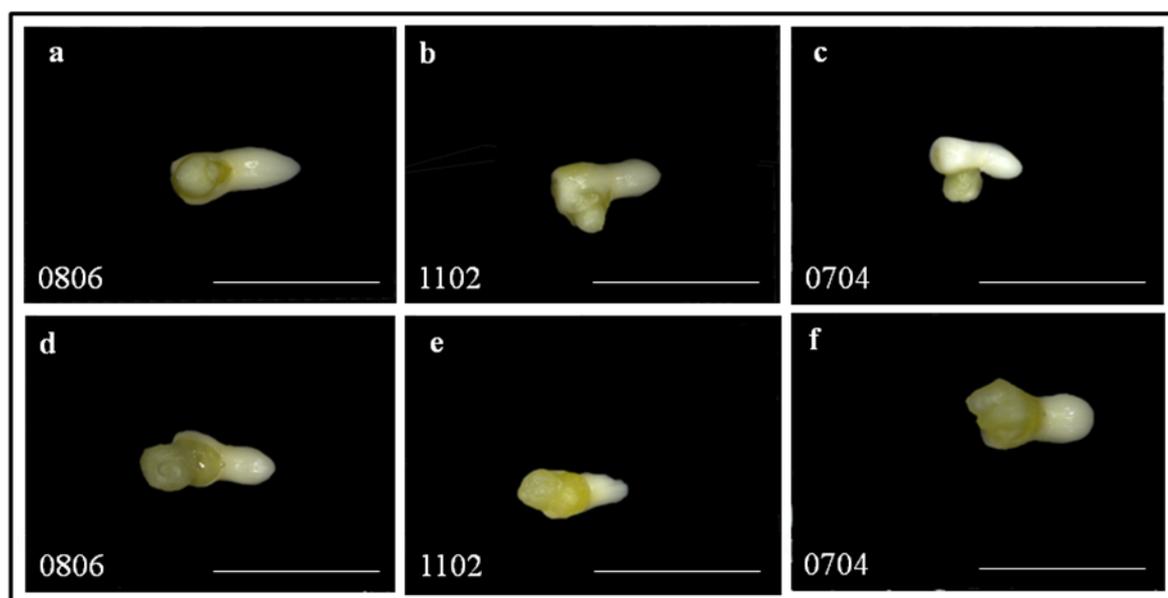


Figura 7. Resposta dos diferentes genótipos e reguladores de crescimento na indução de calos em *Elaeis oleifera* ao final de 30 dias. a-c: genótipos em meio de cultura MS acrescido do regulador 2,4-D (110 mg L^{-1}). d-e: genótipos em meio de cultura MS acrescido do regulador Picloram ($108,5 \text{ mg L}^{-1}$). (Barras = 1cm).

Tabela 1: Porcentagem da formação de calos embriogênicos de *Elaeis oleifera* em diferentes genótipos.

Genótipos	Calos embriogênicos 180 dias
Genótipo 0704	13 a
Genótipo 1102	4,5 b
Genótipo 0806	13,5 a
DMS	5,38

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2: Porcentagem do efeito dos reguladores de crescimento na indução de calos de *Elaeis oleifera* em diferentes genótipos.

Reguladores	Calo primário	Calo Embriogênico	Calo não embriogênico
	30 dias	180 dias	180 dias
Picloram $108,5 \text{ mg L}^{-1}$	87,33 a	17,33 a	0,66 a
2,4-D 110 mg L^{-1}	65,00 b	3,33 b	29,66 b
DMS	10,31	3,66	6,52

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Análises anatômicas

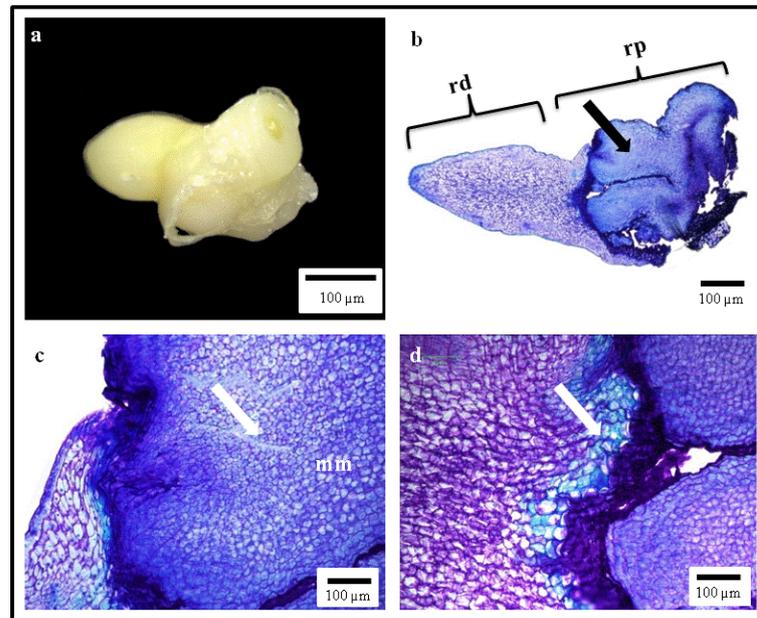


Figura 8. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 30 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos primários; b-d: cortes longitudinais do embrião; b) embrião zigótico apresentando região proximal diferenciada em relação a região distal, divisões periclinal e anticlinal das células (seta); c) região proximal apresentando células com características meristemáticas (seta). d) detalhe da diferença das células do embrião e da células em divisão (seta); (rp: região proximal, rd: região distal, mm: massa meristemática).

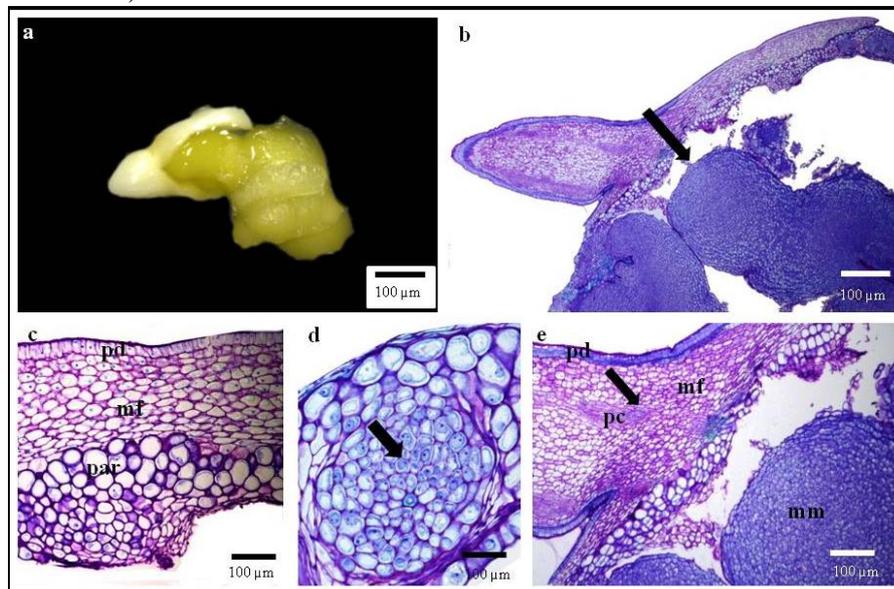


Figura 9. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 60 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos primários de coloração amarela; b) embrião zigótico apresentando região proximal diferenciada em relação à região distal; c) detalhe da presença de protoderme, meristema fundamental e células parenquimáticas; d) aglomerado de células meristemáticas na região proximal com intensa divisão celular (seta); e) transição entre região proximal e distal do embrião. (pd: protoderme, mf: meristema fundamental, par: parênquima, pc: procâmbio, mm: massa meristemática).

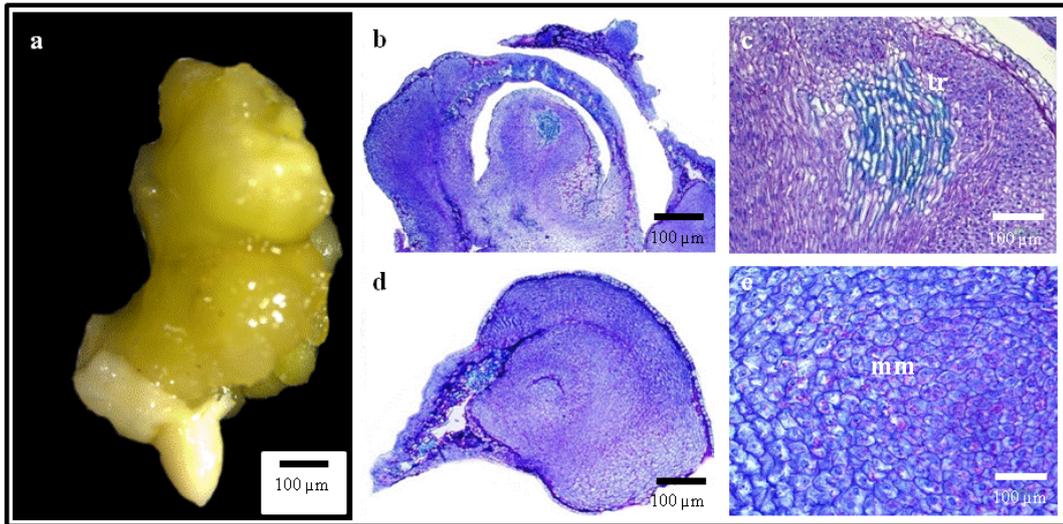


Figura 10. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 90 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos nodulares de coloração amarela; b) região proximal com massas meristemáticas; c) região proximal com elementos traqueais; d) fragmentação de massa meristemática com aspecto nodular; e) região meristemática. (mm: massa meristemática; tr: elementos traqueais).

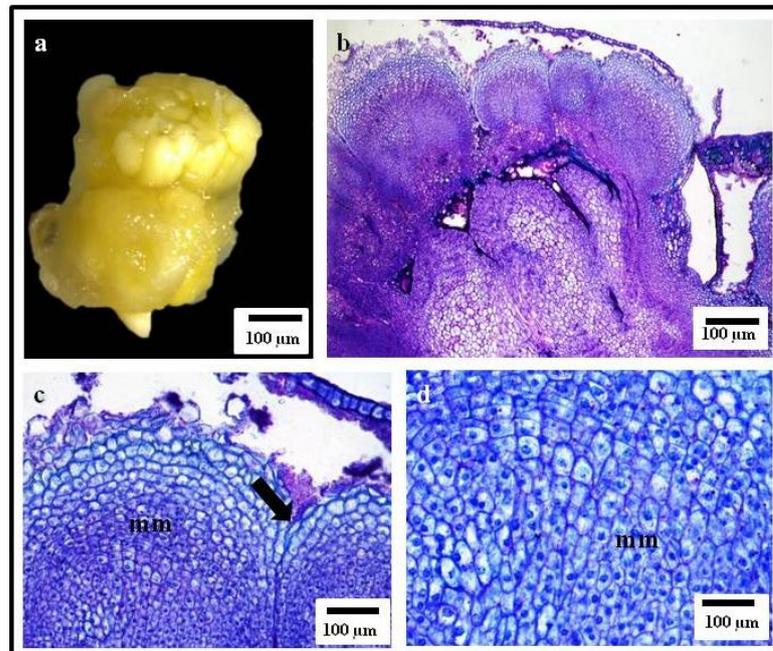


Figura 11. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 120 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos globulares de coloração amarela; b) aspecto geral de calos embriogênicos constituídos por células meristemáticas; c) região meristemática início da formação da protoderme (seta); d) detalhe de células meristemáticas (eg: embrião globular; mm: massa meristemática).

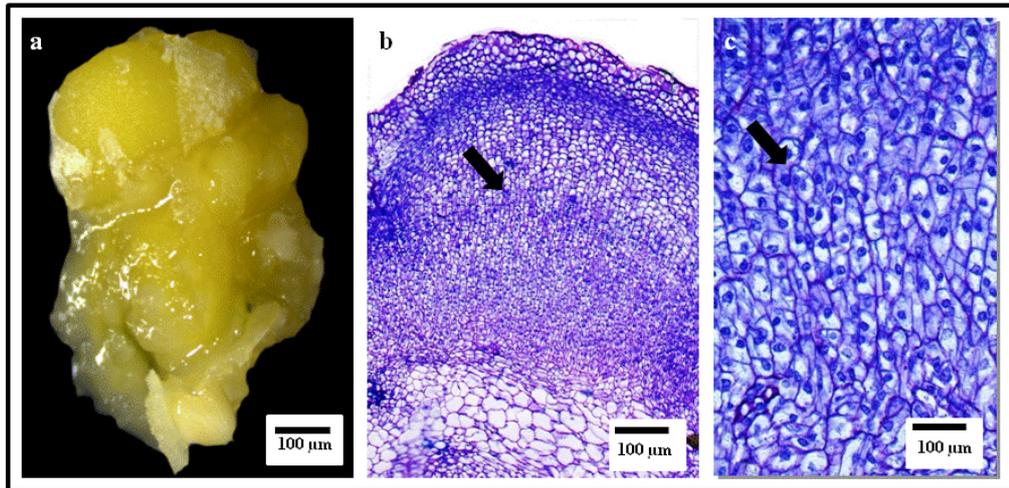


Figura 12. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 150 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos globulares de coloração amarela; b) aspecto geral de calos embriogênicos constituídos por células meristemáticas com divisões anticlinal (seta); c) região meristemática com células em divisão (seta).

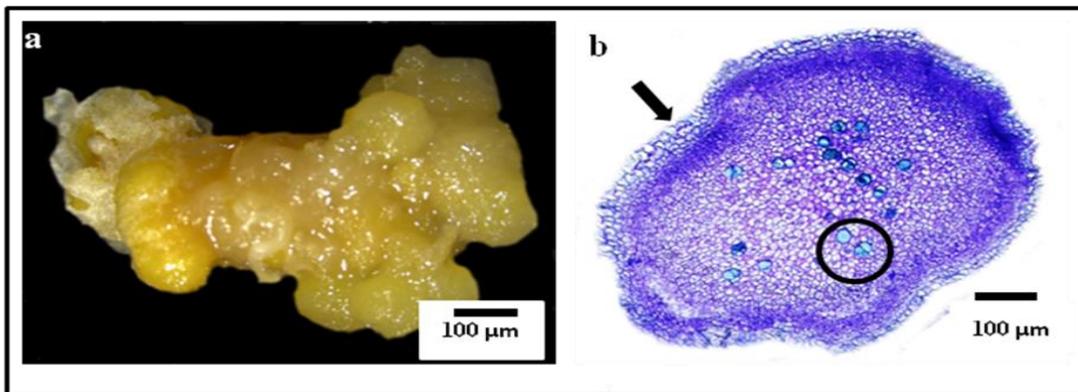


Figura 13. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 180 dias de cultivo em meio de cultura para a indução da embriogênese somática. a) embrião zigótico com calos globulares de coloração amarela; b) aspecto geral de pró-embriões constituídos por células meristemáticas e elementos traqueais.

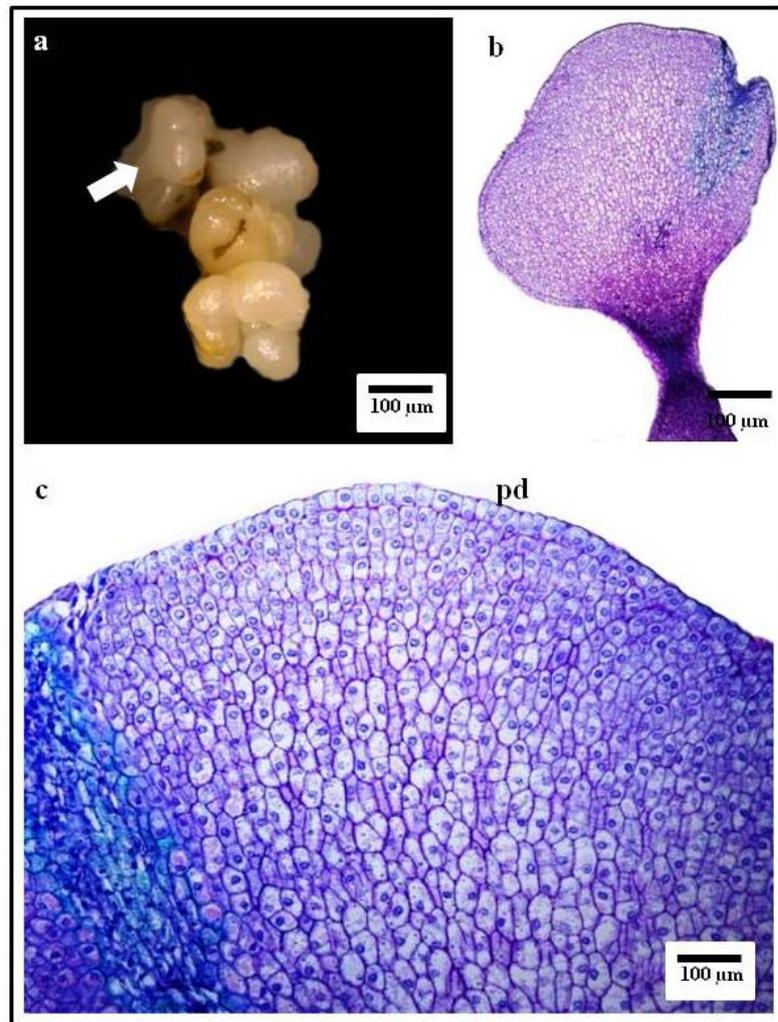


Figura 14. Secções de explante de *Elaeis oleifera* aos 60 dias de cultivo em meio de diferenciação de embriões somáticos. a) embrião zigótico com calos globulares de coloração branca; b) embrião somático; c) detalhe da protoderme.

Tabela 3: Quadro ANOVA do ensaio 3 –Teste com diferentes genótipos e reguladores de crescimento

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	2	2046.66667	1023.3333	10.0109 **
Fator2(F2)	1	5880.00000	5880.0000	57.5217 **
Fator3(F3)	4	19253.33333	4813.3333	47.0870 **
Int. F1xF2	2	3380.00000	1690.0000	16.5326 **
Int. F1xF3	8	3086.66667	385.83333	3.7745 **
Int. F2xF3	4	8853.33333	2213.3333	21.6522 **
Int.F1x2x3	8	5086.66667	635.83333	6.2201 **
Tratamentos	29	47586.66667	1640.91954	16.0525 **
Resíduo	90	9200.00000	102.22222	
Total	119	56786.66667		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$); ns não significativo ($p \geq .05$)