

Rede Centro Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação  
Instituto de Ciências Biológicas – IB  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília – UnB

Filipe Sathler Meira

FATORES ENVOLVIDOS COM A CALOGÊNESE VISANDO A EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA EM *Acrocomia aculeata*: MORFOANATOMIA, BIOQUÍMICA E  
EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS

Abril/2019

Brasília – DF

**Filipe Sathler Meira**

FATORES ENVOLVIDOS COM A CALOGÊNESE VISANDO A EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA EM *Acrocomia aculeata*: MORFOANATOMIA, BIOQUÍMICA E  
EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, da Universidade de Brasília, como exigência para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Abril/2019

Brasília – DF

**Filipe Sathler Meira**

FATORES ENVOLVIDOS COM A CALOGÊNESE VISANDO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Acrocomia aculeata*: MORFOANATOMIA, BIOQUÍMICA E EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS

---

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, da Universidade de Brasília, como exigência para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira (Presidente)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Dr. Francisco José Lima Aragão  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Dra. Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso  
Universidade de Brasília – UnB

---

Dr. João Batista Teixeira  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Dra. Lucilia Helena Marcellino (Suplente)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Aos meus pais, Normando e Cássia, e à minha esposa Vanessa  
Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço,

A Deus, por conceder a oportunidade de estudar a vida que Ele criou;

Aos meus pais, Normando e Cássia pelo apoio, incentivo e todo amor dedicado,

À Vanessa por todo amor e carinho.

À tia Marta e família pelo apoio.

Ao meu orientador, Jonny Everson Scherwinski-Pereira, pela orientação, confiança depositada e paciência.

Às Dra. Lucilia Helena Marcellino, Dra. Diva Maria De Alencar Dusi e Dra. Ângela Mehta por toda contribuição e conhecimento compartilhado.

Ao pesquisador Leo Duc Haa Carson Schwartzhaupt da Conceição pelo apoio.

À todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II e Laboratório de Proteômica, por todo apoio e amizade.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e UNB pela oportunidade de estudos e utilização das instalações para a realização dos experimentos.

À Capes pela concessão da bolsa.

À todos aqueles que, de alguma forma, deram sua contribuição para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 Localização geográfica dos parentais das matrizes de macaúba provenientes da Embrapa Cerrados, utilizadas como fontes dos palmitos para os experimentos de calogênese visando a embriogênese somática. .... 41

Figura 2 Coleta do palmito da macaúba para os experimentos de indução da calogênese visando a embriogênese somática (A-E) e planta regenerada pós extração do palmito (F). A: Retirada das folhas mais externas com ajuda de motosserra com extensor; B: Região próxima ao meristema; C: Região de corte do palmito com aproximadamente 10 cm de distância do meristema; D: Superfície do estipe da planta mostrando a região de retirada do palmito; E: Planta em início de regeneração; F: Planta totalmente regenerada. .... 42

Figura 3 Procedimento de limpeza e assepsia do material no laboratório para indução da calogênese visando a embriogênese somática. A: Material proveniente do campo; B: Palmito pós extração das folhas mais externas; C: Palmito reduzido para 30 cm de comprimento; D: Assepsia realizada em proveta dentro de câmara de fluxo laminar; E: Material asséptico para a introdução *in vitro*; F: Divisão do palmito em três partes iguais; G: Inoculação dos explantes ..... 43

Figura 4. Respostas do cultivo *in vitro* de explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*), provenientes de diferentes regiões do palmito, seccionados ou não. A: Placas com explantes do tipo padrão (não seccionado) e cortina (seccionado). B: Formação de cristais na borda do explante. C: Explante do tipo cortina apresentando a formação de calos; observar oxidação no local de corte. D: Explante do tipo padrão apresentando formação de calos. Escalas: 2 mm. .... 52

Figura 5. Percentuais de formação de calos em explantes foliares (padrão – sem seccionamento e cortina – com seccionamento) de macaúba (*Acrocomia aculeata*) proveniente de três diferentes regiões do palmito (Distal, Mediana e Proximal), após 30 dias em meio de indução de calos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tipos de explantes (seccionados ou não) dentro de cada região do palmito e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as regiões, dentro de cada tipo de explante, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão. .... 53

Figura 6. Percentuais de oxidação em explantes foliares (padrão – sem seccionamento e cortina – com seccionamento) de macaúba (*Acrocomia aculeata*) provenientes de três diferentes regiões do palmito (Distal, Mediana e Proximal), após 30 dias em meio de indução de calos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tipos de explantes (seccionados ou não) dentro de cada região do palmito e letras maiúsculas

diferentes indicam diferenças significativas entre as regiões, dentro de cada tipo de explante, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão..... 54

Figura 7. Percentuais de oxidação em explantes foliares (padrão – sem seccionamento e cortina – com seccionamento) de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias em meio de indução de calos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão. .... 55

Figura 8. Respostas do cultivo *in vitro* de explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) posicionados horizontal e verticalmente no meio de indução de calos. A: Explante na posição vertical apresentando as primeiras respostas ao cultivo *in vitro*. B: Explante na posição vertical com início de calos. C: Explante na posição horizontal apresentando as primeiras respostas ao cultivo *in vitro*. D: Explante na posição horizontal com início de calos. Escalas: A, C e D: 2mm B: 1mm ..... 56

Figura 9. Porcentagem de formação de calos em diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com 450 µm de Picloram, aos 90 dias em meio de indução de calos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão ..... 57

Figura 10. Porcentagem de formação de calos em explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) provenientes das regiões Distal e Mediana do palmito e posicionados horizontal (padrão) e verticalmente no meio de cultivo, aos 90 dias de cultivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as regiões do palmito e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre posicionamento dos explantes dentro de cada região, com relação ao posicionamento do explante, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão. .... 58

Figura 11. Porcentagem de formação de calos em explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) provenientes das regiões Distal e Mediana do palmito aos 180 dias em meio de indução de calos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão. .... 59

Figura 12. Porcentagem de formação de calos em explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) posicionados horizontal e verticalmente em meio de indução de calos aos 180 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão. .... 59

Figura 13. Porcentagem de formação de calos em explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) sob efeito de diferentes concentrações da auxina 2,4-D aos 180 dias em meio de indução. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão..... 60

Figura 14. Porcentagem de formação de calos nos três acessos de *Acrocomia aculeata* testados sob efeito de Picloram. Médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão..... 61

Figura 15. Porcentagem de sobrevivências de calos em meio de diferenciação de embriões somáticos, após 90 dias em meio de diferenciação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão. Tratamentos: ANA + BAP (T1), ANA + 2iP (T2), 2,4 - D + BAP (T3), 2,4 - D + 2iP (T4), Picloram + BAP (T5), Picloram + 2iP (T6), BAP (T7) e 2iP (T8).. 62

Figura 16. Caracterização anatômica de folhas imaturas de uma planta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) utilizadas como explantes iniciais na indução de calos e de calos formados após 30 e 90 dias em meio de indução. A: Explante inicial da região Mediana; B: Explante da região Mediana aos 30 dias; C: Explante da região Mediana aos 90 dias; D: Explante inicial da região Distal; E: Explante da região Distal aos 30 dias; F: Explante da região Distal aos 90 dias..... 64

Figura 17. Análise anatômica e histoquímica (com *Periodic Acid Schiff* – PAS) de diferentes linhagens de calos obtidos a partir de tecidos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) provenientes do cultivo sob diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com 450 µM de Picloram. A-C: Calo obtido somente com Picloram; D-F: Calo obtido com Picloram associado com 150 µM 2,4-D; G-I: Calo obtido com Picloram associado com 300 µM 2,4-D; J-L: Calo obtido com Picloram associado com 450 µM 2,4-D; Escalas: A, D, G, J: 1 mm; B, C, E, F, H, I, K, L: 50 µm. .... 65

Figura 18. Análise anatômica e histoquímica (com *Periodic Acid Schiff* – PAS) de diferentes linhagens de calos obtidos a partir de tecidos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) cultivados sob efeito de Espermidina ou Putrescina durante a etapa de multiplicação. A: Calos obtidos em meio de multiplicação com Espermidina; B: Calos obtidos em meio de multiplicação com Putrescina; C: Corte anatômico de calos obtidos em meio de multiplicação com Espermidina; D: Corte anatômico de calos obtidos em meio de multiplicação com Putrescina; E: Corte anatômico de calos obtidos em meio de multiplicação com Espermidina apresentando acúmulo de grãos de amido (seta); notar composto fenólico (\*). F: Corte anatômico de calos obtidos em meio de multiplicação com Putrescina apresentando acúmulo de grãos de amido; (seta); notar composto fenólico (\*). Escalas: A e B: 1 mm; C: 500 µm; D: 200 µm; E e F: 50 µm. .... 67

Figura 19. Análise anatômica e histoquímica (com *Periodic Acid Schiff* – PAS) de um calo com raiz obtido a partir de tecido foliar de macaúba (*Acrocomia aculeata*) cultivado sob efeito de ANA e BAP (fase de diferenciação). A: Calo apresentando raiz e cor alaranjada; B, C: Corte anatômico da raiz apresentando formação de calo; D, E: Acúmulo de grãos de amido na adjacência de calo formado a partir de células vasculares da raiz. Escalas: A: 2 mm; B e D: 200 µm; C e E: 50 µm. .... 68

Figura 20 Análise anatômica de calos de *Acrocomia aculeata* obtidos na etapa de diferenciação de embriões somáticos aos 90 dias em meio de cultivo com diferentes combinações de auxinas e citocininas tratamentos de T1 a T4. A: Calo obtido em ANA + BAP (T1), B e C: Corte anatômico de T1, D: Calo obtido em ANA + 2iP (T2), E e F: Corte anatômico de T2; G: Calo obtido em 2,4-D + BAP (T3), H e I: Corte anatômico de T3; J: Calo obtido em 2,4-D + 2iP (T4), K e L: Corte anatômico de T4. Escalas A, D, G, J: 2mm; B, E, H, K: 500 µm F: 200µm; C, I, L: 50µm ..... 70

Figura 21 Análise anatômica de calos de *Acrocomia aculeata* obtidos na etapa de diferenciação de embriões somáticos aos 90 dias em meio de cultivo com diferentes combinações de auxinas e citocininas tratamentos de T5 a T8 A: Calo obtido em Picloram + BAP (T5), B e C: Corte anatômico de T5, D: Calo obtido em Picloram + 2iP (T6), E e F: Corte anatômico de T6; G: Calo obtido em BAP (T7), H e I: Corte anatômico de T7, J: Calo obtido em 2iP (T8), K e L: Corte anatômico de T8. Escalas A, D, G, J: 1 mm; B, E, H, K: 500 µm; C, F, I, L: 50µm ..... 71

Figura 22. Teores de açúcares solúveis totais (AST) em explantes foliares imaturos de três acessos de *Acrocomia aculeata* testados na indução de calos visando a embriogênese somática, aos 0 dias (imediatamente antes da inoculação *in vitro*) e 120 dias após o estabelecimento do cultivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos, dentro de cada acesso e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os acessos dentro de cada tempo de avaliação, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão. .... 73

Figura 23. Teores de açúcares solúveis totais (AST) em calos alongados (Al) e nodulares (No) provenientes de explantes foliares imaturos de *Acrocomia aculeata* usados na indução da calogênese visando a embriogênese somática. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão. .... 74

Figura 24. Teores de proteínas totais em calos Alongados (Al) e Nodulares (No) de explantes foliares imaturos de *Acrocomia aculeata*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão. .... 76

## CAPÍTULO 2

Figura 1 Avaliação dos cDNAs por RT-PCR utilizando um par de primers para actina diluído 1:50. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. As replicas do acesso responsivo e tempos de coleta estão indicados por R 0DAI, R 120DAI, e do acesso não responsivo por NR 0DAI, NR 120DAI. MM: Marcador 1 Kb Plus, Co-: Controle negativo. .... 110

Figura 2 Gráficos mostrando ausência de contaminação com DNA genômico e amplificação dos genes de referência ACT2 e PD00569. A e B: Gráfico e curva de dissociação da RT-

qPCR feita com um *pool* de todos os RNAs tratados com DNase para verificar contaminações com DNA genômico utilizando o primer de referência PD00569. Gráficos de amplificação dos genes de referência ACT2 (C) e sua curva de dissociação (D), e gráficos de amplificação do gene de referência PD00569 (E) e sua curva de dissociação (F)..... 111

Figura 3 Média da estabilidade da expressão dos genes de referência e genes candidatos. 112

Figura 4 Curva de dissociação da amplificação (*Melt curve*) dos sete genes candidatos que apresentaram amplificação em todos os acessos e tempos de coleta. A: *SERK*, B: *OASA*, C: *EF1*, D: *ANN1*, E: *LEA*, F: *CAT2* e G: *MDAR5*. ..... 114

Figura 5 Análise da expressão relativa dos genes candidatos comparando o acesso R x NR em cada estágio de coleta. Barras com \* indicam expressão significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 116

Figura 6 Análise da expressão relativa dos genes candidatos aos 120 dias de indução, utilizando o tempo inicial como controle, *time-course*. Barras com \* indicam expressão significativa. .... 117

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para a confirmação do gene *SERK* isolado a partir de calos embriogênicos de *Acrocomia aculeata*. M: Marcador 100 plus Ladder ML: Marcador DNA Low Mass (concentração em 4  $\mu$ L); C1 e C2: Controle 1 e 2, A: Banda da amostra do gene *SERK* isolado destacado em vermelho. .... 118

Figura 8. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do gene *SERK* das espécies: *Acrocomia aculeata*, *Phoenix dactylifera*, *Cocos nucifera* e *Elaeis guineensi*. ..... 119

Figura 9. Filogenia de 21 seqüências de aminoácidos da família do gene *SERK* em relação ao gene da macaúba (*Acrocomia aculeata*) com respectivos acessos no NCBI. .... 120

Figura 10 Representação esquemática dos domínios da proteína de AacSERK de acordo com o gene parcial obtido e desenhado utilizando o software *Search Domain Pfam*. LRR: *Leucine Rich Repeat*. .... 120

Figura 11. Folha imatura com calo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e localização da expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ* em cortes histológicos. A: Folha imatura com calo de macaúba separados para a hibridização *in situ*; B: Cortes histológicos evidenciando a presença de RNA total (coloração laranja) após teste com laranja de acridina; C,D: Cortes histológicos da região da nervura da folha que foram utilizados em C para controle da hibridização *in situ* utilizando sonda Senso, não apresentando hibridização, e em D apresentando sinal hibridização, após hibridização *in situ* utilizando sonda anti-Senso; E, F: Cortes histológicos de calos que utilizados em E para controle da hibridização utilizando sonda Senso, sem apresentar sinal de hibridização *in situ*, e F apresentando sinal de hibridização *in situ* utilizando sonda anti-Senso. Escalas: A: 0,5 mm, B, C e D: 40  $\mu$ m. E e F: 200  $\mu$ m. .... 121

## INDÍCE DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados durante os experimentos de indução, multiplicação de calos e diferenciação de embriões somáticos, a partir segmentos foliares de *Acrocomia aculeata*..... 48

Tabela 2. Efeito das auxinas Picloram e 2,4-D combinadas em diferentes concentrações e do posicionamento dos explantes no meio de cultivo sobre as percentagens de calos primários, durante a embriogênese somática de macaúba (*Acrocomia aculeata*) aos 30 dias de cultivo, a partir de explantes foliares provenientes de regiões diferentes do palmito..... 57

Tabela 3 Teores de amido em explantes foliares na indução de calos em duas coletas dos três acessos de *Acrocomia aculeata* testados..... 75

Tabela 4 Teores de Proteína totais na indução de calos em duas coletas dos três acessos de *Acrocomia aculeata* durante o tempo de indução ..... 75

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 Genes e iniciadores desenhados para análise de RT-qPCR ..... 103

Tabela 2 Sequências de primers utilizados para clonagem do gene *AacSERK*..... 107

## CONTEÚDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
INDÍCE DE TABELAS .....	VI
Resumo geral.....	1
1 Introdução geral.....	3
2 Revisão de literatura.....	6
2.1 Aspectos botânicos .....	6
2.2 Importância da macaúba.....	9
2.3 Cultura de tecidos de plantas.....	10
2.3.1 Embriogênese somática.....	11
2.4 Estudos anatômicos e histológicos.....	16
2.5 Bioquímica Vegetal.....	18
2.6 Avaliação da expressão de genes por RT-qPCR.....	19
2.7 Hibridização <i>in situ</i> .....	20
2.8 Gene <i>SERK</i> .....	22
3 Referências Bibliográficas .....	23
<b>Capítulo 1</b> .....	38
FATORES ENVOLVIDOS COM A CALOGÊNESE VISANDO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>Acrocomia aculeata</i> : MORFOANATOMIA E BIOQUÍMICA.....	38
1 Introdução.....	39
2 Material e Métodos.....	40
2.1 Material vegetal.....	40
2.2 Indução da calogênese visando a embriogênese somática.....	44
2.2.1 Influência da região do palmito e seccionamento do explante.....	44
2.2.2 Influência da região do palmito, posição do explante no meio de cultivo e combinção de auxinas.....	45
2.2.3 Influência dos acessos .....	45

2.2.4	Características de cultivo comuns aos experimentos de indução de calos.....	46
2.3	Multiplicação de calos.....	46
2.4	Diferenciação de calos em embriões somáticos.....	47
2.5	Análise anatômica e histoquímica.....	48
2.6	Análise bioquímica.....	49
2.6.1	Açúcares solúveis totais .....	49
2.6.2	Amido.....	50
2.6.3	Proteínas totais .....	51
3	Resultados .....	51
3.1	Indução de calos .....	51
3.1.1	Influência da região do palmito e seccionamento do explante.....	51
3.1.1.1	Formação de calos.....	51
3.1.1.2	Oxidação.....	54
3.1.2	Influência da região do palmito, posição do explante e combinação de auxinas....	55
3.1.2.1	Formação de calos.....	55
3.1.3	Influência dos acessos durante a indução.....	60
3.2	Multiplicação de calo .....	61
3.3	Diferenciação de embriões somáticos .....	61
3.4	Análise Anatômica .....	62
3.4.1	Indução .....	62
3.4.2	Multiplicação.....	66
3.4.3	Diferenciação .....	68
3.5	Análise bioquímica.....	72
3.5.1	Açúcares solúveis totais .....	72
3.5.2	Amido.....	74
3.5.3	Proteínas totais .....	75

4 Discussão.....	76
4.1 Indução de calos .....	76
4.1.1 Região do palmito .....	76
4.1.2 Posição e seccionamento do explante .....	78
4.1.3 Associação de auxinas.....	80
4.1.4 Acessos.....	81
4.2 Multiplicação de calos.....	81
4.3 Diferenciação de calos em embriões somáticos.....	82
4.4 Análises anatômicas .....	82
4.4 Análises bioquímicas.....	84
4.4.1 Análise bioquímica dos acessos .....	84
4.4.2 Análise bioquímica dos calos .....	86
5 Conclusões .....	87
6 Referências bibliográficas .....	88
<b>Capítulo 2</b> .....	97
EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES POTENCIALMENTE RELACIONADOS COM A CALOGÊNESE E HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> DO GENE <i>SERK</i> EM MACAÚBA ( <i>Acrocomia aculeata</i> ).....	97
1 Introdução.....	98
2 Material e métodos .....	100
2.1 Expressão de genes e Hibridização <i>in situ</i> .....	100
2.2 Material vegetal.....	100
2.3 Seleção de genes envolvidos na aquisição da competência embriogênica e genes de referência.....	101
2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA para análise da expressão .....	101
2.5 Validação de cDNAs por RT-PCR convencional .....	105
2.6 Análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	105

2.7	Análise de dados.....	106
2.8	Extração de RNA e síntese de cDNA para hibridização <i>in situ</i> .....	106
2.9	Isolamento do SERK e seqüenciamento .....	107
2.10	Preparo do vetor .....	108
2.11	Preparo da sonda .....	108
2.12	Preparo do tecido e hibridização .....	108
3	Resultados .....	110
3.1	Análise da expressão gênica por RT-qPCR .....	110
3.1.1	Comparação da expressão relativa no acesso responsivo (R) e não responsivo (NR) .....	115
3.1.2	Time-course da expressão relativa dos acessos R e NR.....	116
3.2	Hibridização <i>in situ</i> do gene SERK.....	117
3.2.1	Clonagem e seqüenciamento do gene SERK .....	117
3.2.2	Teste com laranja de acridina e localização da expressão de SERK por hibridização <i>in situ</i> .....	120
4	Discussão.....	123
4.1	Expressão gênica de genes candidatos .....	123
4.1.1	Genes associados com desenvolvimento.....	123
4.1.2	Genes associados com o estresse .....	126
4.2	Caracterização do gene <i>SERK</i> e Hibridização <i>in situ</i> .....	127
5	Conclusão .....	128
6	Referências Bibliográficas .....	130

## Resumo geral

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma importante palmeira do Cerrado brasileiro com alto potencial para a produção de óleo vegetal. Sendo assim, a espécie tem sido alvo para o melhoramento vegetal. Esse trabalho teve como objetivo principal induzir a calogênese em macaúba, a partir de tecidos foliares de plantas adultas, e elucidar os eventos morfoanatômicos e bioquímicos, além de avaliar a expressão de genes candidatos envolvidos no processo com o objetivo de elucidar a embriogênese somática futura. Para isso, foram utilizadas folhas imaturas do palmito obtidas a partir de plantas adultas de três acessos de diferentes localidades, avaliando-se a influência da região do palmito e o seccionamento ou não do explante, além da posição do explante no meio de cultivo e a combinação de auxinas Picloram e 2,4-D na indução de calos. Na etapa de multiplicação dos calos foi testada a adição de Espermidina e Putrescina ao meio de cultivo e, para diferenciação de embriões somáticos, foram testados meios contendo diferentes concentrações de BAP combinadas com ANA e, num segundo experimento, combinações de Picloram, 2,4-D e ANA e as citocininas BAP e 2iP em concentrações pré-estabelecidas. Para a análise anatômica e bioquímica, amostras do material *in vitro* oriundas das diferentes etapas do processo foram avaliadas. Também foram retiradas amostras para extração de RNA para avaliação da expressão de genes candidatos em tecidos foliares e para o preparo da sonda com o gene *SERK* visando a hibridização *in situ*. Verificou-se aos 30 dias de indução maior percentual na formação de resposta dos tecidos para a formação de calo primário da região Proximal do palmito (52,5%) quando seccionado. Quando avaliado região, combinação de auxinas e posição percebeu-se que a região do palmito não interfere no percentual desta resposta em explantes posicionados horizontalmente e que, quando posicionados verticalmente, explantes da região Mediana sob efeito de 450  $\mu\text{M}$  de Picloram exibem maior resposta para formação de calos (58,3%) aos 30 dias, enquanto aos 90 e 180 dias a região Distal e explantes posicionados horizontalmente apresentaram maior formação de calos. Quando foi avaliado diferentes acessos, observou-se maior formação de calos no acesso 'Buriti Vermelho' (13%). Os tratamentos testados no presente trabalho ainda não são suficientes para a diferenciação de calos em embriões somáticos. No entanto, foi observado que a associação de ANA+2iP e 2,4-D+BAP foram importantes para manutenção dos calos. Anatomicamente foi possível perceber a formação de calos aos 30 dias de cultivo esta relacionada aos tecidos vasculares. Os calos em meio com associação de auxinas apresentaram características celulares caracterizadas como embriogênicas. As análises bioquímicas referentes dos teores de açúcares solúveis totais evidenciaram que antes do estabelecimento da indução de calos, o acesso 'Buriti Vermelho' apresentou menor quantidade de açúcares solúveis totais comparativamente aos outros acessos. Além disso, o calo nodular apresentou 212,6  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  de matéria seca em relação ao calo alongado que exibiu 111,5  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ . O resultado referente aos teores de amido na indução de calos nos três acessos apresentou diferenças apenas no estágio inicial, com 'Buriti Vermelho' apresentando maiores valores. Os resultados referentes aos teores de proteínas totais em razão do tempo de indução são maiores em todos os acessos no tempo inicial, em comparação aos 120 dias de indução. Além disso, o calo nodular apresentou maiores teores de proteínas (50,4  $\mu\text{g}$  por mg de matéria seca) que o calo alongado (8,03  $\mu\text{g}$ ). Os genes avaliados, quanto a expressão, foram caracterizados como de desenvolvimento (*SERK*, *OASA*, *EF1*, *ANN1*) e estresse (*LEA*, *CAT2* e *MDAR5*). Os resultados obtidos mostraram que todos os genes envolvidos com o desenvolvimento da planta analisados neste estudo tiveram suas expressões

negativamente regulados em 0 dias de indução quando o acesso ‘Buriti Vermelho’ foi comparado com o acesso ‘Tiros’. No entanto, foi possível observar que a expressão relativa dos genes analisados nesta comparação foi positivamente regulada aos 120 DAI. Foi possível observar ainda que o gene de estresse *LEA* apresentou expressão aumentada no acesso ‘Tiros’, enquanto no acesso ‘Buriti Vermelho’ apresentou expressão diminuída. Já os genes *CAT2* e *MDAR5* apresentaram expressão aumentada significativamente nos dois acessos. A hibridização *in situ* demonstrou expressão nos feixes vasculares, indicando ocorrer a expressão de *SERK* nesta região, além da sua expressão em calos. Nesse trabalho foi demonstrado fatores envolvidos na formação de calos em macaúba, porém com necessidade de otimização das etapas finais do processo, em especial, na diferenciação de embriões somáticos. Em função dos resultados obtidos este trabalho apresenta-se como um modelo útil para a investigação dos eventos iniciais da embriogênese somática em palmeiras.

**Palavras-chave:** Arecaceae, *Acrocomia aculeata*, macaúba, tecidos somáticos, cultura de tecidos, embriogênese somática, calos, ontogênese, RT-qPCR, *SERK*, bioquímica, amido.

## **1 Introdução geral**

O interesse por plantas nativas na produção agrícola vem se acentuando nos últimos anos, com a perspectiva de desenvolvimento de novas variedades para cultivo. Além disso, fatores como a crescente preocupação com as questões ambientais, a rápida diminuição das reservas de combustíveis fósseis em todo o mundo e o aumento do preço delas, motivaram o uso de óleos vegetais para a produção de combustíveis alternativos (Machado et al. 2010; Neto e Federal 2011). Portanto, espécies que apresentam este potencial devem ser pesquisadas para uso racional.

A produção e comercialização de biodiesel no Brasil tem potencial para diversificar a energia e atividade agrícola, e dessa forma reduzir a dependência de combustíveis fósseis e contribuir para o crescimento econômico de forma sustentável. Assim, foi desenvolvido o programa nacional Probi biodiesel (Portaria nº 702 do MCT, de 30 de Outubro de 2002) para a produção do biodiesel no país a partir de fontes renováveis. Esse fato exigiu uma crescente demanda em tecnologias, por meio de ações integradas entre instituições de ensino e pesquisa, empresas e associações direta ou indiretamente ligadas ao tema, sob a forma de grupos de trabalho que integram a chamada Rede Brasileira de Biodiesel (Ramos et al. 2003).

Após a criação do Probi biodiesel, o programa passou por diversas reformulações e houve a necessidade de apresentar novos estudos de viabilidade da produção e utilização do biodiesel como fonte alternativa de energia no País. Assim, foi criado o Grupo de Trabalho Interministerial (GTI) em 2003. Com base nesses estudos, foi observada a enorme capacidade produtiva de biomassa no país, além das experiências de pesquisa e produção de biodiesel e a possibilidade de redução das importações de óleo diesel. Em dezembro de 2004 foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que tem proporcionado êxitos na instalação de uma cadeia de produção do biodiesel no País, tornando o Brasil o segundo maior produtor de biodiesel mundial, com a vantagem de poder inserir a agricultura familiar no processo de produção (Silva 2013).

A produção agrícola de espécies oleaginosas é uma atividade promissora no Brasil devido ao clima favorável para o cultivo de diversas destas espécies, destacando o potencial de crescimento de pinhão manso, girassol, soja, mamona, palma africana, babaçu, algodão, amendoim, linhaça, macaúba, pequi, buriti, gergelim, canola, entre

outras (Neto e Federal 2011). Dentre elas, se destacam as espécies da família Arecaceae, como a macaúba (*Acrocomia aculeata*), o dendê (*Elaeis guineensis*) e o babaçu (*Attalea speciosa*), que apresentam elevadas produtividades de óleo por hectare e relativos baixos custos de manutenção e produção, pois são plantas perenes que não necessitam de grandes investimentos anuais (Melo 2012). Em avaliações *in situ* efetuadas em populações de macaúba, têm sido encontrados indivíduos com produção de cinco a sete cachos de até 35 kg/planta (Cargnin et al. 2008). Lleras (1985) relata que a macaúba tem potencial para produzir cerca de cinco toneladas de óleo em uma densidade de plantio de 200 plantas/ha. Portanto, o desempenho dela como oleaginosa pode ser semelhante ao dendê, o que justifica seu nome popular "dendê mineiro" (Dias 2011). Conforme Lanes et al. (2014), plantios de macaúba têm forte potencial semelhante ao dendê para exploração de óleo vegetal, podendo ser cultivada ao lado de culturas agrícolas. Ainda segundo esses autores, o cultivo dessa palmeira pode favorecer a restauração da biodiversidade de ambientes desmatados.

A macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] se distribui desde a América Central até o Sul da América do Sul. No Brasil, ocorre principalmente nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. O principal habitat desta espécie são áreas de vegetação aberta com alta incidência solar, sendo reconhecida como espécie indicadora de solos férteis (Lorenzi e Souza 1996; Motta et al. 2002). Além do sistema de cultivo dessa palmeira ser considerado sustentável do ponto de vista ambiental, social e econômico, a macaúba pode ser utilizada para diferentes fins: as folhas na nutrição animal, os frutos para produção de farinhas e óleos, a casca para biomassa e o endocarpo para carvão. Dos frutos de macaúba pode-se extrair o óleo tanto da polpa quanto da amêndoa, representando, dessa forma, a principal fonte de renda relativa ao uso comercial da espécie (Moura 2007; Ciconini 2012).

Atualmente, apesar de ser considerada como uma espécie de alto potencial de utilização, a exploração da macaúba é feita de forma extrativista, modalidade de exploração caracterizada pela baixa produtividade e qualidade dos produtos gerados (Pires et al. 2011). Portanto, desfavorável para a produção do biodiesel (Motta et al. 2002). Ressalta-se também a heterogeneidade genética do material típica de sistemas extrativistas, que se configura com um entrave à exploração em escala comercial. Além disso, a reprodução exclusivamente de forma sexuada, presença de dormência das sementes e lento crescimento das plantas, também são empecilhos para que a macaúba

ganhe importância mais destacada na produção de biodiesel (Arkcoll 1990). Dessa forma, é de grande importância para a exploração comercial da macaúba, a utilização de tecnologias que possam acelerar a obtenção e propagação de genótipos superiores, a partir de populações naturais, o que tem mobilizado diferentes grupos de pesquisa para esse fim.

A embriogênese somática apresenta-se como uma ferramenta potencial para a propagação clonal de espécies como a macaúba, pois pode permitir, dentre outras aplicações, a clonagem de genótipos selecionados em curto tempo e espaço físico limitado, a partir de diferentes tipos de explantes (propágulos), tais como, embriões zigóticos, inflorescências e folhas imaturas (Zimmerman 1993; Litz and Gray 1995), além da técnica possibilitar a aceleração dos programas de melhoramento genético da espécie (Luis and Scherwinski-Pereira 2014).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar fatores envolvidos com a calogênese visando a embriogênese somática em macaúba, a partir de tecidos foliares de plantas adultas, além de verificar a expressão de genes potencialmente envolvidos no processo, especialmente o *SERK*. O trabalho também objetivou elucidar rotas morfo-anatômicas e bioquímicas das diferentes etapas envolvidas no processo.

## 2 Revisão de literatura

### 2.1 Aspectos botânicos

A *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., também conhecida no Brasil como macaúba, macaúva, bocaiúva, e mbokaja, mbocayá, totaí, cayara, corozo, tamaco, coyol, em outros países (Falasca et al. 2016; Cardoso et al. 2017), é uma palmeira facilmente reconhecida pela grande quantidade de acúleos, e se destaca pela sua alta produção de óleo (de Lima et al. 2018). A denominação “mbocayá” deriva das palavras indígenas no idioma guarani, onde “mboka” (que se quebra estalando, ou “arma”) e “ya” ou “já” (fruto), indicando árvore de frutos que estalam ou frutos usados como arma (Novaes 1952; Tase 2012).

O gênero *Acrocomia* possui divergências quanto a sua caracterização taxonômica, chegando a ser descritas 25 espécies (Bailey 1941) ocorrentes no Brasil. Outros autores descrevem três espécies: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius, *A. hassleri* (Barb. Rodr.) W.J. Hahn e *A. crispa* (Kunt) C.F. Baker ex Becc. Destas, *A. aculeata*, *A. totai* e *A. hassleri* apresentam semelhanças que dificultam a identificação (Henderson et al. 1995; Caldas-Lorenzi 2006; de Lima et al. 2018). Segundo (Henderson et al. 1995), a *A. aculeata* se distingue da *A. hassleri* por apresentar maior altura e diâmetro caulinar e encontra-se amplamente distribuída na América Tropical, enquanto que a *A. hassleri* possui indivíduos de menor altura, ocorrendo apenas na fronteira entre Mato Grosso do Sul e Paraguai. No entanto, não há um consenso entre os autores para o número de espécies dentro deste gênero, sendo necessárias revisões (de Lima et al. 2018)

A macaúba pode atingir alturas entre 10 e 25 metros. O tronco é do tipo estipe ereto, com diâmetro de 20 a 30 centímetros e coberto por bainhas foliares remanescentes. As bainhas foliares apresentam espinhos escuros e afiados em sua superfície, com cerca de 10 centímetros de comprimento, especialmente, os encontrados na região dos nós (Lorenzi 2004; Lorenzi e Negrelle 2006). As folhas são pinadas, com pinas solitárias ou em grupo, usualmente inseridas em diferentes planos na raque (Martins 2012). Geralmente consiste de 20 e 30 folhas no topo, com comprimento aproximado de 2,5 a 3,0 metros, e apresentando espinhos na raque (Lorenzi e Negrelle 2006).

O florescimento da macaúba ocorre praticamente o ano inteiro, com intensidade nos meses de outubro a janeiro. A inflorescência é em espádice, interfoliar, pendente e protegida por uma bráctea, e quando esta alcança a maturidade, abre-se liberando a inflorescência (Henderson et al. 1995; Lorenzi e Negrelle 2006). A inflorescência é amarelada, com a raque sustentando de um a várias tríades (uma flor pistilada e duas estaminadas). As flores femininas se tornam maduras antes das flores masculinas, o que caracteriza o processo deprotoginia. Nas inflorescências, ocorre sobreposição parcial de flores masculinas e femininas maduras que permite a autopolinização quando a polinização cruzada não é possível (Scariot e Lleras 1991). A polinização cruzada é feita especialmente por coleópteros das famílias Curculionidae, Nitidulidae e Scarabaedae (Scariot e Lleras 1991; Henderson et al. 1995).

O fruto da macaúba é do tipo drupa globosa, com diâmetro variando entre 2,5 e 5,0 cm e coloração marrom-amarelada, quando maduro. O epicarpo é liso e rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo, correspondente a polpa, é fibroso, mucilaginoso, de coloração amarelo ou esbranquiçado, comestível e rico em glicerídeos. O endocarpo apresenta-se lignificado, com coloração escura, fortemente aderido ao mesocarpo e pode conter de uma a três sementes. A semente (amêndoa) é constituída, em maior parte, por endosperma comestível, com alto teor de óleos e proteínas, tendo o embrião zigótico aderido ao endosperma em formato de chave (Henderson et al. 1995; Moura 2007; de Lima et al. 2018). A dispersão das sementes de macaúba é feita geralmente por animais que se alimentam de seus frutos (Falasca et al. 2016). Esses animais são principalmente mamíferos silvestres, embora animais domésticos também auxiliem na dispersão (Scariot 1998; Martins 2012). De maneira geral, a propagação comercial das palmeiras é feita sexuadamente, via sementes, e/ou assexuadamente, por divisão de touceiras, como observado em algumas espécies como a pupunheira (*Bactris gasipaes* Khunt.) e o açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) (Lorenzi 2004).

Em macaúba, a propagação é exclusivamente sexuada, pois a espécie não gera touceiras. Por outro lado, a propagação por semente é difícil e laboriosa, sendo a germinabilidade das sementes baixa, lenta e desuniforme. A baixa taxa de germinação das sementes é causada pela dormência física, imposta pela dureza e impermeabilidade do endocarpo à água (Lorenzi e Negrelle 2006; Ribeiro et al. 2011). Mais recentemente, tem-se concordado que *A. aculeata* apresenta dormência associada com dificuldades de

deslocamento do opérculo (Mazzottini-dos-Santos et al. 2018), conhecida como dormência fisiológica pouco profunda (Magalhães et al. 2013).

A macaúba é uma planta incipientemente domesticada (Lopes et al. 2018) e ainda possui sua exploração comercial dependente do desenvolvimento de tecnologias que incluam a seleção de genótipos. Genótipos superiores podem ser selecionados de populações naturais de plantas, porém, apresentam dificuldades de serem propagados vegetativamente por meio de técnicas convencionais, fato que dificulta que ganhos genéticos em ciclos de seleção sejam obtidos, ou então, que genótipos superiores possam ser multiplicados para plantios comerciais (Clement 1999; Lorenzi e Negrelle 2006; Luis e Scherwinski-Pereira, 2014).

A espécie é considerada de alta plasticidade ambiental (Lopes et al. 2018). Ela ocorre em áreas com grande incidência de irradiação solar e é adaptada a solos arenosos com baixo teor de água, mas se desenvolvendo melhor em solos férteis. É encontrada ao longo da América tropical e subtropical, desde o Sul do México e Antilhas até o Sul do Brasil, chegando ao Paraguai e Argentina, estando ausente no Peru e Equador. No Brasil, sua área de ocorrência estende-se desde os Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, passando por Minas Gerais e por todo o Centro-Oeste, Nordeste e Norte do país (Figura 1) (Henderson et al. 1995; Lorenzi 2010; Amaral et al. 2011). Devido a sua alta distribuição é necessário uma revisão taxonômica do gênero (Scariot e Lleras 1991).

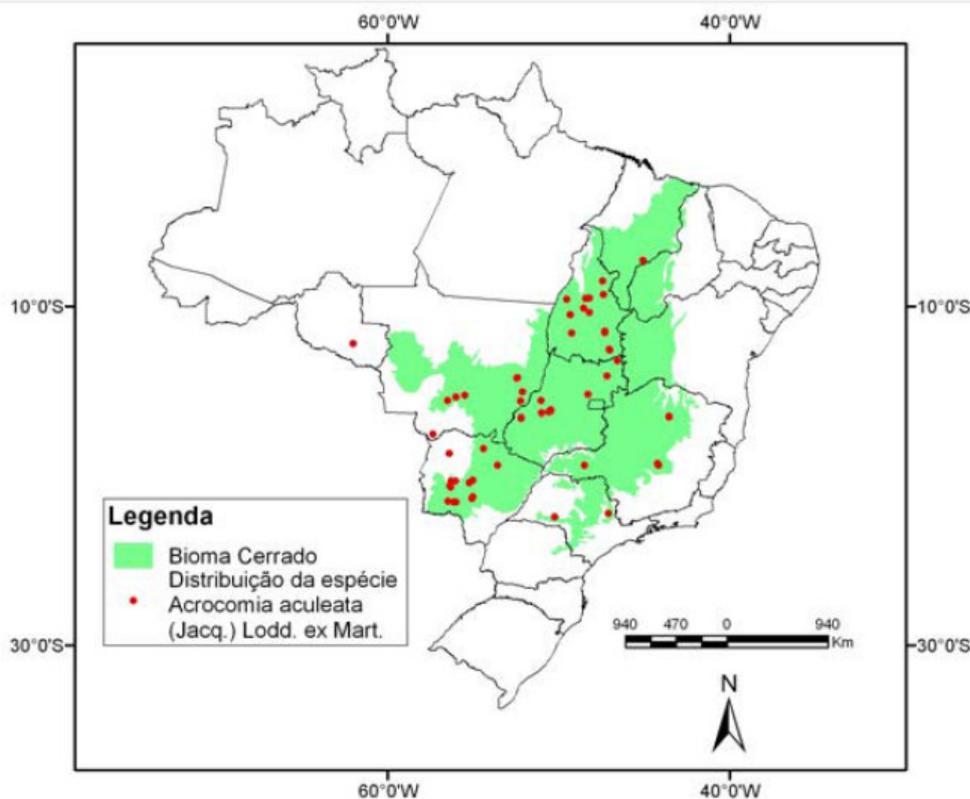


Figura 1. Regiões de ocorrência da *Acrocomia aculeata* no Brasil. Fonte: Ratter et al. 2003.

## 2.2 Importância da macaúba

A macaúba tem a segunda maior produtividade em óleo entre as plantas oleaginosas (até 6.000 kg/ha) e, dada a qualidade do seu óleo, possui alto potencial para a produção de biodiesel (Cardoso et al. 2017). A espécie também apresenta alta plasticidade ambiental, podendo ser cultivada em regiões tropicais secas, e teoricamente, se mantém produtiva por mais de 100 anos (Lorenzi 1992; Teixeira 2005). Salienta-se que diferentemente do dendê, cujo óleo abastece a indústria de alimentos, o óleo de macaúba tem como principal destinação a produção de biocombustível (biodiesel ou bioquerosene), ou seja, não compete com a indústria alimentícia (Cardoso et al. 2017).

As folhas, frutos e sementes da macaúba são tradicionalmente utilizados para diversos fins econômicos. Dentre estes, destaca-se o uso da estipe para produção de mourões e estacas, do estipe para obtenção do palmito, das folhas para forragem animal, cobertura de casas e extração de fibras usadas na fabricação de linha de pesca e redes, dos frutos como alimento *in natura*, obtenção da polpa com a qual são preparados

licores e doces, além da extração do óleo que é utilizado na culinária e como combustível, da semente como substituto da brita no concreto e confecção de botões, além da amêndoa como alimento e, também, extração do óleo (Caldas-Lorenzi 2006; Lorenzi e Negrelle 2006).

Apesar dos diversos usos, são os frutos da macaúba que representam a principal fonte de renda relativa ao uso comercial da espécie. Atualmente, o aproveitamento do óleo extraído dos frutos da macaúba vem sendo bastante visado, já que este óleo pode ser aproveitado na produção de biodiesel. O óleo de macaúba pode ser extraído da polpa e da amêndoa, e existem diferenças quanto à composição e as utilidades dos dois tipos de óleo (Ciconini 2012). A diferença entre a composição dos óleos da amêndoa e da polpa da macaúba consiste no fato de que a polpa é mais rica em óleos de cadeia longa, predominando o ácido oléico. A concentração de óleo na polpa pode atingir valores superiores a 70%, o que confere a espécie o título de “high oleic”, que são produtos de alto valor e de grande demanda por parte das indústrias alimentícia e, sobretudo, energética, em função da maior estabilidade à oxidação e operabilidade a baixas temperaturas (biodiesel). Por outro lado, a amêndoa é rica em ácido láurico, justificando seu uso como fonte importante para a indústria de cosméticos (Amaral et al. 2011; Ciconini 2012; Matsimbe 2012).

### **2.3 Cultura de tecidos de plantas**

A cultura de tecidos de plantas é uma das ferramentas da biotecnologia que envolve diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de plantas, ou partes destas (célula ou qualquer fragmento de tecido ou órgão vivo), sob condições assépticas, em um meio nutritivo, e condições controladas de temperatura e luminosidade (Torres et al. 2000; Souza e Junghans 2006)

As técnicas da cultura de tecidos de plantas têm sido empregadas de diversas maneiras, tendo em vista a propagação clonal de mudas em larga escala (micropropagação), produção de plantas transgênicas (melhoramento), conservação de recursos genéticos de plantas (conservação *in vitro*), e regeneração de plantas livres de vírus e patógenos (limpeza clonal) (Torres et al. 1998; Cid e Teixeira 2010). Entre as técnicas citadas, a micropropagação parece ser a de maior utilidade prática, por oferecer a oportunidade de se produzir, em um curto espaço de tempo e espaço físico limitado,

uma grande quantidade de propágulos e mudas livres de doenças, geralmente de genótipos superiores (Lakshmanan 2006).

As palmeiras são plantas que apresentam dificuldades de serem multiplicadas vegetativamente. Dessa forma, a produção de mudas destas espécies tem a propagação *in vitro* como uma ferramenta de grande importância (Hartmann et al. 2002; Lédo et al. 2007; Ribeiro et al. 2011; Rubio Neto et al. 2014). Os primeiros estudos *in vitro* com palmeiras, utilizando-se de *Cocos nucifera*, foram realizados há mais de cinco décadas (Cutter e Wilson 1954).

A utilização de embriões zigóticos na cultura de tecidos tem proporcionado bons resultados na propagação de palmeiras, sendo importante por aumentar as taxas de germinação, uniformidade das plantas e conversão de plântulas viáveis (Soares et al. 2011). Trabalhos com palmeiras utilizando-se dessa técnica têm mostrado resultados satisfatórios (Scherwinski-Pereira et al. 2006; Lédo et al. 2007; Steinmacher et al. 2007a; Soares et al. 2011; Melo 2012). Entretanto, a utilização de embriões zigóticos não gera plantas com o mesmo genótipo da planta matriz, sendo necessário o emprego de outros tecidos somáticos, como foliares e florais, para a propagação clonal de indivíduos que apresentem alguma característica agrônômica desejável.

### 2.3.1 Embriogênese somática

Dentre as técnicas de cultura de tecidos de plantas, a embriogênese somática tem se mostrado importante para a propagação clonal, por permitir a produção de grande número de plantas, a partir da germinação de embriões somáticos *in vitro*, ou para realizar estudos básicos de diferenciação celular, expressão gênica, genética molecular e muitos outros. (Litz and Gray 1995; Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo 2016). A embriogênese somática é uma via morfogênica para regeneração *in vitro* de plantas, sendo definida como o processo pelo qual células ou tecidos somáticos, sob condições experimentais favoráveis, são induzidos a formar embriões somáticos bipolares, semelhantes aos embriões zigóticos, mas que não são produtos da fusão de gametas (Williams e Maheswaran 1986). Durante o processo da embriogênese somática o explante pode seguir duas rotas diferenciadas de desenvolvimento: a rota direta ou indireta. Na embriogênese somática direta, os embriões se desenvolvem diretamente do tecido do explante. Alternativamente, na embriogênese somática indireta ocorre um passo intermediário à formação dos embriões que é a de formação de calos. O calo é

geralmente considerado uma massa desorganizada de células desdiferenciadas em divisão exibindo diferentes graus de diferenciação, que são capazes de mudar o destino celular em resposta a sinais hormonais (Williams e Maheswaran 1986; Guerra et al. 1999; Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo 2016).

Durante a embriogênese somática, tanto na rota direta quanto na indireta, o embrião somático se desenvolve seguindo as mesmas seqüências do desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estágios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar em espécies dicotiledôneas. As células embriogênicas que dão origem aos embriões apresentam características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa: tamanho reduzido, conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos e presença de grãos de amido (Guerra et al. 1999).

O processo de embriogênese somática indireta é dividido em várias etapas, sendo elas: iniciação do cultivo *in vitro* de tecido primário (explante) em meio geralmente contendo reguladores de crescimento para a indução de calos, principalmente, uma auxina; proliferação ou multiplicação de cultivos embriogênicos, igualmente suplementado com reguladores de crescimento; pré-amadurecimento dos embriões somáticos, realizada em meio sem reguladores; amadurecimento dos embriões somáticos e desenvolvimento de plântulas (von Arnold et al. 2002).

O processo indução de calos a partir de células somáticas é um exemplo da alta plasticidade que as células vegetais exibem (Fehér 2015). Durante a fase inicial do cultivo *in vitro* e indução da embriogênese somática os explantes são expostos a um estímulo físico, químico ou biológico onde são desencadeados processos morfogênicos que permitem a formação de calos. Esta etapa é uma das mais críticas para o estabelecimento das culturas embriogênicas *in vitro* (Guerra e Nodari 2006). Diversos fatores influenciam na indução da embriogênese somática, como por exemplo, a fonte de explantes utilizados (tecidos embrionários ou juvenis) e, geralmente, as altas concentrações das auxinas a que são submetidos (Guerra et al. 1999; Viñas e Jiménez 2011).

Os calos foram caracterizados inicialmente pela biologia vegetal como o crescimento maciço e acúmulo de células associados a ferimentos. No entanto, a mesma palavra é usada mais amplamente na cultura de tecidos vegetais, se referindo a massas celulares desorganizadas e que apresentam células com vários graus de diferenciação

(Ikeuchi et al. 2013; Fehér 2015). Os calos podem ser classificados em diversos tipos, aqueles sem qualquer regeneração de órgão óbvia são tipicamente chamados calos friáveis ou compactos, enquanto aqueles apresentam embriões ou características celulares já relacionadas a formação de embriões são chamados calos embriogênicos (Ikeuchi et al. 2013).

Os calos são classificados também dependendo de suas características celulares. Os calos embriogênicos apresentam certas características celulares como: um núcleo volumoso, centralmente posicionado, com um único nucléolo grande e uma alta relação núcleo: citoplasma, citoplasma denso com reservas de amido localizadas ao redor do núcleo. A parede contém poucos ou não possui plasmodesmos e um depósito de calosidades é encontrado com frequência, o que contribui para espessamento da parede (Ling You et al. 2006; Sané et al. 2006; Verdeil et al. 2007).

Os calos podem ser formados a partir de uma única célula diferenciada após essa ser dediferenciada ou ainda a partir de da multiplicação desordenada de células do tecido vegetal (Fehér 2015). Estas células dediferenciadas, chamadas também de *stem cells* são classificadas em diferentes níveis: células totipotentes, aquelas capazes de regenerar todo o corpo da planta, pluripotentes, capaz de dar origem à maioria dos vários tipos de células, células multipotentes, capacidade de se desenvolver em mais de um tipo de célula do corpo e/ou células unipotentes, aquelas capazes de se desenvolver em apenas um tipo de célula (Fehér et al. 2003; Verdeil et al. 2007).

Já a multiplicação de culturas embriogênicas consiste geralmente da redução nos níveis dos reguladores de crescimento do meio de cultura. Essa redução permite ciclos repetitivos de divisão celular e o controle dos processos de diferenciação, promovendo a proliferação das massas de calos formadas anteriormente (Guerra et al. 1999).

A etapa de desenvolvimento ou diferenciação de embriões somáticos consiste no cultivo de massas pró-embriogênicas, em meios de cultura específicos, culminando com o aparecimento de estruturas embriogênicas em estágios característicos de desenvolvimento, como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Viñas e Jiménez 2011). Ressalta-se que em monocotiledôneas, como as palmeiras, o estágio cordiforme não é observado, já que exibem somente um cotilédone (Kaplan e Cooke 1997). Uma vez diferenciados, os embriões somáticos passam então por um processo de amadurecimento, onde são estimulados a acumular reservas para a próxima etapa de

desenvolvimento, que é a conversão destes em plantas completas, já na fase de germinação (Viñas e Jiménez 2011).

Durante o processo de embriogênese somática, a cultura em suspensão tem se mostrado uma técnica de grande importância para o desenvolvimento do material *in vitro*, por se tratar de uma ferramenta útil para a micropropagação. O cultivo em suspensão consiste na multiplicação e manutenção de células e/ou agregados, em forma de suspensão em meio líquido. Esta técnica permite a obtenção de grandes quantidades de mudas com baixo custo de produção (Touchet et al. 1991; Sané et al. 2006; Palanyandy et al. 2013) Ele tem sido aplicado com sucesso em muitas espécies, tais como o *Triticum aestivum* (Vasil et al. 1990), *Musa AAA cv Grand naine* (Côte et al. 1996), *Coffea arabica* (Etienne e Bertrand 2001), *Phoenix dactylifera* (Fki et al. 2003) e *E. guineensis* (Touchet et al. 1991; Kramut e S.Te-chato 2010). Além disso, suspensões embriogênicas também têm sido consideradas como um material promissor no melhoramento genético e conservação de recursos genéticos (Rival et al. 2013).

Na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, o padrão de desenvolvimento *in vitro* é determinado principalmente pela utilização de reguladores de crescimento (Kerbaui 2004; Janocha e Lohmann 2018). O uso de auxinas e a indução de calos são pré-requisitos fundamentais para a obtenção de célula com competência embriogênicas (Viñas e Jiménez 2011). Dentre as auxinas utilizadas para a indução da embriogênese somática, destacam-se o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4 – D) e o ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram), geralmente com o uso de altas concentrações (Fehér 2008). A influência tanto do 2,4-D, quanto do Picloram, na indução da embriogênese somática é descrita por vários autores (Dudits et al. 1991; Titon et al. 2007; Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo 2016).

A propagação *in vitro* a partir da embriogênese somática tem se mostrado útil para aquelas espécies que apresentam dificuldades de se propagar pela via assexual. Ela proporciona vantagens da alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação, permitindo estabelecer o período desejado para as obtenções de material propagativo e obter planta geneticamente igual à planta-mãe (Zimmerman 1993; Ree and Guerra 2015).

Nesse sentido, a embriogênese somática tem sido foco de estudo por vários pesquisadores. Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras, como a *P. dactylifera* (Sharma et al. 1984; Fki et al. 2003; Sané

et al. 2006; Othmani et al. 2009), o *E. guineensis* (Ahee et al. 1981; Teixeira et al. 1993; Scherwinski-Pereira et al. 2010; de Carvalho Silva et al. 2012; Balzon et al. 2013), *A. aculeata* (Moura et al. 2009), *E. oleracea* (Scherwinski-Pereira et al. 2012) e *B. gasipaes* (Steinmacher et al. 2007b; Heringer et al. 2014).

A exploração comercial da macaúba exige a utilização de tecnologias que possam propagar clones elite, pois como o programa de melhoramento genético para a espécie é lento, até que se obtenham materiais superiores, a seleções de genótipos poderia ser realizada a partir de populações naturais. E, por ser uma espécie com dificuldades de ser propagada vegetativamente por técnicas convencionais, a embriogênese somática se apresenta como ferramenta que permite na produção de mudas uniformes e em larga escala.

Dessa forma, experimentos visando a embriogênese somática em macaúba se iniciaram com os trabalhos de Teixeira et al. (1986), Moura et al. (2009) e mais recentemente, Luis e Scherwinski-Pereira (2014) e (Granja et al. 2018), utilizando embriões zigóticos como fonte de explante e Padilha et al. (2015), e Meira et al. (2019) utilizando segmentos foliares como explantes. Estes autores obtiveram os primeiros resultados quanto à embriogênese somática da macaúba, embora estes resultados demonstrem certas dificuldades nas fases de maturação e desenvolvimento dos embriões somáticos.

Assim, a embriogênese somática em macaúba, apesar de sua importância, ainda tem sido incipiente quanto aos resultados práticos e, principalmente, quando se objetiva regenerar plantas a partir de diferentes tecidos somáticos, muito embora já se conheçam algumas de suas repostas *in vitro*. Luis (2013) e Meira et al. (2019) apresentaram os primeiros resultados quanto à embriogênese somática a partir de tecido foliar de plantas adultas, sugerindo fatores envolvidos na indução de calos. Da mesma forma, Luis (2013) e Padilha (2013), trabalhando com TCL ("*Thin Cell Layer*") de mudas de macaúba, obtiveram embriões somáticos, muito embora ainda apresentando deficiências nas fases de maturação e o desenvolvimento de tais embriões somáticos.

Durante seus experimentos, Luis (2013) e Meira et al. (2019) observaram resultados significativos quanto a utilização da auxina Picloram, demonstrando que a utilização do regulador na concentração de 450  $\mu\text{M}$  associado ao meio Y3 teve melhor efeito na formação de calos em explantes foliares de plantas adultas.

## 2.4 Estudos anatômicos e histológicos

A análise anatômica e histológica envolve o emprego de variadas técnicas que permitem detalhar os eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. Desta forma, é possível, por exemplo, conhecer e acompanhar o desenvolvimento do material vegetal durante a indução da embriogênese somática. Além disso, permite melhor entendimento dos mecanismos celulares básicos envolvidos na aquisição de competência e histodiferenciação de embriões somáticos. Nesse sentido, alterações histológicas associadas com a posição e a atividade das células competentes têm sido bastante estudadas durante a embriogênese somática (Rodrigues et al. 2004; Gueye et al. 2009b; Rocha et al. 2016a).

Os métodos histoquímicos permitem o monitoramento da mobilização e síntese de compostos de reserva durante o desenvolvimento embriogênico. Desta forma, a dinâmica e o destino das células comprometidas com a embriogênese somática, a formação de um calo embriogênico e a subsequente diferenciação de embriões somáticos podem ser analisadas ao longo do tempo associando as alterações citológicas observadas com os padrões da aquisição de competências para a formação de embriões somáticos (Verdeil et al. 2001; Sané et al. 2006; Rocha et al. 2016a).

Uma série de estudos descritivos do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas usando microscopia de luz e eletrônica forneceu uma caracterização detalhada de eventos histológicos que determinaram a progressão de células somáticas para a formação de embriões se mostrado útil para o entendimento da embriogênese em várias espécies vegetais (Rocha et al. 2016b). Em palmeiras, há relatos para diversas espécies, como *C. nucifera* (Chan et al. 1998), *E. edulis* (Guerra e Handro 1998), *P. dactylifera* (Sané et al. 2006; Gueye et al. 2009a), *B. gasipaes* (Steinmacher et al. 2007b) e *E. guineensis* (Schwendiman 1988; de Carvalho Silva et al. 2012).

Estudos histológicos realizados por Guerra e Handro (1998), durante o cultivo *in vitro* de culturas embriogênicas oriundas de embriões zigóticos de *E. edulis*, observaram evidências da origem das massas meristemáticas a partir de tecidos da subepiderme. Além disso, esses autores descreveram os diferentes estágios de maturação dos proembriões e os embriões obtidos durante o processo.

Sané et al. (2006) e Gueye et al. (2009b) descrevem em seus experimentos com *P. dactylifera* que o início da embriogênese somática está relacionada as divisões

celulares que ocorrem na área do parênquima perivascular (próxima a região do feixe vascular) em explantes foliares, nas primeiras semanas de cultivo *in vitro*. Além disso, Sané et al. (2006) observaram o surgimento de calos do tipo nodular, com características embriogênicas, surgindo do calo primário na região perivascular.

O estudo anatômico relacionado com a embriogênese somática em macaúba vem sendo relatados por diversos pesquisadores (Bandeira 2008; Moura et al. 2009; Luis 2013; Padilha 2013; Padilha et al. 2015; Meira et al. 2019). No entanto, os estudos ainda são incipientes quando se trata da formação de embriões somáticos utilizando-se folhas de plantas adultas como explantes.

Bandeira (2008) observou em macaúba, por meio da análise anatômica de embriões zigóticos durante a indução da embriogênese somática, evidências de que proembriões somáticos surgiram a partir de regiões meristemáticas formadas de estruturas nodulares. Moura et al. (2009) constataram que a embriogênese somática obtida, em meio de indução, a partir de embriões zigóticos, originava-se de células do procâmbio ou de células perivasculares, que proliferavam produzindo massas meristemáticas.

Padilha (2013), utilizando-se da indução da embriogênese somática em macaúba por meio da técnica do TCL em folhas de plântulas produzidas *in vitro*, observou que os calos se originam do parênquima perivascular e os embriões somáticos de células da periferia do calo. Já Luis (2013) e Meira et al. (2019) trabalhando com folhas imaturas de plantas adultas observaram que o início da formação de calos ocorreu por meio de divisões celulares das células dos feixes vasculares das folhas, possivelmente, de células procambiais, além das características relacionadas à estrutura dos diferentes tipos de calos formados. Além disso, Meira et al. (2019) demonstrou pela análise histoquímica o acúmulo de amido durante o processo de embriogênese somática foi concentrada perto dos centros em intensa divisão celular, próxima as regiões de formação de calo. Além disso, descreveu a ontogênese de calos e embriões somáticos, definindo marcadores morfoanatômicos de calos embriogênicos (calos nodulares amarelos com predomínio de células meristemáticas).

## 2.5 Bioquímica Vegetal

A análise bioquímica envolve o emprego de variadas técnicas que permitem avaliar os eventos que ocorrem durante o cultivo *in vitro* de espécies vegetais. Ela permite realizar uma varredura de grandes populações de moléculas que afetam um determinado processo biológico (Alberts et al. 2007).

Assim, uma grande quantidade de informações é obtida a partir de estudos bioquímicos conduzidos durante embriogênese somática. Estes estudos contribuem para a otimização da técnica, incluindo informações associadas à indução de competência embriogênica e compreensão da totipotência em plantas superiores. Além disso, o entendimento da mobilização de reservas nas fases de maturação e regeneração de embriões somáticos, e formação de plantas anormais auxiliam no estabelecimento do protocolo para a embriogênese somática (Pescador et al. 2008; Wu et al. 2009; Normah et al. 2013).

Compostos como carboidratos, lipídios, aminoácidos e proteínas estão envolvidos nos processos de desenvolvimento vegetal (Guerra et al. 1999; Nascimento-Gavioli et al. 2017a). Nieves et al. (2003) e Mahmud et al. (2015) compararam calos embriogênicos e não embriogênicos de cana-de-açúcar para determinar a possível relação entre certos metabólitos e a embriogênese somática. Diferenças claras entre dois tipos de calos foram relatadas com base em sua caracterização bioquímica. Com base nesses relatos, as análises desses compostos podem trazer respostas que contribuem para determinar importantes biomarcadores de metabólitos, diferenciando os níveis ou estágios da embriogênese somática (Maadon et al. 2016).

Carboidratos são as principais fontes de energia para as células e fornecedores de carbono estruturais para processos biossintéticos. Além disso, também atuam como agentes osmóticos e contribuem para a manutenção da integridade da membrana plasmática (Pareddy e Greyson 1989; Tremblay e Tremblay 1991; Thelander et al. 2018). Durante a embriogênese somática, eles estão relacionados à diferenciação de calos embriogênicos e não embriogênicos, além do desenvolvimento da regeneração e maturação de embriões somáticos (Martin et al. 2000; Gomes et al. 2017).

Os aminoácidos constituem outro importante grupo de compostos. Além de serem os componentes básicos de proteínas, também são precursores de vários compostos bioquímicos, como os ácidos nucleicos e as substâncias nitrogenadas do metabolismo secundário, como os fitorreguladores (Ortiz-Lopez et al. 2000). Dessa

forma, a síntese de aminoácidos é responsável direta e indiretamente por praticamente todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta e são analisados como possíveis marcadores do comportamento celular (Niemenak et al. 2008; Nascimento-Gavioli et al. 2017b).

Durante a embriogênese somática, as quantidades de aminoácidos aumentam e diminuem rapidamente durante as diferentes etapas do desenvolvimento, demonstrando assim, a ligação desses compostos vegetais com esta importante rota de desenvolvimento, destacando-se os aminoácidos prolina, serina e tirosina (Sen et al. 2002). Dessa forma, os meios de cultura são frequentemente suplementados com aminoácidos, com o intuito de favorecer o desenvolvimento de culturas embriogênicas (Scherwinski-Pereira et al. 2010; de Carvalho Silva et al. 2012).

As proteínas também constituem um importante grupo de compostos vegetais. Estes são o principal componente macromolecular das células, formadas por seqüências específicas de aminoácidos, ou seja, cada proteína é formada por uma seqüência única, que determina sua função dentro da célula vegetal. Dentre as várias funções desempenhadas pelas proteínas, destacam-se: o transporte de substâncias para dentro e para fora das células, a resistência e a adaptação da planta a estresses abióticos, o acúmulo de compostos de reserva e a manutenção do crescimento das células, tecidos e órgãos vegetais (Alberts et al. 2007; Sghaier-Hammami et al. 2009b).

No desenvolvimento embriogênico, estudos vêm demonstrando a ocorrência de um aumento no conteúdo das proteínas totais. É percebido não só a síntese de proteínas de reserva, mas também do acúmulo de proteínas relacionadas ao estresse e de outras classes de proteínas. Além disso, também sintetizadas durante o desenvolvimento do embrião, como aquelas relacionadas à respiração (glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa), à biossíntese de carboidratos e ao metabolismo de aminoácidos (Aberlenc-Bertossi et al. 2008; Cangahuala-Inocente et al. 2009; Sghaier-Hammami et al. 2009a)

## **2.6 Avaliação da expressão de genes por RT-qPCR**

A reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é uma técnica padrão na maioria dos laboratórios. É uma técnica onde a coleta de dados ocorre ao longo do processo de uma PCR comum, baseada no processo de *transcriptase reversa* (RT), combinando amplificação e detecção em um único passo. Isso é

alcançado usando uma variedade de diferentes compostos fluorescentes que correlacionam com o produto de PCR gerando uma intensidade de fluorescência (Wong e Medrano 2005). Dessa forma, a RT-qPCR é uma grande ferramenta para quantificação dos níveis de expressão de genes e tem possibilitado verificar esta expressão entre diferentes amostras biológicas (Taylor et al. 2010).

No entanto, fatores como a escolha de genes referência apropriados e tratamento da análise dos dados em softwares é de fundamental importância para se obter resultados precisos. Os genes de referência são aqueles que apresentam uma expressão uniforme na maioria dos tecidos, apesar deles poderem variar em diferentes fases de desenvolvimento, tratamentos biológicos e condições ambientais (Expósito-Rodríguez et al. 2008), sendo assim necessário análises de estabilidade destes. A estabilidade dos genes de referência é determinada partindo do princípio que dois genes normalizadores ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras, independentemente das condições ambientais e experimentais. Assim, um valor de estabilidade do gene (M) baixo indica expressão mais estável (Kozera e Rapacz 2013; Santos et al. 2018).

A análise dos dados de qPCR é uma parte crucial de todo o experimento, o que levou ao desenvolvimento de uma infinidade de métodos. As ferramentas lançadas cobrem partes específicas do fluxo de trabalho ou fornecem soluções completas de análise (Pabinger et al. 2014). Dentre estes softwares utilizados para a identificação e a classificação dos genes de referência mais adequados destaca-se o geNorm. Este programa determina os genes de referência mais estáveis além de determinar também quantos genes de referência são necessários para que a normalização seja segura (Vandesompele et al. 2002). Outra ferramenta usada é o Software de expressão relativa REST (REST ©), baseado no modelo Pfaffl (2001), combina quantificação e normalização de genes em um único cálculo. Este modelo incorpora as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referência (normalização) para corrigir as diferenças entre os dois ensaios.

## **2.7 Hibridização *in situ***

A hibridização *in situ* é uma técnica citoquímica para localização de DNA específico ou seqüências de RNA dentro de um organismo. Ao contrário das transferências *Northern* e *Southern blot*, em que os ácidos nucléicos são primeiro isolados e depois separados por eletroforese antes da sondagem, na hibridação *in situ*, as

seqüências alvo são deixadas no interior do tecido. Assim sendo, a hibridação *in situ* depende do pareamento entre dois polinucleotídeos com seqüências complementares (comumente denominado de hibridação) (Wilkinson 1992; McFadden 1995).

A hibridização *in situ* é realizada pelo preparo de uma sonda de um gene específico adequadamente concebido. Esta sonda ao ser aplicada para o tecido previamente preparado e submetido à hibridização com as seqüências alvo complementares. Dessa forma, torna-se visível com alguma forma de marcador, sendo assim possível determinar sua localização (Tsai e Harding 2013).

Aplicada corretamente, a técnica de hibridização *in situ* fornece informações precisas sobre a localização de uma seqüência específica de DNA ou RNA. É uma ferramenta extremamente poderosa para estudar a expressão específica no tecido (McFadden 1995).

Na cultura de tecidos vem sendo relatados diversos trabalhos da utilização da técnica para verificar expressão de genes durante o processo de desenvolvimento *in vitro*. Sobretudo, utilizando o gene SERK, por ser este relacionado com aquisição da competência embriogênica. Dentre estes trabalhos estão: SERK em *Daucus carota* (Schmidt et al. 1997), SERK em *Helianthus annuus* (Thomas et al. 2004), SERK em *C. nucifera* (Pérez-Núñez et al. 2009), CDKA em *Cocos nucifera* (Montero-Cortés et al. 2010) e SERK em *Ananas comosus* (Ma et al. 2012). Em *Arabidopsis* a expressão foi detectada em quatro locais: em calos embriogênicos, onde os embriões foram desenvolvidos, nas partes basais dos embriões, nas camadas externas dos cotilédones e nos tecidos provasculares dos embriões somáticos em desenvolvimento (Hecht et al. 2001).

Dentre as palmeiras, Pérez-Nuñez et al. (2009) ao analisar a expressão do gene SERK em *C. nucifera* pela técnica de hibridização *in situ*, constataram que a sua expressão pode ser detectada em tecidos embriogênicos antes que o desenvolvimento embrionário possa ser observado. Em contraste aos tecidos não embriogênicos, onde não foi detectado ou apresentou níveis mais baixos. Estes dados sugerem que a expressão do gene SERK está associada à indução de embriogênese somática e que pode ser um potencial marcador de células competentes para formar embriões somáticos em tecidos cultivados *in vitro*.

## 2.8 Gene *SERK*

As plantas possuem um grande número de receptores de sinais em sua superfície celular (*Receptor-Like Kinases*, RLKs) e proteínas semelhantes a receptores (*Receptor-Like Proteins*, RLPs), muitos dos quais estão implicados na detecção de sinais extrínsecos e intrínsecos, e governam diversas respostas celulares. Dentre essas vias de sinalização, existe um pequeno grupo de RLKs conhecido como *Somatic Embryogenesis Receptors Kinases* (*SERK*). Como co-receptores comuns em diversos receptores de sinalização, os SERKs exibem plasticidade funcional e ainda mantêm um alto grau de especificidade de sinalização (Ma et al. 2016).

Os SERKs são receptores de membrana que detectam um conjunto diverso de ligantes extracelulares e que retransmitem esses sinais para o citosol para desencadear respostas celulares específicas. Estes estão envolvidos em diversos aspectos do desenvolvimento das plantas, como o crescimento dependente de brassinoesteróides e fitossulfoquinas, diferenciação de células, a imunidade, a esporogênese masculina e o padrão estomático. Os SERKs formam uma parte integral do sistema imunológico da planta e regulam a morte celular (Brandt e Hothorn 2016; Ma et al. 2016).

A embriogênese somática envolve diferentes eventos moleculares, incluindo a expressão de vários genes diferentes e várias rotas de sinais de transdução. Dentre estes genes, destaca-se o gene *SERK*, que foi originalmente identificado como um marcador da competência embrionária na cultura de células de cenoura (Schmidt et al. 1997),

O gene *SERK* é um marcador potencialmente confiável da competência embriogênica, uma vez que vários homólogos são encontrados em tecidos embriogênicos de várias espécies vegetais (Toorn et al. 2015; Kumar e Van Staden 2019). Dentre estas espécies vegetais, já foi descrito para algumas palmeiras como *C. nucifera* (Pérez-Núñez et al. 2009), *P. dactilifera* (Rekik et al. 2013) e *E. guineensis* (Angelo et al. 2013).

### 3 Referências Bibliográficas

- Aan Den Toorn M, Albrecht C, De Vries S (2015) On the origin of SERKs: Bioinformatics analysis of the somatic embryogenesis receptor kinases. *Mol Plant* 8:762–782. doi: 10.1016/j.molp.2015.03.015
- Aberlenc-Bertossi F, Chabrillange N, Duval Y, Tregear J (2008) Contrasting globulin and cysteine proteinase gene expression patterns reveal fundamental developmental differences between zygotic and somatic embryos of oil palm. *Tree Physiol* 28:1157–1167. doi: 10.1093/treephys/28.8.1157
- Ahee J, Arthuis P, Cas G, et al (1981) *In vitro* vegetative propagation of the oil palm by somatic embryogenesis. *Oléagineux* 36:113–116.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al (2007) *Molecular Biology of the Cell*, 5th edn.
- Amaral F, Broetto F, Batistella CB, Jorge SMA (2011) Extração e Caracterização Qualitativa do óleo da polpa e amendoas de frutos de Macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu. *Energ na Agric* 26:12–20. doi: 10.17224/EnergAgric.2011v26n1p12-20
- Angelo PC da S, Steinmacher DA, Lopes R, et al (2013) Histological analysis and transcription profiles on somatic embryogenesis in interspecific hybrids of *Elaeis guineensis* × *E. oleifera*. *Agric Sci* 4:1–11. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/as.2013.411A001>
- Arkcoll D (1990) New Crops from Brazil. *Adv new Crop* 367–371.
- Bailey LH (1941) *Acrocomia*: Preliminary Paper.
- Balzon TA, Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2013) New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 49:41–50. doi: 10.1007/s11627-012-9479-3
- Bandeira FS (2008) cultivo *in vitro* e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges). Universidade Federal de Viçosa
- Brandt B, Hothorn M (2016) SERK co-receptor kinases. *Curr Biol* 26:R225–R226. doi:

10.1016/j.cub.2015.12.014

Caldas-Lorenzi GMA (2006) *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Universidade Federal do Paraná

Cangahuala-Inocente GC, Silveira V, Caprestano CA, et al (2009) Dynamics of biochemical and morphophysiological changes during zygotic embryogenesis in *Acca sellowiana* (Berg.) Burr. *Plant Growth Regul* 59:103–115. doi: 10.1007/s10725-009-9393-9

Cardoso A, Laviola BG, Santos GS, et al (2017) Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. *Ind Crops Prod* 107:573–580. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.04.023

Cargnin A, Junqueira NTV, Fogaça CM (2008) Potencial da Macaubeira como Fonte de Matéria-prima para Produção de Biodiesel.

Chan JL, Saénz L, Talavera C, et al (1998) Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 17:515–521. doi: 10.1007/s002990050434

Ciconini G (2012) Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul. Universidade Católica Dom Bosco

Cid LPB, Teixeira JB (2010) Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *Cultiv Vitri plantas Brasília Embrapa Informação Tecnológica* 15–49.

Clement CR (1999) 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. I. The Relation Between Domestication and Human Population Decline. *Econ Bot* 53:188–202. doi: 10.1007/bf02866498

Côte F-X, Domergue R, Monmarson S, et al (1996) Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa AAA* cv. Grand nain. *Physiol Plant* 97:285–290.

Cutter Jr VM, Wilson KS (1954) Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development *in vitro* of embryos of *Cocos nucifera*. *Bot Gaz* 115:234–240.

- de Carvalho Silva R, Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2012) Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 111:59–67. doi: 10.1007/s11240-012-0170-5
- de Lima NE, Carvalho AA, Meerow AW, Manfrin MH (2018) A review of the palm genus *Acrocomia*: Neotropical green gold. *Org Divers Evol* 1–11. doi: 10.1007/s13127-018-0362-x
- Dias LA dos S (2011) Biofuel plant species and the contribution of genetic improvement. *Crop Breed Appl Biotechnol* 11:16–26. doi: 10.1590/S1984-70332011000500004
- Dudits DD, Bogre L, Gyorgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci* 484:475–484.
- Etienne H, Bertrand B (2001) Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. *Tree Physiol* 21:1031–1038.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8:1–12. doi: 10.1186/1471-2229-8-131
- Falasca S, Ulberich A, Pitta-Alvarez S (2016) Development of agroclimatic zoning model to delimit the potential growing areas for macaw palm (*Acrocomia aculeata*). *Theor Appl Climatol* 1–13. doi: 10.1007/s00704-016-1850-6
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1849:385–402. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.07.005
- Fehér A (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. *Acta Biol Szeged* 52:53–56.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:201–228. doi:

10.1023/A:1024033216561

- Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep* 21:517–24. doi: 10.1007/s00299-002-0558-5
- Gomes HT, Bartos PMC, Scherwinski-Pereira JE, et al (2017) Dynamics of morphological and anatomical changes in leaf tissues of an interspecific hybrid of oil palm during acquisition and development of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 0:0. doi: 10.1007/s11240-017-1282-8
- Granja MMC, Motoike SY, Andrade APS, et al (2018) 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. *Ind Crops Prod* 117:1–12. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.074
- Guerra MP, Handro W (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* mart. (Palmae): Control and structural features. *J Plant Res* 111:65–71. doi: 10.1007/BF02507151
- Guerra MP, Nodari R (2006) Apostila de biotecnologia. 41.
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. *Cult Tecidos e Transform Genética Plantas* 533–568.
- Gueye B, Morcillo F, Collin M, et al (2009a) Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 99:35–45. doi: 10.1007/s11240-009-9573-3
- Gueye B, Saïd-Ahmed H, Morcillo F, et al (2009b) Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: Are there similarities between the two auxin-induced pathways? *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98:47–58. doi: 10.1007/s11240-009-9537-7
- Hartmann HT, Kester DE, Davies Jr FT, Geneve RL (2002) Vegetative propagation. *Plant Propag Princ Pract* 279–332.

- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog M V, et al (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* 127:803–16. doi: 10.1104/pp.010324.In
- Henderson A, Galeano G, Bernal Rodrigo (1995) *Field Guide to the Palms of América*.
- Heringer AS, Steinmacher DA, Fraga HPFF, et al (2014) Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA®temporary immersion system. *Sci Hortic (Amsterdam)* 179:284–292. doi: 10.1016/j.scienta.2014.09.041
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013) Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *Plant Cell* 25:3159–3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053
- Janocha D, Lohmann JU (2018) From signals to stem cells and back again. *Curr Opin Plant Biol* 45:136–142. doi: 10.1016/j.pbi.2018.06.005
- Kaplan DR, Cooke TJ (1997) Fundamental Concepts in the Embryogenesis of Dicotyledons: A Morphological Interpretation of Embryo Mutants. *Plant Cell* 9:1903–1919. doi: 10.1105/tpc.9.11.1903
- Kerbauy GB (2004) *Fisiologia Vegetal*. Guanabara koogan, Rio de Janeiro, Brazil
- Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54:391–406. doi: 10.1007/s13353-013-0173-x
- Kramut P, S.Te-chato (2010) Effect of culture media , plant growth regulators and carbon sources on establishment of somatic embryo in suspension culture of oil palm. *J Agric Technol* 6:159–170.
- Kumar V, Van Staden J (2019) Multi-tasking of SERK-like kinases in plant embryogenesis, growth, and development: current advances and biotechnological applications. *Acta Physiol Plant* 41:31. doi: 10.1007/s11738-019-2819-8
- Lakshmanan P (2006) Somatic embryogenesis in sugarcane—An addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities,’ *in vitro cell. Dev. Biol. Plant* 41(4):345–363; 2005. *Vitr Cell Dev Biol - Plant*

42:201–205. doi: 10.1079/IVP2006772

Lédo ADS, Gomes KKP, Barboza SBSC, et al (2007) Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de coqueiro-anão. *Pesqui Agropecu Bras* 42:147–154. doi: 10.1590/S0100-204X2007000200002

Ling You X, Seon Yi J, Eui Choi Y (2006) Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. *Protoplasma* 227:105–112. doi: 10.1007/s00709-006-0149-3

Litz RE, Gray DJ (1995) Somatic embryogenesis improvement. *World J Microbiol Biotechnol* 11:416–425.

Lleras E (1985) *Acrocomia*, a genus with great potential. *Newsletter, Useful Palms Trop Am* 3–5.

Lopes ADS, Pacheco TG, Nimz T, et al (2018) The complete plastome of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] and extensive molecular analyses of the evolution of plastid genes in *Arecaceae*. *Planta*. doi: 10.1007/s00425-018-2841-x

Lorenzi G, Negrelle R (2006) *Acrocomia aculeata* (JACQ.) Lodd. EX Mart.: Aspectos ecológicos, usos e potencialidades.

Lorenzi H (2004) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*.

Lorenzi H (1992) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*.

Lorenzi H, Souza HM de (1996) *Palmeiras no Brasil*. Editora Plantarum

Lorenzi HJ (2010) *Flora brasileira: 'Arecaceae' (palmeiras)*. Instituto Plantarum

Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (2016) *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*.

Luis ZG (2013) *Estratégias para a embriogênese somática e Conservação ex situ de*

germoplasma de macaúba [*Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Ex mart.].

Universidade de Brasília

- Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2014) An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118:485–496. doi: 10.1007/s11240-014-0500-x
- Ma J, He Y, Wu C, et al (2012) Cloning and Molecular Characterization of a SERK Gene Transcriptionally Induced During Somatic Embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. *Plant Mol Biol Report* 30:195–203. doi: 10.1007/s11105-011-0330-5
- Ma X, Xu G, He P, Shan L (2016) SERKING Coreceptors for Receptors. *Trends Plant Sci* 21:1017–1033. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.014
- Maadon SN, Rohani ER, Ismail I, et al (2016) Somatic embryogenesis and metabolic differences between embryogenic and non-embryogenic structures in mangosteen. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 127:443–459. doi: 10.1007/s11240-016-1068-4
- Machado CAC, Argandona EJS, Homem GR, Tommaselli MAG (2010) Modelo De Viabilização Da Produção Do Consórcio : Macaúba ( *Acrocomia aculeata* ) E Cana-De-Açúcar ( *Saccharum Officinarum* ). XXX Encontro Nac Eng produção 11.
- Magalhães HM, Lopes PSN, Ribeiro LM, et al (2013) Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees - Struct Funct* 27:273–283. doi: 10.1007/s00468-012-0797-1
- Mahmud I, Shrestha B, Boroujerdi A, Chowdhury K (2015) NMR-based metabolomics profile comparisons to distinguish between embryogenic and non-embryogenic callus tissue of sugarcane at the biochemical level. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 51:340–349. doi: 10.1007/s11627-015-9687-8
- Martin AB, Cuadrado Y, Guerra H, et al (2000) Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Sci* 154:143–151. doi: 10.1016/S0168-

9452(99)00251-4

Martins RC (2012) A Família Arecaceae (Palmae) no Estado de Goiás: Florística e Etnobotânica. Universidade de Brasília

Matsimbe SFS (2012) Utilização De Características Ópticas Para Estimar O Teor De Óleo E Volume Do Mesocarpo Nos Frutos De Macaúba. Universidade federal de Viçosa

Mazzottini-dos-Santos HC, Ribeiro LM, Oliveira DMT (2018) Structural changes in the micropylar region and overcoming dormancy in Cerrado palms seeds. *Trees* 0:0. doi: 10.1007/s00468-018-1723-y

McFadden GI (1995) *In situ* Hybridization. In: Braith DG-, Bourque D, Bohnert H (eds) METHODS IN CELL BIOLOGY. Academic Press, San Diego, pp 165–183

Meira FS, Luis ZG, de Araújo Silva-Cardoso I de AM, Scherwinski-Pereira JE (2019) Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events. *Flora* 250:59–67. doi: 10.1016/j.flora.2018.11.011

Melo PG (2012) Produção e caracterização de biodiesel obtidos a partir da oleaginosa Macaúba (*Acrocomia aculeata*).

Montero-Cortés M, Rodríguez-Paredes F, Burgeff C, et al (2010) Characterisation of a cyclin-dependent kinase (CDKA) gene expressed during somatic embryogenesis of coconut palm. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 102:251–258. doi: 10.1007/s11240-010-9714-8

Motta P, Curi N, Oliveira-filho AT De, Gomes J (2002) Ocorrência da macaúba em Minas Gerais : relação com atributos. *Pesqui Agropecu Bras* 37:1023–1031.

Moura EF (2007) Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. Universidade Federal de Viçosa

Moura EF, Motoike SY, Ventrella MC, et al (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Sci Hortic (Amsterdam)* 119:447–454. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.033

- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90:1–8. doi: 10.1007/s11240-007-9249-9
- Nascimento-Gavioli MCA, Cangahuala-Inocente GC, Steinmacher D, et al (2017a) Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. *Vitr Cell Dev Biol - Plant*. doi: 10.1007/s11627-017-9805-x
- Nascimento-Gavioli MCA, Cangahuala-Inocente GC, Steinmacher D, et al (2017b) Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 53:33–40. doi: 10.1007/s11627-017-9805-x
- Neto DCL and AJS, Federal (2011) Potential Crops for Biodiesel Production in Brazil : A Review. *World J Agric Sci* 7:206–217. doi: 10.1139/O06-193
- Niemenak N, Saare-Surminski K, Rohsius C, et al (2008) Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Rep* 27:667–676. doi: 10.1007/s00299-007-0497-2
- Nieves N, Zambrano Y, Tapia R, et al (2003) Field performance of artificial seed-derived sugarcane plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75:279–282. doi: 10.1023/A:1025855611981
- Normah MN, Rohani E., Mohamed Hussein Z. (2013) Somatic embryogenesis in higher plants. *Malaysian Appl Biol* 2:1–12.
- Novaes RF (1952) Contribuição para o estudo do côco macaúba. ESALQ
- Ortiz-Lopez a, Chang H, Bush DR (2000) Amino acid transporters in plants. *Biochim Biophys Acta* 1465:275–280. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00144-9
- Othmani A, Bayouhd C, Drira N, et al (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant*

- Cell Tissue Organ Cult 97:71–79. doi: 10.1007/s11240-009-9500-7
- Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, et al (2014) A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomol Detect Quantif* 1:23–33. doi: 10.1016/j.bdq.2014.08.002
- Padilha JHD (2013) embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* (jacq.) lodd. ex mart. utilizando a técnica do tcl (“THIN CELL LAYER”).
- Padilha JHD, Ribas LLF, Amano É, Quoirin M (2015) Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. *Acta Bot Brasilica* 29:516–523. doi: 10.1590/0102-33062015abb0109
- Palanyandy SR, Suranthran P, Gantait S, et al (2013) *In vitro* developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. *Acta Physiol Plant* 35:1727–1733. doi: 10.1007/s11738-012-1201-x
- Pareddy DR, Greyson RI (1989) Studies on sucrose requirements of cultured maize tassels. *Can J Bot* 67:225–229.
- Pérez-Núñez MT, Souza R, Sáenz L, et al (2009) Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep* 28:11–19. doi: 10.1007/s00299-008-0616-8
- Pescador R, Kerbauy GB, Kraus JE, et al (2008) Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 44:289–299. doi: 10.1007/s11627-008-9118-1
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 29:16–21. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pires IE, Resende MDV de, SILVA RL da, Resende Jr MFR de (2011) Genética florestal.
- Ramos LPR, Kucek KT, Domingos AK, Wilhelm HM (2003) Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e socioambiental para o Brasil. *Rev Biotecnol Ciência*

e Desenvol 90:229–240.

- Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF (2003) Analysis of the Floristic Composition of the Brazilian Cerrado Vegetation Iii: Comparison of the Woody Vegetation of 376 Areas. *Edinburgh J Bot* 60:57–109. doi: 10.1017/S0960428603000064
- Ree JF, Guerra MP (2015) Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 51:589–602. doi: 10.1007/s11627-015-9722-9
- Rekik I, Elleuch A, Kriaa W, Drira N (2013) Molecular cloning and in silico analysis of three somatic embryogenesis receptor kinase mRNA from date palm. *Genetika* 45:837–853. doi: 10.2298/GENSR1303837R
- Ribeiro LM, Souza PP, Rodrigues AG, et al (2011) Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. *Seed Sci Technol* 39:303–317. doi: 10.15258/sst.2011.39.2.04
- Rival A, Ilbert P, Labeyrie A, et al (2013) Variations in genomic DNA methylation during the long-term *in vitro* proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep* 32:359–368. doi: 10.1007/s00299-012-1369-y
- Rocha DI, Kurczy E, Potocka I, et al (2016a) Histology and Histochemistry of Somatic Embryogenesis. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds) *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer International Publishing Switzerland, pp 455–469
- Rocha DI, Kurczyńska E, Potocka I, et al (2016b) Histology and Histochemistry of Somatic Embryogenesis. pp 455–469
- Rodrigues LR, Marcelo J, Oliveira S De (2004) Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. *Rev Bras Biociências* 2:159–167.
- Rubio Neto A, Silva FG, Sales J de F, et al (2014) Superação da dormência em sementes de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges ex Mart.]. *Acta Sci - Agron* 36:43–50. doi: 10.4025/actasciagron.v36i1.13220
- Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, et al (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm

- (*Phoenix dactylifera*). Ann Bot 98:301–308. doi: 10.1093/aob/mcl104
- Santos IR, Maximiano MR, Almeida RF, et al (2018) Genotype-dependent changes of gene expression during somatic embryogenesis in oil palm hybrids (*Elaeis oleifera* x *E. Guineensis*). PLoS One 13:e0209445. doi: 10.1371/journal.pone.0209445
- Scariot A (1998) Seed Dispersal and Predation of the Palm *Acrocomia aculeata*. Principes 42:5–8.
- Scariot A, Lleras E (1991) Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. Biotropica 23:12–22.
- Scherwinski-Pereira JE, da Guedes RS, Fermino PCP, et al (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. Vitro Cell Dev Biol - Plant 46:378–385. doi: 10.1007/s11627-010-9279-6
- Scherwinski-Pereira JE, da Silva Guedes R, da Silva RA, et al (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). Plant Cell Tissue Organ Cult 109:501–508. doi: 10.1007/s11240-012-0115-z
- Scherwinski-Pereira JE, Maria T, Maciel S, et al (2006) *In vitro* germination of Murmuru zygotic embryos (*Astrocaryum ulei*). 251–256.
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen M a, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development 124:2049–2062. doi: 10.1093/pcp/pci031
- Schwendiman J (1988) Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. Cafe Cacao 43–52.
- Sen J, Kalia S, Guha-Mukherjee S (2002) Level of endogenous free amino acids during various stages of culture of *Vigna mungo* (L.) Hepper – Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. Curr Sci 82:429–433.
- Sghaier-Hammami B, Drira N, Jorrín-Novo J V. (2009a) Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. J Proteomics 73:161–177. doi: 10.1016/j.jprot.2009.07.003

- Sghaier-Hammami B, Valledor L, Drira N, Jorin-Novo J V. (2009b) Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. *Proteomics* 9:2543–2554. doi: 10.1002/pmic.200800523
- Sharma DR, Dawra S, Chowdhury JB (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* Linn.) cv. 'Khadravi' through tissue culture.
- Silva JA da (2013) Avaliação do programa nacional de produção e uso do biodiesel no Brasil--PNPB. *Rev Política Agrícola* 22:18–31.
- Soares JDR, Rodrigues FA, Pasqual M, et al (2011) Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. *Ciência Rural* 41:773–778. doi: 10.1590/S0103-84782011005000040
- Souza A, Junghans T (2006) Introdução à micropropagação de plantas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical Cruz das Almas
- Steinmacher DA, Clement CR, Guerra MP (2007a) Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: Towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 89:15–22. doi: 10.1007/s11240-007-9207-6
- Steinmacher DA, Krohn NG, Dantas ACMM, et al (2007b) Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. *Ann Bot* 100:699–709. doi: 10.1093/aob/mcm153
- Tase P (2012) English - Guarani/Guarani - English Dictionary.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, et al (2010) A practical approach to RT-qPCR publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50:S1--S5.
- Teixeira JB, R SM, G KE (1986) Asexual embryogenesis in mature embryo callus of palms (*Acrocomia aculeata* and *Elaeis oleifera*). In: Resumos Congress International Plant Tissue Culture, Minneapolis, EUA, IAPTC. p 191
- Teixeira JB, Söndahl MR, Kirby EG (1993) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 34:227–233. doi:

10.1007/BF00029711

- Teixeira LC (2005) Potential of oils for the production of biodiesel. *Inf Agropecuário* 26:18–27.
- Thelander M, Nilsson A, Ronne H (2018) Carbon and energy metabolism. *Annu Plant Rev online* 211–245.
- Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol Biochem* 42:35–42. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.10.008
- Titon M, Xavier A, Otoni WC, Motoike SY (2007) Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e Picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. *Rev Árvore* 31:417–426. doi: 10.1590/S0100-67622007000300007
- Torres AC, Caldas LS, Buso JA, others (1998) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa-SPI; Embrapa Hortaliças
- Torres AC, Ferreira AT, BUSO JA, et al (2000) Glossario de biotecnologia vegetal.
- Touchet B de, Duval Y, Pannetier C (1991) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). 20:1–2.
- Tremblay L, Tremblay FM (1991) Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* ( Mill .) B . S . P .) and red spruce (*P . rubens* Sarg .) somatic embryos. 95–103.
- Tsai C-J, Harding SA (2013) *In situ* Hybridization. In: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp 339–359
- Vandesompele J, Preter K De, Pattyn F, et al (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Vasil V, Redway F, Vasil IK (1990) Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Nat Biotechnol* 8:429.

- Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12:245–252. doi: 10.1016/j.tplants.2007.04.002
- Verdeil JL, Hocher V, Huet C, et al (2001) Ultrastructural Changes in Coconut Calli Associated with the Acquisition of Embryogenic Competence. *Ann Bot* 88:9–18. doi: 10.1006/anbo.2001.1408
- Viñas M, Jiménez V (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Rev Colomb Biotecnol* XIII:229–242.
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, et al (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:233–249. doi: 10.1023/a:1015673200621
- Wilkinson DG (1992) *In situ* hybridization :a practical approach. Oxford University Press
- Williams EGG, Maheswaran G (1986) Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann Bot* 57:443–462. doi: 10.1093/aob/mcg002
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39:75–85. doi: 10.2144/05391RV01
- Wu XB, Wang J, Liu JH, Deng XX (2009) Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. *J Plant Physiol* 166:52–62. doi: 10.1016/j.jplph.2008.02.005
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411–1423. doi: 10.1105/tpc.5.10.1411

## Capítulo 1

### FATORES ENVOLVIDOS COM A CALOGÊNESE VISANDO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Acrocomia aculeata*: MORFOANATOMIA E BIOQUÍMICA

#### Resumo

A *Acrocomia aculeata* é uma palmeira do Cerrado brasileiro que possui alto potencial para a produção de óleo vegetal. Sendo assim, esta espécie tem sido alvo para o melhoramento vegetal. Portanto, esse trabalho teve como objetivo induzir a calogênese em macaúba a partir de tecidos foliares de plantas adultas e elucidar os eventos morfoanatômicos e bioquímicos visando a embriogênese somática. Para isso, foram utilizadas folhas do palmito de três acessos diferentes e avaliou-se a influência da região do palmito e o seccionamento ou não do explante, a posição do explante no meio de cultivo e a combinação das auxinas Picloram e 2,4 – D na indução de calos. Na multiplicação dos calos foi testada a adição das poliaminas ao meio e para diferenciação em embriões somáticos, foram testados meios contendo diferentes combinações de auxinas e citocininas. Para a análise anatômica e bioquímica foram retiradas amostras oriundas das diferentes etapas do processo. A região do palmito proximal quando seccionada proporciona maior formação de calos aos 30 dias (52,5%). Quando avaliado região, combinação de auxinas e posição percebeu-se que, quando posicionados verticalmente, explantes da região Mediana sob efeito de 450  $\mu\text{M}$  de Picloram exibem maior percentual de calos (58,3%) aos 30 dias, enquanto aos 90 e 180 dias a região Distal e explantes posicionados horizontalmente apresentaram maior formação de calos. Quando avaliado os acessos, observou-se maior formação de calos no acesso Buriti Vermelho-DF (13%). Os tratamentos mostrados no presente trabalho ainda não são suficientes para a diferenciação de calos em embriões somáticos. No entanto, foi observado que a associação de ANA+2iP e 2,4–D+BAP foram importantes para manutenção dos calos. Anatomicamente, foi possível perceber que o explante inicial apresentava células meristemáticas e feixes vasculares pouco desenvolvidos. Na região Distal, aos 30 dias em meio de indução, apresentaram formação de calos na região central do feixe vascular de menor calibre, e aos 90 dias observou-se a formação de calos em diversos feixes vasculares de forma padronizada. Os calos em meio com associação de auxinas apresentaram características embriogênicas, como células maiores e mais vacuoladas, além de paredes celulares aparentemente mais espessas e acúmulo de amido na região central do calo. As análises bioquímicas dos teores de açúcares solúveis totais evidenciaram que antes da indução de calos (0 DAI), o acesso de Buriti Vermelho apresentou menor quantidade de açúcares solúveis totais (121,2  $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ). Além disso, o calo nodular apresentou 212,6  $\mu\text{g}/\text{mg}$  em relação ao calo alongado que exibiu 111,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . O resultado dos teores de amido apresentou diferenças apenas no início da indução de calos, sendo que Buriti Vermelho apresentou maiores teores. Os resultados dos teores de proteínas totais em razão do tempo de indução são maiores em todos os acessos no tempo inicial, em comparação aos 120 dias de indução. Além disso, o calo nodular apresentou maiores teores de proteínas (50,4  $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ) que o calo alongado (8,03  $\mu\text{g}$ ). Nesse trabalho foram demonstrados fatores envolvidos na formação de calos em macaúba, porém com necessidade de otimização das etapas finais do processo, em especial, na diferenciação de embriões somáticos. Em função dos resultados obtidos, este trabalho apresenta-se como um modelo útil para a investigação dos eventos iniciais da embriogênese somática em palmeiras.

Palavras-chaves: Embriogênese somática, calogênese, bioquímica, anatomia. Amido.

## 1 Introdução

A *Acrocomia aculeata* (Macaúba) é uma importante espécie do Cerrado brasileiro. Conhecida pela alta produção de óleo, a macaúba apresenta alta produtividade em óleo entre as plantas oleaginosas (até 6.000 kg/ha) e, dada a qualidade do seu óleo, possui alto potencial para a produção de biodiesel (Cardoso et al. 2017). Exibe também alta plasticidade ambiental, podendo ser cultivada em regiões tropicais secas, e teoricamente, se mantém produtiva por mais de 100 anos (Lorenzi 1992; Teixeira 2005).

No entanto, a macaúba é uma planta que apresenta sua forma de exploração de forma extrativista além de ser incipientemente domesticada (Lopes et al. 2018). Dessa forma, a sua exploração comercial depende do desenvolvimento de tecnologias que incluam a seleção de genótipos. Genótipos superiores podem ser selecionados de populações naturais de plantas, porém, apresentam dificuldades de serem propagados vegetativamente por meio de técnicas convencionais, fato que dificulta que genótipos superiores possam ser multiplicados para plantios comerciais (Clement 1999; Lorenzi e Negrelle 2006)

Portanto, é necessária a propagação do genótipo com características importantes. A embriogênese somática é uma técnica importante a ser utilizada por permitir inúmeros clones. A embriogênese somática é uma via morfogênica para regeneração *in vitro* de plantas, sendo definida como o processo pelo qual células ou tecidos somáticos, sob condições experimentais favoráveis, são induzidos a formar embriões somáticos bipolares, semelhantes aos embriões zigóticos, mas que não é produto da fusão de gametas (Williams e Maheswaran 1986).

Assim, a embriogênese somática tem se mostrado útil para a propagação *in vitro* daquelas espécies que apresentam dificuldades de se propagar pela via assexuada, além de ser uma importante ferramenta para o melhoramento vegetal. Protocolos de embriogênese somática já foram descritos para algumas espécies de palmeiras, como a *P. dactylifera* (Sharma et al. 1984; Fki et al. 2003; Sané et al. 2006; Othmani et al. 2009), o *E. guineensis* (Ahee et al. 1981; Teixeira et al. 1993; Scherwinski-Pereira et al. 2010; de Carvalho Silva et al. 2012; Balzon et al. 2013), *A. aculeata* (Moura et al. 2009), *E. oleracea* (Scherwinski-Pereira et al. 2012) e *B. gasipaes* (Steinmacher et al. 2007b; Heringer et al. 2014).

Em macaúba, o uso da técnica foi relatada inicialmente utilizando embriões zigóticos como fonte de explante por Teixeira et al. (1986), Moura et al. (2009) e, mais recentemente por Luis e Scherwinski-Pereira (2014). Luis (2013) e Meira et al. (2019a) apresentaram os primeiros resultados quanto à embriogênese somática a partir de tecido foliar de plantas adultas. Além disso, para melhor entendimento da técnica e otimização em macaúba, faz-se necessário análise mais aprofundadas como análises anatômicas e bioquímicas do desenvolvimento *in vitro*.

Devido à insuficiência de relatos da embriogênese somática e a necessidade da propagação da *A. aculeata*, o objetivo desse trabalho foi induzir a calogênese em macaúba a partir de tecidos foliares de plantas adultas e elucidar os eventos morfoanatômicos e bioquímicos durante o processo.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Material vegetal**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II), localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília, DF.

Como explante inicial foram utilizadas folhas jovens, ainda não expandidas e aclorofiladas (palmito) de *Acrocomia aculeata*. Para os experimentos abordados nos tópicos 3.2.1 e 3.2.2 os materiais propagativos foram provenientes de plantas adultas selecionadas de populações naturais localizadas na região rural próxima ao Setor Habitacional Fercal em Sobradinho, DF (15°35'37.6''S, 47°54'36.1''WO). Para a realização de um terceiro experimento (tópico 3.2.3), os explantes foram obtidos a partir de plantas adultas de três acessos do Campo Experimental da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. Estes acessos possuem oito anos de idade e as mudas foram provenientes de sementes coletadas em três locais: Tiros – MG, Carmo do Paranaíba – MG e Buriti Vermelho – DF (Figura 1).

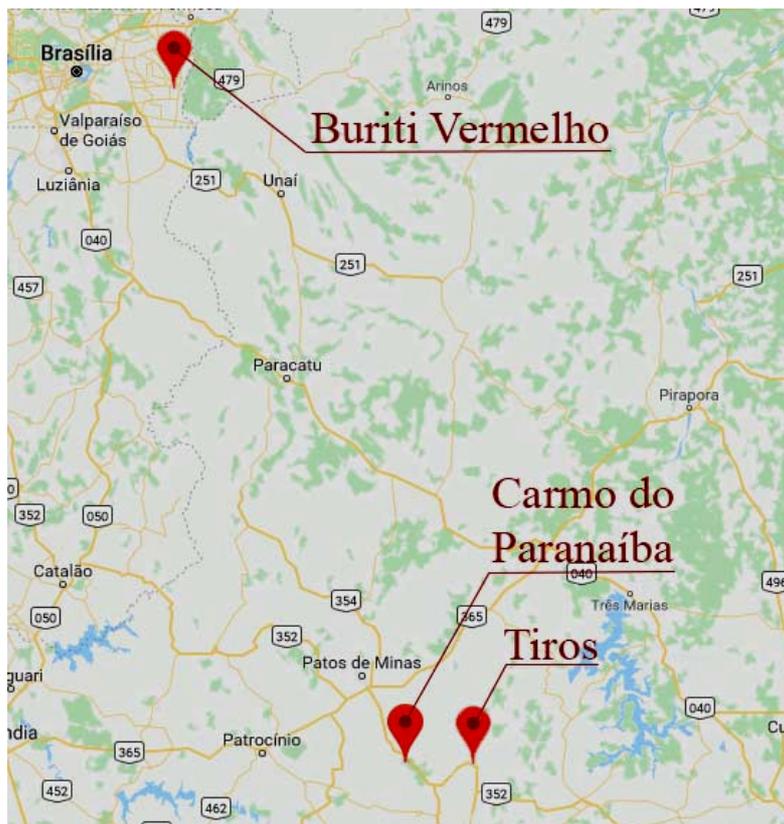


Figura 1 Localização geográfica dos parentais das matrizes de macaúba provenientes da Embrapa Cerrados, utilizadas como fontes dos palmitos para os experimentos de calogênese visando a embriogênese somática.

Os palmitos foram coletados evitando-se o máximo de danos das plantas matrizes, as mantendo-as vivas e com capacidade de rebrota (Figura 2). Para a retirada de cada palmito, efetuou-se primeiramente a desfolha da planta, retirando as folhas velhas mais externas e, uma vez identificada a região próxima ao meristema, realizou-se um corte horizontal e imediatamente acima dessa região (cerca de 10 cm acima do meristema apical da planta). Em seguida, a região de corte da planta foi coberta e protegida para sua recuperação. Ressalta-se a importância do sucesso em manter a planta matriz viva e capaz de rebrotar para novos estudos da mesma planta selecionada.



Figura 2 Coleta do palmito da macaúba para os experimentos de indução da calogênese visando a embriogênese somática (A-E) e planta regenerada pós extração do palmito (F). A: Retirada das folhas mais externas com ajuda de motosserra com extensor; B: Região próxima ao meristema; C: Região de corte do palmito com aproximadamente 10 cm de distância do meristema; D: Superfície do estipe da planta mostrando a região de retirada do palmito; E: Planta em início de regeneração; F: Planta totalmente regenerada.

Após coletado em campo, o material vegetal foi conduzido ao laboratório e submetido ao processo de limpeza e de redução do tamanho para 30 cm de comprimento (Figura 3A-F). Em seguida, o palmito formado exclusivamente por folhas aclorofiladas foi desinfestado em condições de câmara de fluxo laminar, pela imersão em álcool etílico 70% (v/v) por três minutos, hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 20 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Uma vez realizada a desinfestação, com o auxílio de pinças e bisturis, as folhas foram excisadas

em explantes de 1,0 cm<sup>2</sup>, as quais foram padronizados mantendo-se três lâminas de folhas/explante, obtendo, desta forma, os propágulos para os experimentos *in vitro* (Figura 3G).

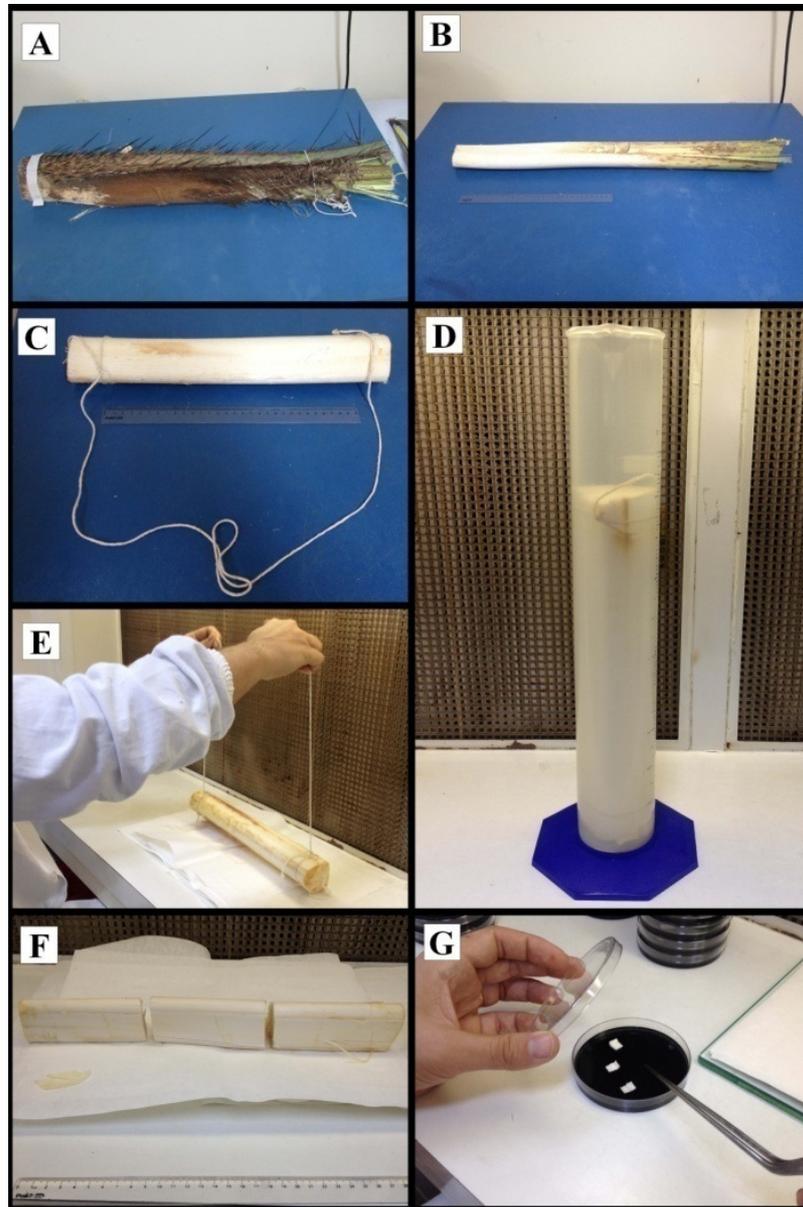


Figura 3 Procedimento de limpeza e assepsia do material no laboratório para indução da calogênese visando a embriogênese somática. A: Material proveniente do campo; B: Palmito pós extração das folhas mais externas; C: Palmito reduzido para 30 cm de comprimento; D: Assepsia realizada em proveta dentro de câmara de fluxo laminar; E: Material asséptico para a introdução *in vitro*; F: Divisão do palmito em três partes iguais; G: Inoculação dos explantes

## 2.2 Indução da calogênese visando a embrigênese somática

### 2.2.1 Influência da região do palmito e seccionamento do explante

Neste primeiro experimento avaliou-se a influência da região do palmito utilizada como fonte de explante e o seccionamento ou não do explante, a fim de aumentar a superfície de contato com o meio de cultivo. Para tanto, o palmito foi dividido em três regiões: Proximal (mais próxima ao meristema), região Mediana (meio do palmito) e região Distal (a mais distante do meristema). Já para avaliação da influência do tipo de seccionamento do explante, foram realizados cortes transversais no sentido do feixe vascular, com o propósito de aumentar a superfície de contato do explante ao meio de cultivo, sendo denominado corte do tipo cortina, além de explantes do tipo padrão (Figura 5, tópico 4.1.2).

Foi utilizado o meio de cultivo composto de sais do meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 500 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, sendo o meio solidificado com 2,3 mg.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. A auxina Ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloro- picolínico (Picloram) foi adicionada ao meio na concentração de 450 µM, como descrito em Meira et al. (2019b, *in press*).

A percentagem de explantes oxidados (com superfície com mais de 50% de oxidação) e a percentagem de explantes com formação de calo primário (sem considerar a quantidade e a qualidade do calo) foram determinadas aos 30, 90 e 180 dias de cultivo *in vitro*. A percentagem de explantes oxidados foi obtida através da razão entre a quantidade de explantes oxidados e o número total de explantes por placa, multiplicada por 100. A percentagem de explantes com calo primário foi calculada da mesma forma supracitada.

Nesse experimento, adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2 (regiões do palmito - Distal, Mediana e Basal - e seccionamento do explante - padrão e cortina), totalizando 6 tratamentos. Cada tratamento foi formado por 13 repetições, cada uma delas formadas por 6 explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando software R (R Development Core Team 2008).

### *2.2.2 Influência da região do palmito, posição do explante no meio de cultivo e combinação de auxinas*

Um segundo experimento foi realizado com objetivo de avaliar a influência da região do palmito. Neste experimento, o palmito foi dividido em duas regiões (Distal e Mediana), e os explantes foram posicionados horizontal (porção adaxial em contato com o meio) e verticalmente (posição semelhante ao observado na planta). O posicionamento vertical visou manter o mesmo sentido dos vasos condutores encontrados na planta no campo. Para a avaliação da influência da combinação de auxinas, a auxina Picloram foi adicionada ao meio na concentração de 450  $\mu\text{M}$  combinada com as concentrações 0, 150, 300 e 450  $\mu\text{M}$  do ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4 – D).

Foi utilizado o meio de cultura composto de sais do meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de glutamina, 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de caseína hidrolisada, 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de cisteína, 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de mio-inositol e 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado, sendo o meio solidificado com 2,3  $\text{mg.L}^{-1}$  de Phytigel®.

As avaliações quanto formação de calos foram realizadas aos 30, 90 e 180 dias de indução, conforme mencionado no tópico 3.2.1. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo ( $2 \times 2 \times 4$ ): regiões do palmito (Distal e Mediana), posição do explante (horizontal e vertical) e concentração de 2,4-D (0, 150, 300 e 450  $\mu\text{M}$  combinadas com 450  $\mu\text{M}$  Picloram), totalizando 16 tratamentos. O experimento foi formado com oito repetições cada e 6 explantes por repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando software R (R Development Core Team 2008).

### *2.2.3 Influência dos acessos*

Realizou-se um terceiro experimento visando avaliar a influência de três diferentes acessos na indução de calos. Para tanto, foram coletados dois palmitos (Coleta 1 e Coleta 2) de cada acesso e inoculados em meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de glutamina, 500  $\text{mg.L}^{-1}$  de caseína hidrolisada, 500

mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. A auxina Picloram foi adicionada ao meio na concentração de 450 µM.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento e 6 explantes por repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando software R (R Development Core Team 2008).

#### *2.2.4 Características de cultivo comuns aos experimentos de indução de calos*

Durante os experimentos de indução de calos, os explantes foram transferidos para novo meio com a mesma composição a cada 60 dias, cultivados em placas de Petri (15 x 90 mm) na ausência de luz e em sala de cultivo com temperatura de 25±2°C.

Todos os meios de cultivo foram solidificados com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da esterilização que foi realizada por autoclavagem à 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

### **2.3 Multiplicação de calos**

Durante a etapa de multiplicação, os calos obtidos durante a fase de indução foram separados dos explantes e mantidos em meio com a concentração de Picloram reduzida para 225 µM. Nesta fase, foi testada a adição das poliaminas Espermidina e Putrescina ao meio de cultivo, nas concentrações de 100 µM e 1000 µM, respectivamente, por 120 dias. Os calos foram mantidos em meio de cultura Y3 (Eeuwens 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige and Skoog 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 500 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O meio foi solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da esterilização, realizada por autoclavagem à 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Nesta etapa, os calos foram pesados em balança de precisão no início e após 120 dias de cultivo para verificar a taxa de multiplicação.

## 2.4 Diferenciação de calos em embriões somáticos

Tentativamente foram realizados dois experimentos para a diferenciação dos calos embriogênicos, oriundos dos experimentos anteriores, em embriões somáticos. No primeiro experimento, os calos foram inoculados em meio contendo diferentes concentrações de N<sup>6</sup>-Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 4,43, 8,86, 17,72 e 35,44 µM), combinadas com 0,54 µM de ácido naftalenoacético (ANA). No segundo experimento, os calos foram inoculados em meio com combinações de auxinas e citocininas em concentrações pré-estabelecidas, como segue: 10 µM de Picloram, 4 µM de 2,4-D e 0,54 µM de ANA, combinadas com 4,43 µM de BAP ou 12,3 µM de 2-isopenteniladenina (2iP). Os tratamentos foram divididos da seguinte forma: ANA + BAP (T1), ANA + 2iP (T2), 2,4 - D + BAP (T3), 2,4 - D + 2iP (T4), Picloram + BAP (T5), Picloram + 2iP (T6), BAP (T7) e 2iP (T8). Nestas condições, os materiais foram cultivados por 90 dias.

Durante os dois experimentos, os calos foram mantidos em meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 500 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 300 mg.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O meio foi solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO) e o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da esterilização realizada por autoclavagem à 120 °C e 1,3 atm de pressão por 20 minutos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e cinco calos por repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando software R (R Development Core Team 2008).

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultura utilizados durante os experimentos de indução, multiplicação de calos e diferenciação de embriões somáticos, a partir segmentos foliares de *Acrocomia aculeata*.

Componentes	Indução de calos	Multiplicação	Diferenciação de embriões somáticos
Meio de cultura	Y3	Y3	Y3
Vitaminas	MS	MS	MS
Picloram	450 $\mu\text{M}$	225 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
2,4 - D	-	-	4 $\mu\text{M}$
ANA	-	-	0,54 $\mu\text{M}$
BAP	-	-	4,43 $\mu\text{M}$
2iP	-	-	12,3 $\mu\text{M}$
Putrescina	-	1000 $\mu\text{M}$	-
Espermidina	-	100 $\mu\text{M}$	-
Sacarose	30 $\text{g.L}^{-1}$	30 $\text{g.L}^{-1}$	20 $\text{g.L}^{-1}$
Carvão ativado	2,5 $\text{g.L}^{-1}$	2,5 $\text{g.L}^{-1}$	300 $\text{mg.L}^{-1}$
Phytigel	2,2 $\text{g.L}^{-1}$	2,2 $\text{g.L}^{-1}$	2,2 $\text{g.L}^{-1}$

## 2.5 Análise anatômica e histoquímica

Para a análise anatômica e histoquímica foram retiradas amostras do material *in vitro* oriundas das diferentes etapas do processo. As amostras do material vegetal se constituíram de folhas imaturas das regiões Mediana e Distal após 0, 30 e 90 dias em meio de indução (experimento 1.2.2), além de calos da etapa de multiplicação e dos diferentes tratamentos da etapa de diferenciação.

Para o preparo do material para as análises anatômicas e histoquímica foi seguido o seguinte protocolo: as amostras foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965) (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2) por um período de 24h, sob vácuo durante a primeira hora. Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas em uma série etanólica crescente (30 - 100%) por 1 hora cada e infiltradas em historresina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante. Posteriormente, secções (3-7  $\mu\text{m}$ ) foram

obtidas em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida a 40 °C.

As secções foram coradas com azul de toluidina (O'Brien et al. 1964), para a análise estrutural, e coradas com *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'Brien and McCully 1981) para identificação de polissacarídeos neutros. Os resultados foram registrados em microscópio acoplado a um computador com um software de captura de imagens (Software LAS EZ 2.0).

## **2.6 Análise bioquímica**

Para a análise bioquímica foram retiradas amostras de folhas dos três acessos no momento do estabelecimento do experimento (dia inicial) e aos 90 e 120 dias de cultivo em meio de indução de calos (experimento mencionado no tópico 3.2.3). Além disso, amostras de calos embriogênicos e não embriogênicos dos demais experimentos também foram selecionadas para análise bioquímica. Todo o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 48 horas e pulverizadas. Cada tratamento foi composto por três repetições.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo (3x2x2): acessos (Tiros – MG, Carmo do Paranaíba – MG e Buriti Vermelho – DF), coletas de dois palmitos de cada acesso e tempos de indução (0 e 120 dias após indução), o que totaliza 12 tratamentos, com 3 repetições cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando-se do software R (R Development Core Team 2008).

### *2.6.1 Açúcares solúveis totais*

A extração dos açúcares totais solúveis foi realizada segundo a metodologia descrita por Pescador et al. (2008). Para tanto, 10 mg de massa seca das amostras pulverizadas foram submetidas à extração em 500 µL de etanol 80% a 80 °C por 20 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 xg (Hermle, Z326k, Alemanha) por 10 minutos e os sobrenadantes foram coletados. Os resíduos foram re-extraído mais três vezes e novamente centrifugado, com os sobrenadantes das quatro

extrações etanólicas reunidos em novos tubos plásticos, totalizando dois mL de sobrenadante.

A quantificação de açúcares solúveis totais foi realizada seguindo metodologia fenol-sulfúrico, descrita por Dubois et al. (1956). Foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  das amostras em tubos de ensaio e adicionados 490  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 500  $\mu\text{L}$  de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 5 minutos de repouso em temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (Shimadzu UV 1800, *Japão*) a 490 nm. Como tratamento controle foi utilizado uma solução com 0,5 mL de água Milli-Q, 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Todas as análises foram realizadas em triplicata e quantificadas com base na curva padrão da glucose, com concentrações de 0, 8, 16, 32, 64, 128 e 256  $\mu\text{g/mL}$ .

### 2.6.2 Amido

A extração e quantificação do amido foram realizadas segundo o método enzimático descrito por Amaral et al. (2007). Para tanto, os 10 mg de massa seca das amostras que foram submetidas a extração de açúcares solúveis totais na etapa anterior foram armazenadas após separação da fase etanólica. Em seguida, o *pellet* formado foi seco em Speed Vac.

Às amostras liofilizadas foram adicionados 0,5 mL ( $120 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de alfa-amilase termoestável do *Bacillus licheniformis* (Megazyme®), diluída em tampão MOPS (ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico) 10 mM pH 6,5. Em seguida, as amostras foram incubadas a 75 °C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 120 unidades de enzima. Posteriormente, foi então adicionada as amostras uma solução contendo 0,5 mL ( $30 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de amilogucosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (Megazyme®), em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, seguido pela incubação das amostras a 50 °C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 30 unidades de enzima. Após as quatro incubações, foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 0,8 M para interromper a reação. Após rápida centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos, alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  das amostras e 18  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q foram pipetadas em microplacas e incubadas por 15 minutos a 37 °C com 300  $\mu\text{L}$  de solução GODPOD (Glucose PAP Liquiform/ Centerlab®). Após a incubação, o teor de amido foi determinado leitor de microplacas Elisa a 505 nm. Todas as análises

foram realizadas em triplicata com base na curva padrão da glucose com concentrações de 0,0; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL.

### *2.6.3 Proteínas totais*

Para a extração das proteínas totais foram coletados 10 mg de massa seca das amostras, adicionados um mL de tampão PBS e macerados com ajuda de gral e pistilo. Logo em seguida, foi adicionado mais um mL de tampão PBS e coletados em microtubos de 2 mL de capacidade. As amostras passaram por vortex durante um minuto e em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos à temperatura de 8°C. Após isso, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos e armazenado.

A quantificação foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Para tanto, foram pipetados 12 µL das amostras em microplacas e foram adicionados 180 µL de reagente Bradford 50%. Após 5-10 minutos de repouso, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 595 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata e com base na curva padrão da albumina de soro bovino (BSA), com concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 e 2,4 µg

## **3 Resultados**

### **3.1 Indução de calos**

#### *3.1.1 Influência da região do palmito e seccionamento do explante*

##### *3.1.1.1 Formação de calos*

Verificaram-se respostas diferenciadas durante a fase inicial da indução de calos quanto à influência da região do palmito utilizada como fonte de explante e à superfície de contato do explante com o meio de cultura. Primeiramente, foi verificado intumescimento nos primeiros três dias, seguido de uma separação daqueles explantes que apresentavam mais de uma folha. Também se observou início de oxidação no local de seccionamento do explante do tipo cortina (Figura 4).

Quanto à indução de calos, aos 30 dias foram avaliadas as primeiras respostas dos explantes ao meio de cultivo em cada região utilizada e nos explantes do tipo cortina e padrão. Estas primeiras respostas estão associadas à formação de calos, sendo verificada a presença de cristais nas bordas dos explantes, maior intumescimento e

superfícies irregulares (Figura 4B). Posteriormente, os calos foram observados, sobretudo, nas bordas seccionadas (Figura 4C) e sobre os folíolos (Figura 4D) daqueles explantes que apresentavam esse tipo de resposta inicial. Estes calos são predominantemente de formato alongado e de cor amarelo, sendo que posteriormente os calos nodulares foram formados a partir deste, conforme previamente descrito por Meira et al. (2019a). Também nesse período foram observados contaminações (dados não apresentados) com perda de repetições mesmo após o estabelecimento do experimento.

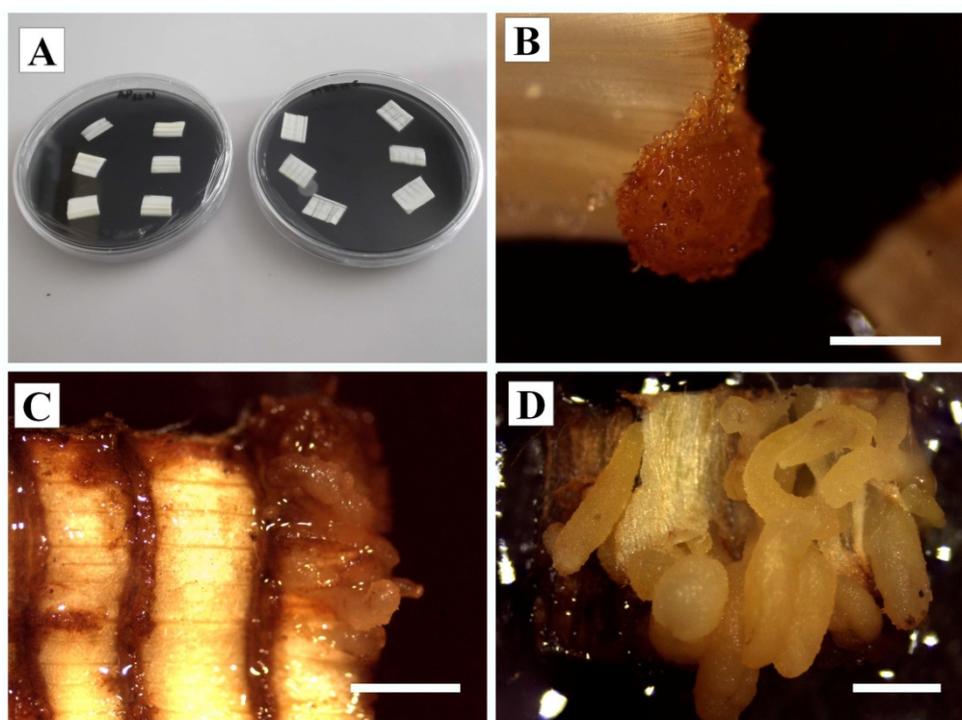


Figura 4. Respostas do cultivo *in vitro* de explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*), provenientes de diferentes regiões do palmito, seccionados ou não. A: Placas com explantes do tipo padrão (não seccionado) e cortina (seccionado). B: Formação de cristais na borda do explante. C: Explante do tipo cortina apresentando a formação de calos; observar oxidação no local de corte. D: Explante do tipo padrão apresentando formação de calos. Escalas: 2 mm

A formação de calos primários avaliada aos 30 dias de indução, segundo as análises estatísticas, foi significativamente influenciada pelo tipo de explante (padrão e cortina) e regiões do palmito utilizadas. Conforme desdobramento (Figura 5), de modo geral, o explante do tipo cortina se sobressaiu em termos de formação de calos. Além do mais, não foram verificadas diferenças estatísticas entre as três regiões do palmito

quando se utilizou o explante padrão, diferentemente do observado para o explante seccionado (cortina). Quando se seccionou o explante, as regiões Mediana (39,7%) e Proximal (52,5%) exibiram maiores percentuais de calos formados que a Distal (10,2%). Salienta-se ainda, a precocidade da região Proximal, independentemente do tipo de explante utilizado, com relação à formação de calo.

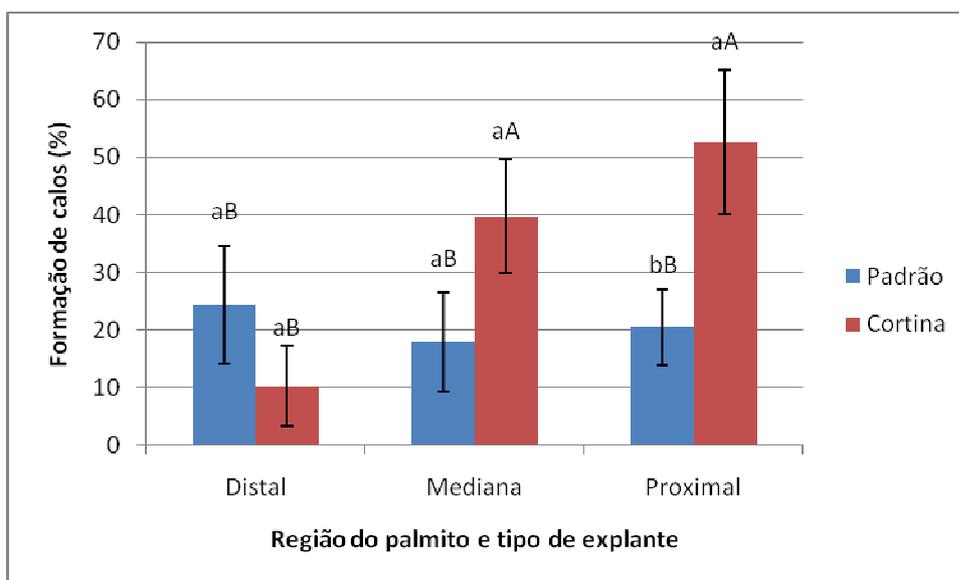


Figura 5. Percentuais de formação de calos em explantes foliares (padrão – sem seccionamento e cortina – com seccionamento) de macaúba (*Acrocomia aculeata*) proveniente de três diferentes regiões do palmito (Distal, Mediana e Proximal), após 30 dias em meio de indução de calos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tipos de explantes (seccionados ou não) dentro de cada região do palmito e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as regiões, dentro de cada tipo de explante, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

Aos 90 dias foi verificado que houve diferenças estatísticas na formação de calos apenas entre os tipos de explantes na região Mediana, sendo 19,9% no explante tipo padrão, enquanto não houve formação de calos no explante do tipo Cortina. Semelhantemente, na região Distal foi verificada a formação de calos apenas no explante do tipo padrão (13%). Na região Proximal foi verificado o inverso, ou seja, maior formação de calos no explante do tipo Cortina (16,6%), enquanto o explante do tipo Padrão apresentou uma formação mais baixa (3,3%).

Já aos 180 dias de indução, não foram verificadas diferenças significativas na formação de calos entre os tratamentos, sendo que tanto o explante do tipo cortina (18%) e padrão (34%) e as regiões avaliadas (14% na região Distal, 25% na região Mediana e 32% na região Proximal) não apresentaram melhorias na formação de calos.

### 3.1.1.2 Oxidação

Aos 30 dias de indução de calos foi avaliada a taxa de oxidação dos explantes em cada região utilizada e nos explantes do tipo cortina e padrão (Figura 6). De modo geral, constatou-se maior oxidação nos explantes do tipo cortina, com destaque para a região Distal que exibiu até 100% de explantes com mais 50% da superfície oxidada.

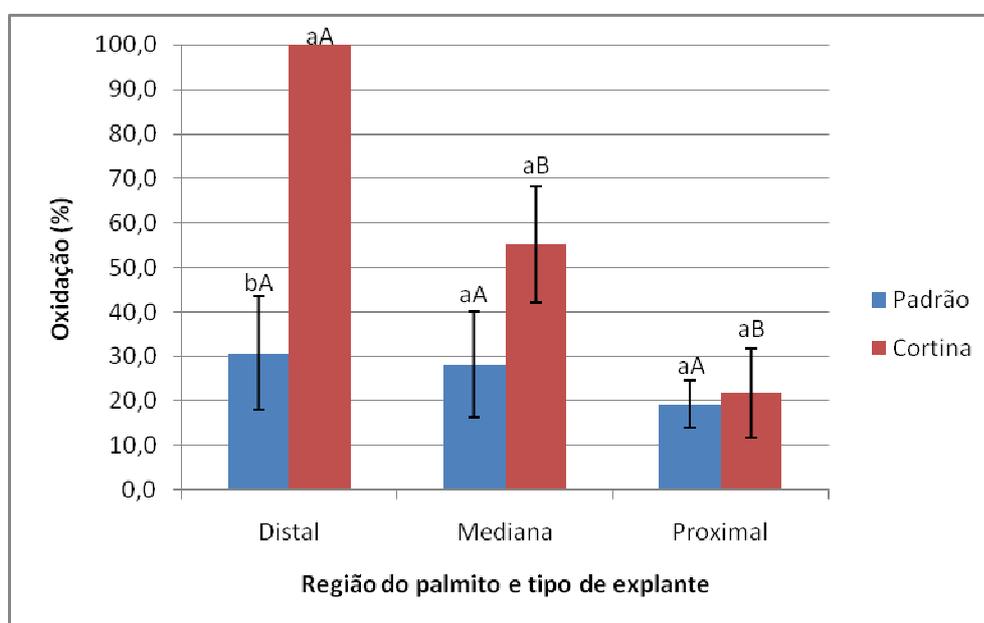


Figura 6. Percentuais de oxidação em explantes foliares (padrão – sem seccionamento e cortina – com seccionamento) de macaúba (*Acrocomia aculeata*) provenientes de três diferentes regiões do palmito (Distal, Mediana e Proximal), após 30 dias em meio de indução de calos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tipos de explantes (seccionados ou não) dentro de cada região do palmito e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as regiões, dentro de cada tipo de explante, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

Aos 90 dias de indução, não foi verificado interação entre os tratamentos. No entanto, foi verificado resultados significativos quanto à oxidação entre os tipos de

cortes testados, sendo que os explantes com o corte do tipo cortina apresentaram 68% de oxidação e o padrão 61% (Figura 7).

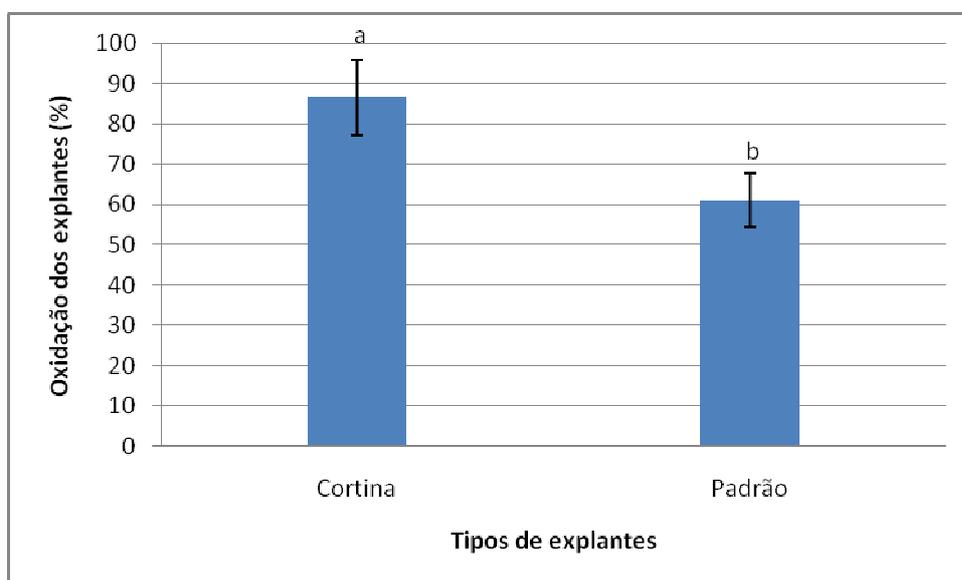


Figura 7. Percentuais de oxidação em explantes foliares (padrão – sem seccionamento e cortina – com seccionamento) de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias em meio de indução de calos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

### 3.1.2 Influência da região do palmito, posição do explante e combinação de auxinas

#### 3.1.2.1 Formação de calos

Durante o experimento de influência da região, posição e combinação de auxinas foi verificado inicialmente intumescimento, seguido de uma separação daqueles explantes que apresentavam mais de uma folha dos explantes. Visualizou-se também início de oxidação nos locais de seccionamento dos explantes (Figura 8). Similar ao mencionado no experimento anterior, verificou-se inicialmente a formação de cristais nas bordas dos explantes, além de intumescimento e superfícies irregulares (Figura 9A e C), e posteriormente a formação de calos após 60 dias de indução (Figura 9B e D). Estes calos, como mencionado anteriormente, seguem o mesmo padrão; são predominantemente de formato alongado e de cor amarelo inicialmente, e surgem sempre na região da nervura.

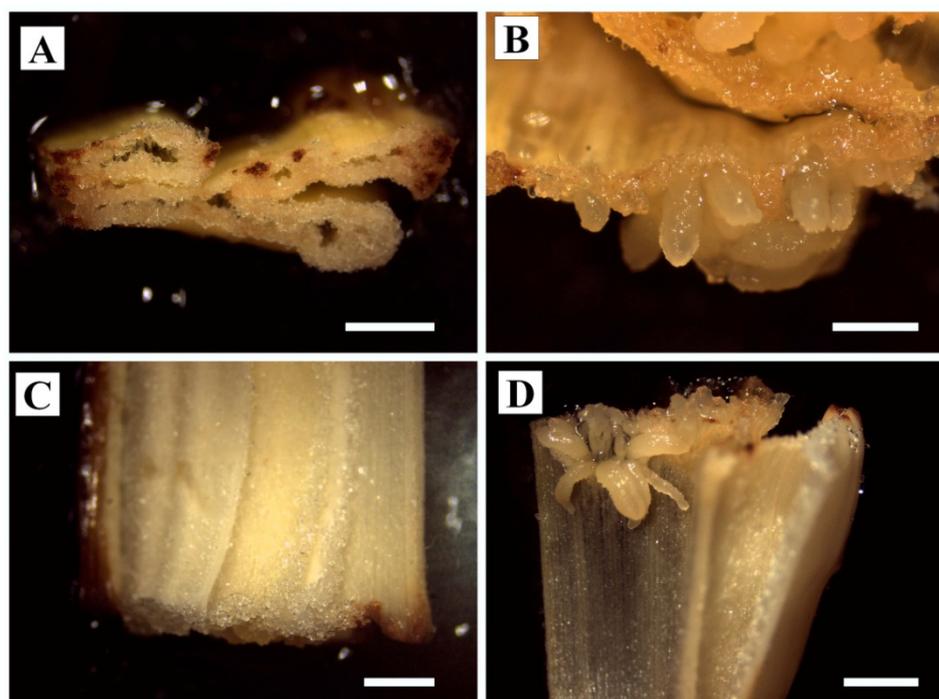


Figura 8. Respostas do cultivo *in vitro* de explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) posicionados horizontal e verticalmente no meio de indução de calos. A: Explante na posição vertical apresentando as primeiras respostas ao cultivo *in vitro*. B: Explante na posição vertical com início de calos. C: Explante na posição horizontal apresentando as primeiras respostas ao cultivo *in vitro*. D: Explante na posição horizontal com início de calos. Escalas: A, C e D: 2mm B: 1mm

Aos 30 dias de indução, as análises estatísticas revelaram que a interação tripla auxinas *vs.* regiões do palmito *vs.* posições do explante foi significativa e, portanto, desdobrada (Tabela 2). O desdobramento revelou que a região do palmito não interfere no percentual de calos em explantes posicionados horizontalmente no meio de cultivo, independentemente das combinações entre as auxinas, e que, quando posicionados verticalmente, explantes da região Mediana sob efeito do tratamento 450  $\mu$ M Picloram exibem maior percentual de calos (58,3%) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito das auxinas Picloram e 2,4-D combinadas em diferentes concentrações e do posicionamento dos explantes no meio de cultivo sobre as percentagens de calos primários, durante a embriogênese somática de macaúba (*Acrocomia aculeata*) aos 30 dias de cultivo, a partir de explantes foliares provenientes de regiões diferentes do palmito

Tratamentos ( $\mu\text{M}$ )	Posição e região do palmito			
	Horizontal		Vertical	
	Distal	Mediana	Distal	Mediana
450 Pic	20,8 $\pm$ 7,8 bA	8,3 $\pm$ 3,1 bA	25,0 $\pm$ 8,3 bB	58,3 $\pm$ 15,4 aA
450 Pic + 150 2,4-D	62,5 $\pm$ 4,4 bA	18,8 $\pm$ 9,3 bA	0,0 $\pm$ 5,8 bB	35,4 $\pm$ 12,8 aA
450 Pic + 300 2,4-D	0,0 $\pm$ 6,2bA	4,2 $\pm$ 2,5 bA	2,1 $\pm$ 2,0 bA	0,0 $\pm$ 3,9 bA
450 Pic + 450 2,4-D	20,8 $\pm$ 2,0 bA	0,0 $\pm$ 0,0 bA	2,1 $\pm$ 2,0 bA	2,1 $\pm$ 2,0 bA

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as combinações de auxinas em cada posição e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as regiões do palmito, dentro de cada combinação de auxina, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.  $\pm$  Erro padrão. Abreviações: (Pic) ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloro- picolínico – Picloram e (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Aos 90 dias, diferenças estatísticas também foram observadas entre os níveis do fator auxinas combinadas, com maior formação de calos nos explantes em meio sem adição de 2,4-D (23,21%) (Figura 9).

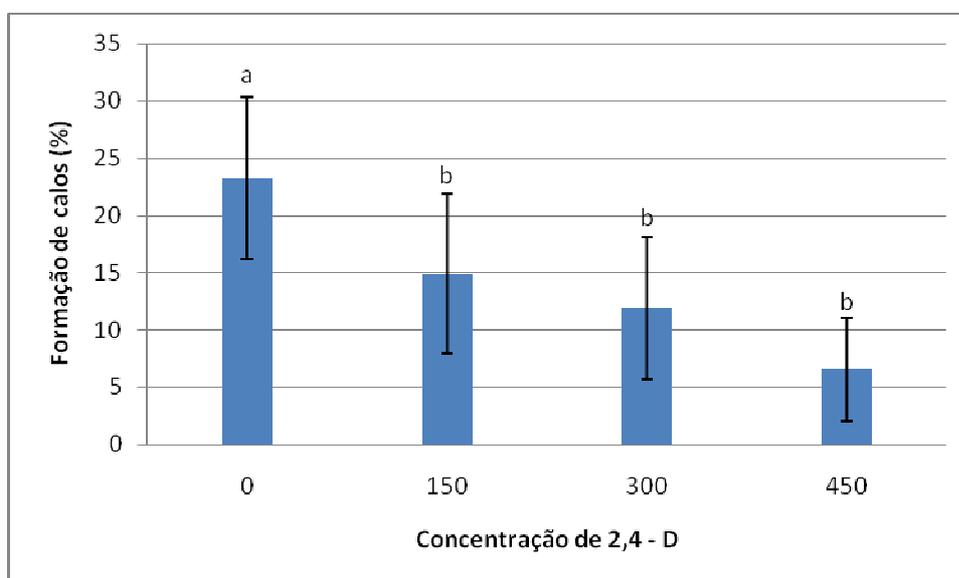


Figura 9. Porcentagem de formação de calos em diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com 450  $\mu\text{M}$  de Picloram, aos 90 dias em meio de indução de calos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão

Aos 90 dias de indução de calos, verificou-se que somente a interação regiões do palmito *vs.* posição do explante foi significativa e, então, desdobrada. De acordo com análises, a região Distal, de modo geral, se sobressaiu em termos de produção de calos quando comparada a região Mediana, com destaque para o tratamento região Distal posicionada verticalmente (33,3%) (Figura 10).

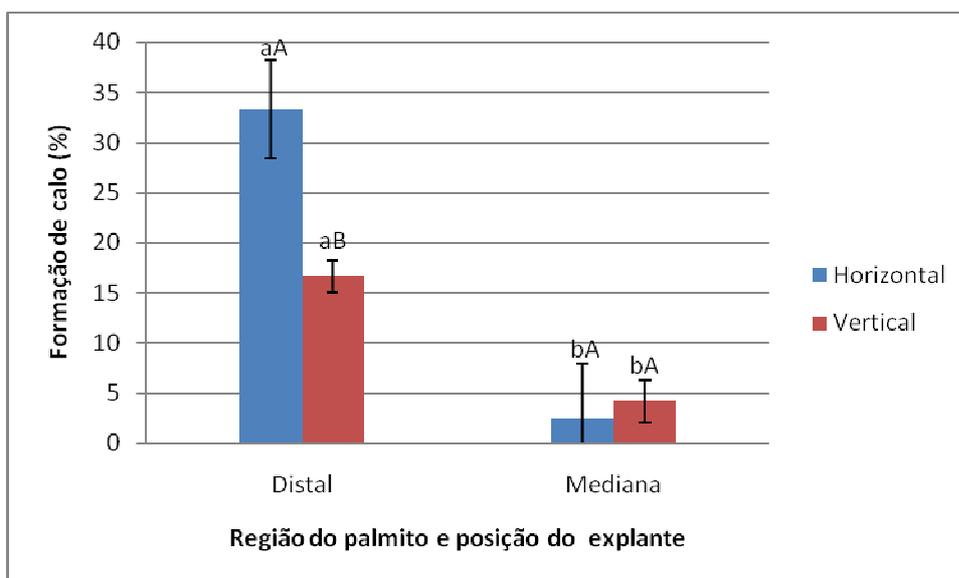


Figura 10. Porcentagem de formação de calos em explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) provenientes das regiões Distal e Mediana do palmito e posicionados horizontal (padrão) e verticalmente no meio de cultivo, aos 90 dias de cultivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as regiões do palmito e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre posicionamento dos explantes dentro de cada região, com relação ao posicionamento do explante, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

Aos 180 dias de indução de calos não foi verificada interação entre os tratamentos. No entanto, foram verificadas diferenças significativas para cada fator isolado. Quando avaliada a região do palmito utilizada como fonte de explante, foi verificado que a região Distal apresentou 25% de formação de calos maior que a região Mediana (Figura 11). Da mesma forma, quando os explantes foram mantidos na posição horizontal, houve 10% maior formação de calos que os explantes mantidos na posição vertical (Figura 12). Já a adição de 2,4-D combinado com o Picloram não foi favorável para formação de calos, pois o tratamento composto apenas por Picloram proporcionou maior formação de calos aos 180 de indução (Figura 13).

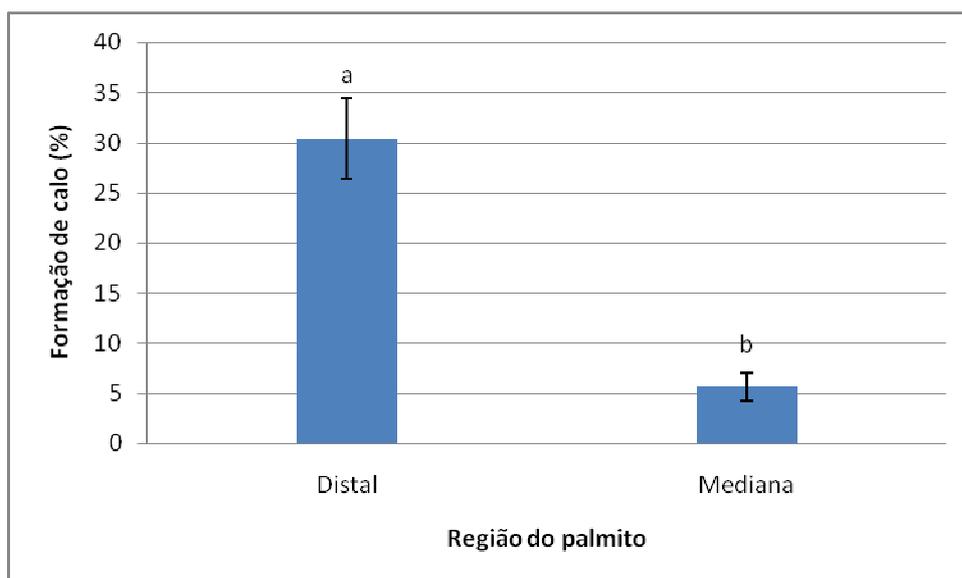


Figura 11. Porcentagem de formação de calos em explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) provenientes das regiões Distal e Mediana do palmito aos 180 dias em meio de indução de calos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

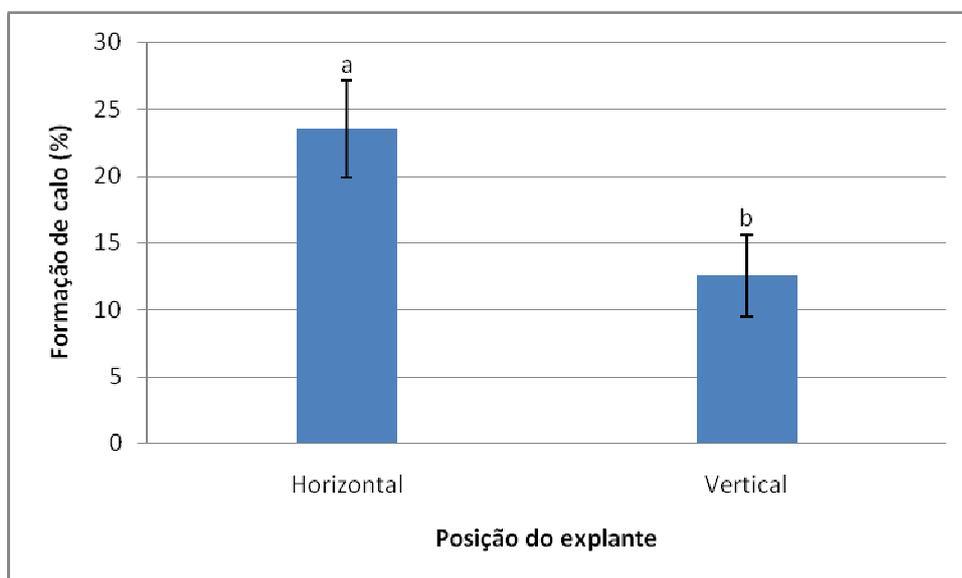


Figura 12. Porcentagem de formação de calos em explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) posicionados horizontal e verticalmente em meio de indução de calos aos 180 dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

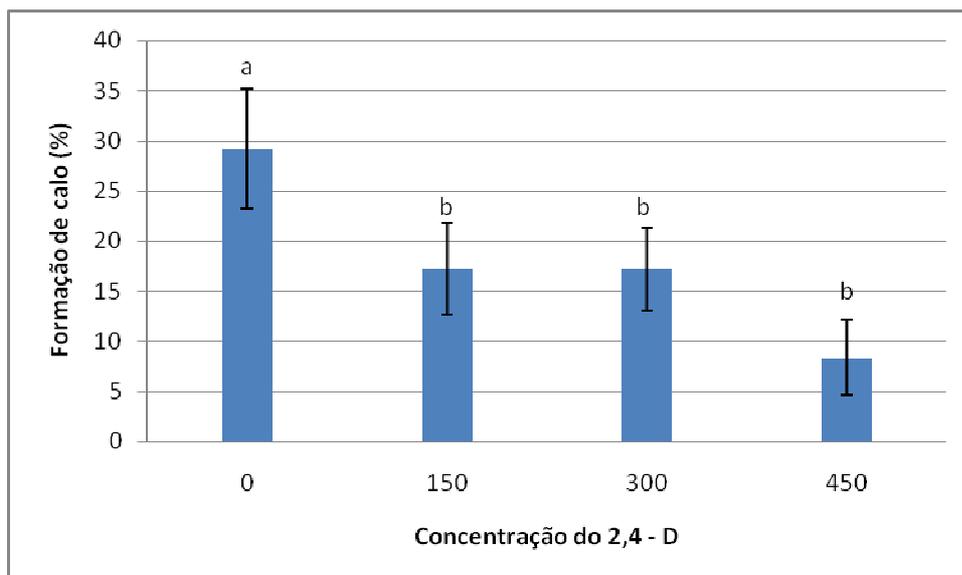


Figura 13. Porcentagem de formação de calos em explantes foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) sob efeito de diferentes concentrações da auxina 2,4-D aos 180 dias em meio de indução. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

### 3.1.3 Influência dos acessos durante a indução

Similar ao mencionado para os experimentos anteriores foi observado o início da resposta do explantes ao meio de cultura já aos 30 dias de cultivo, sendo perceptível presença de cristais nas bordas dos explantes, e, posteriormente, a formação de calos nestas regiões.

Durante a execução do experimento para avaliar a influência dos acessos na formação de calos, foram verificadas diferenças significativas entre os acessos testados, após 90 dias meio de indução com Picloram (Figura 14). Observou-se maior formação de calos nos explantes da região de Buriti Vermelho (13%), em comparação com Tiros (2,5%) e Carmo do Parnaíba (0,83%).

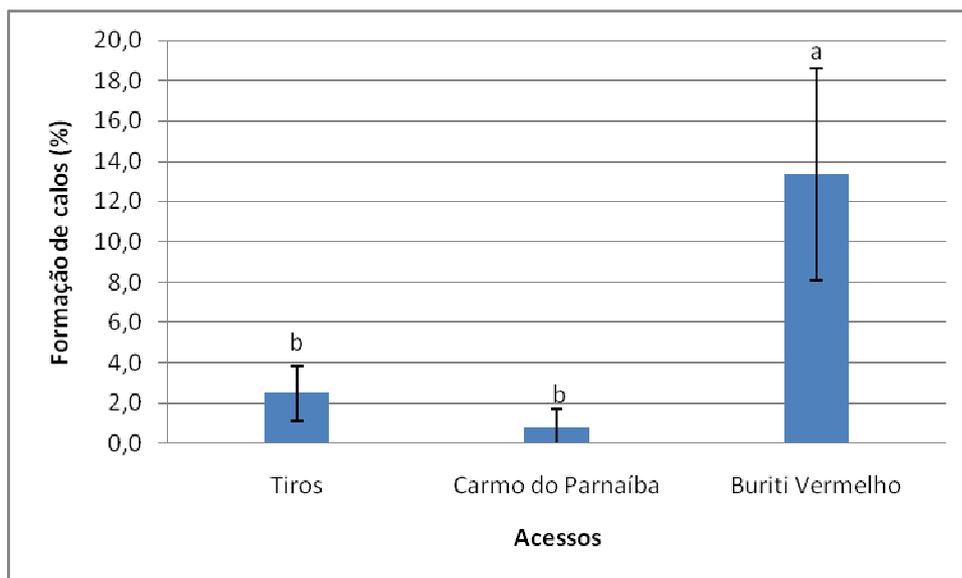


Figura 14. Porcentagem de formação de calos nos três acessos de *Acrocomia aculeata* testados sob efeito de Picloram. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

### 3.2 Multiplicação de calo

Durante a etapa de multiplicação, os calos embriogênicos (ver anatomia secção 4.4.1) obtidos durante a fase de indução foram separados dos explantes e mantidos em meio com a concentração de Picloram reduzida para 225  $\mu\text{M}$ . Nesta fase não foram verificadas diferenças quanto à adição das poliaminas Espermidina e Putrescina ao meio de cultivo. No entanto, foi constatado um aumento médio no peso de calos de 61,9% em 120 dias de multiplicação em todos os tratamentos. Nesta etapa, também foram verificadas diferenças morfológicas nos calos, além do aumento do peso do calo, sendo verificadas diferenças quanto à característica morfológicas e anatômicas destes. Alguns calos perderam a característica embriogênica e adquiriram características mucilaginosas, como pode ser visto na Figura 18 (tópico 3.4.2).

### 3.3 Diferenciação de embriões somáticos

Foram verificadas diferentes respostas durante a etapa de diferenciação, entre as quais a oxidação em grande parte dos calos embriogênicos logo na primeira semana de cultivo. No entanto, aqueles que sobreviveram mantiveram sua característica embriogênica (Figura 15). Além disso, no primeiro experimento foi observada a

formação de raízes a partir de calos cultivados sob efeito da auxina ANA associada com a citocinina BAP. Salienta-se ainda que não houve rediferenciação das massas calogênicas em embriões somáticos em nenhum dos tratamentos testados também no segundo experimento. Aqueles tratamentos que proporcionaram a manutenção das características embriogênicas e maior porcentagem de sobrevivência dos calos foram: ANA + 2iP (T2) e 2,4-D + BAP (T3).

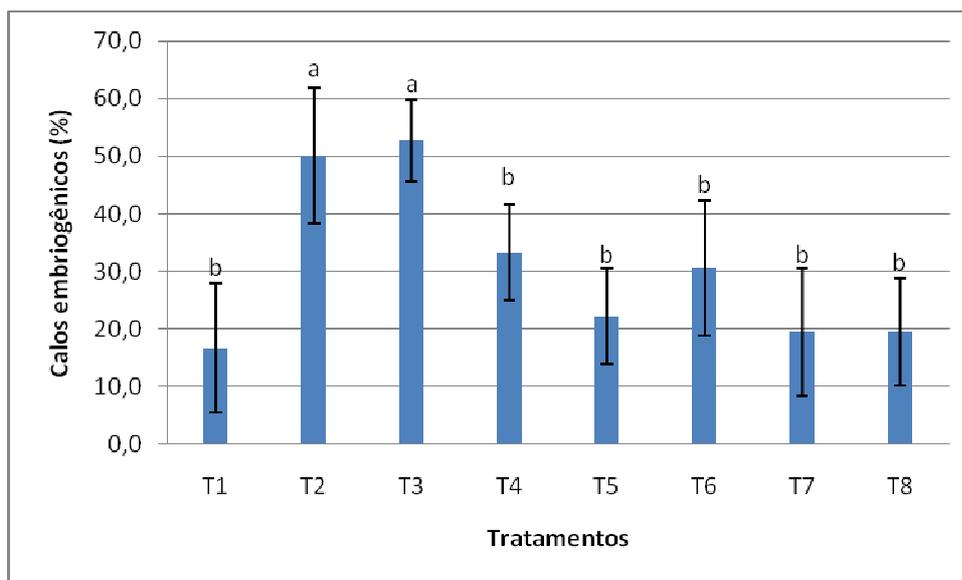


Figura 15. Porcentagem de sobrevivências de calos em meio de diferenciação de embriões somáticos, após 90 dias em meio de diferenciação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão. Tratamentos: ANA + BAP (T1), ANA + 2iP (T2), 2,4 - D + BAP (T3), 2,4 - D + 2iP (T4), Picloram + BAP (T5), Picloram + 2iP (T6), BAP (T7) e 2iP (T8).

### 3.4 Análise Anatômica

#### 3.4.1 Indução

Durante a fase de indução de calos foram verificadas diferenças anatômicas entre as regiões Mediana e Distal durante 0, 30 e 90 dias após inoculação (material oriundo do experimento 2.2.2) (Figura 16). Anatomicamente, algumas diferenças evidentes podem ser observadas entre as regiões foliares Mediana e Distal do palmito, imediatamente antes da inoculação *in vitro*. É possível perceber, por exemplo, no explante inicial da região mediana, células mais meristemáticas (menores e com núcleos

bem nítidos), além de feixes vasculares pouco desenvolvidos (Figura 16A). Tais características ratificam o menor grau de diferenciação dessa região. Já a região Distal, exibe além de um sistema vascular mais desenvolvido, células parenquimáticas mais diferenciadas (relação núcleo:citoplasma menor), com vacúolos bem maiores e visíveis (Figura 16D).

Aos 30 dias em meio de indução de calos, explantes da região Mediana apresentaram células maiores e intumescidas, porém sem sinais de proliferação celular (Figura 16B). Aos 90 dias de indução, explantes dessa região aparentemente entraram em colapso (Figura 16C).

Já explantes da região Distal, aos 30 dias em meio de indução de calos, apresentaram formação de calos na região central do feixe vascular de menor calibre, promovendo separação deste em duas partes (Figura 16E). Aos 90 dias em meio de indução, observou-se a formação de calos em diversos feixes vasculares de forma padronizada, sempre na região central do feixe e proliferando igualmente para ambos os lados (Figura 16F). As divisões celulares, de modo geral, foram visualizadas nas adjacências do xilema e floema dos feixes vasculares. Hipotetiza-se que essas divisões ocorreram a partir de um provável *pool* de células procambias (*stem cells*) localizado nas vizinhanças dos tecidos vasculares e/ou a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas (perivasculares e do sistema vascular). Para afirmação definitiva, investigações ontogênicas precoces e mais detalhadas devem ser realizadas.

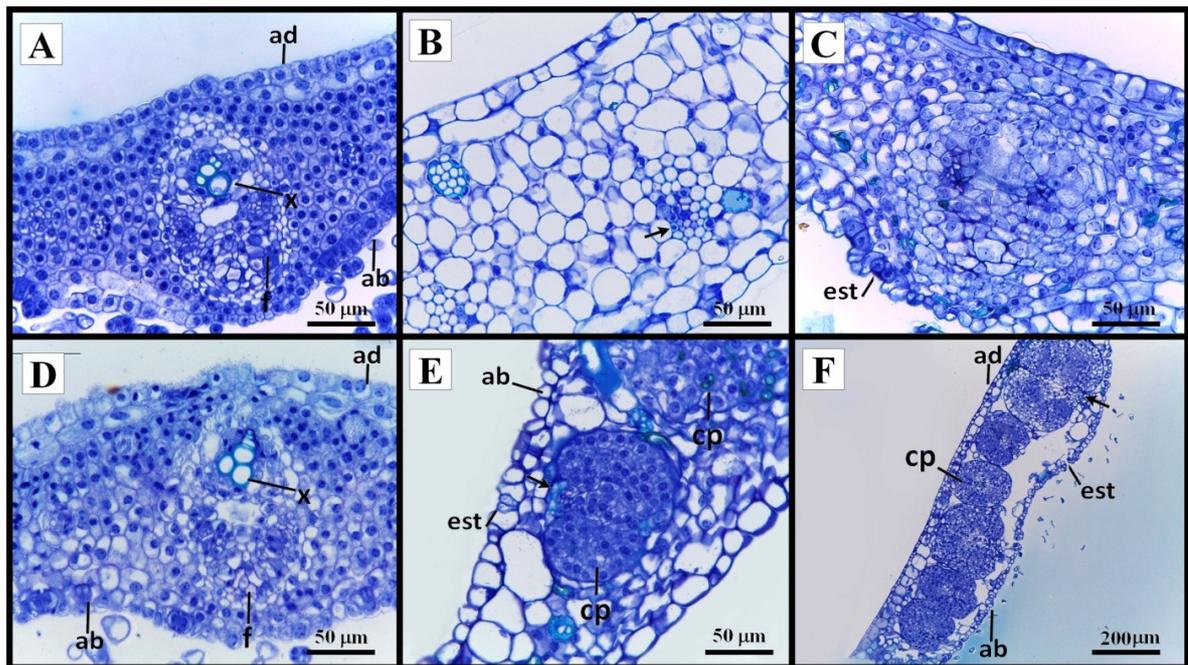


Figura 16. Caracterização anatômica de folhas imaturas de uma planta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) utilizadas como explantes iniciais na indução de calos e de calos formados após 30 e 90 dias em meio de indução. A: Explante inicial da região Mediana; B: Explante da região Mediana aos 30 dias; C: Explante da região Mediana aos 90 dias; D: Explante inicial da região Distal; E: Explante da região Distal aos 30 dias; F: Explante da região Distal aos 90 dias.

Durante a fase de indução de calos foi possível observar diferenças anatômicas entre os calos obtidos a partir do experimento de associação de Picloram com 2,4-D, embora fossem morfologicamente semelhantes (Figura 17). Os calos obtidos com a utilização apenas de 450 µM de Picloram (Figura 17A) apresentaram células com características embriogênicas menos evidentes, como células e vacúolos maiores (Figura 17B) e acúmulo de amido nas regiões em intensa divisão celular (Figura 17C). Já os calos obtidos com a utilização de Picloram associado a 150 µM de 2,4-D (Figura 17D) apresentaram características mais embriogênicas, como diâmetro reduzido, citoplasma denso, núcleos conspícuos e com vacúolos fragmentados, quando presentes. Verificaram-se também paredes celulares aparentemente mais espessas (Figura 17E) e acúmulo de amido na região central do calo (Figura 17F).

A utilização de 300 µM de 2,4-D proporcionou a formação de calos (Figura 17G) com células com características embriogênicas (Figura 17H), relação

núcleo:citoplasma alta, vacúolos menores, paredes aparentemente mais espessas e formato uniforme, além de acúmulo de amido em todo calo (Figura 17I). No entanto, calos obtidos com a concentração de 450  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Figura 17J) apresentaram células desuniformes, com grandes vacúolos, baixa relação núcleo:citoplasma (Figura 17K), ou seja, menos embriogênicas, além de menor acúmulo de amido (Figura 17L). É possível perceber um maior acúmulo de compostos fenólicos com o aumento da concentração de 2,4-D.

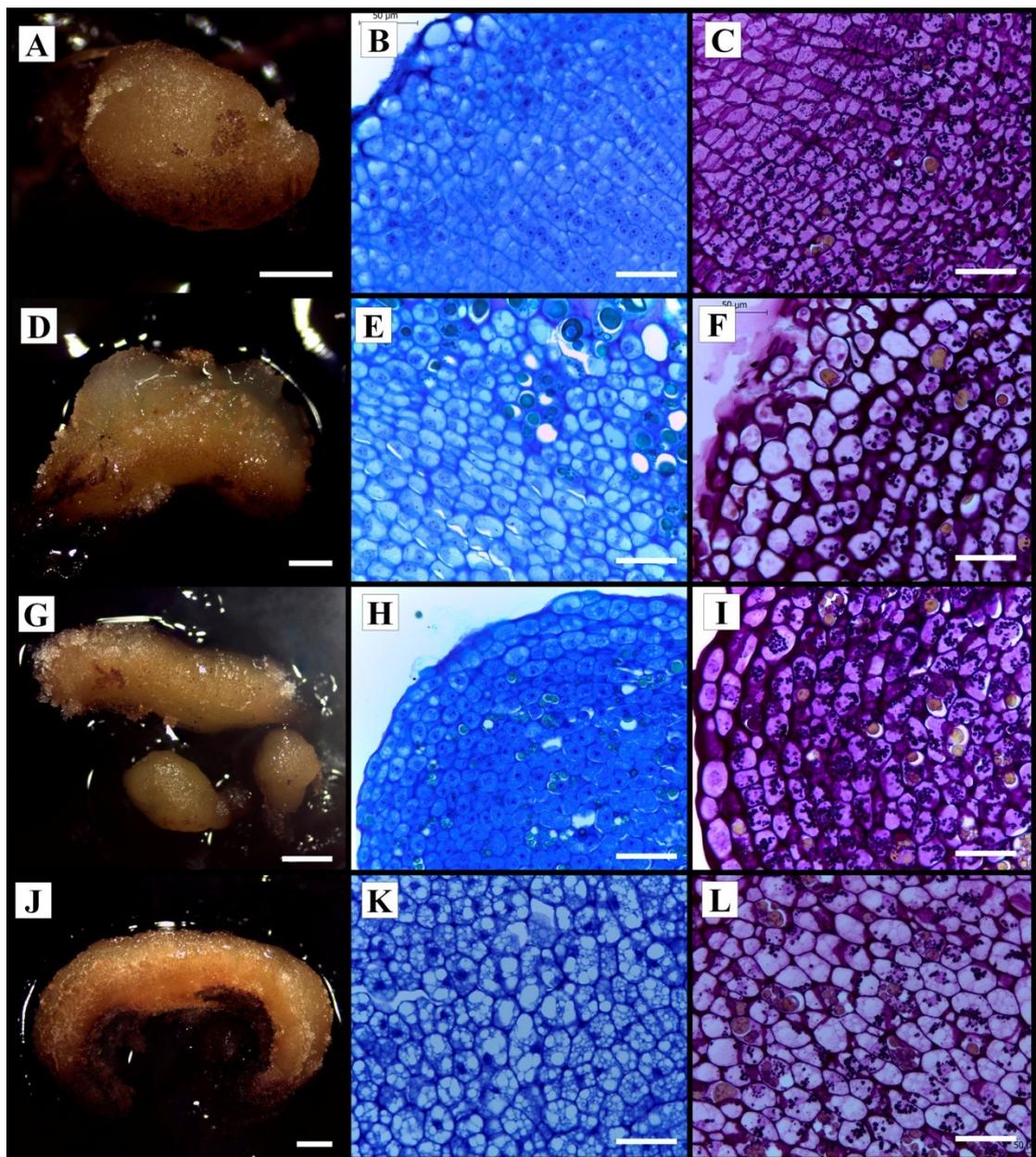


Figura 17. Análise anatômica e histoquímica (com *Periodic Acid Schiff* – PAS) de diferentes linhagens de calos obtidos a partir de tecidos foliares de macaúba (*Acrocomia*

*aculeata*) provenientes do cultivo sob diferentes concentrações de 2,4-D combinadas com 450  $\mu\text{M}$  de Picloram. A-C: Calo obtido somente com Picloram; D-F: Calo obtido com Picloram associado com 150  $\mu\text{M}$  2,4-D; G-I: Calo obtido com Picloram associado com 300  $\mu\text{M}$  2,4-D; J-L: Calo obtido com Picloram associado com 450  $\mu\text{M}$  2,4-D; Escalas: A, D, G, J: 1 mm; B, C, E, F, H, I, K, L: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.2 Multiplicação

Durante a fase de multiplicação de calos foram observadas diferenças anatômicas entre os calos multiplicados com a utilização das poliaminas Espermidina (Figura 18A) e Putrescina (Figura 18B). No geral, foi possível perceber uma perda de qualidade dos calos quando mantidos por muito tempo nas condições testadas, perdendo a qualidade embriogênica. No entanto, ainda foi constatado que calos em meio com Espermidina foram caracterizadas pela presença de uma zona periférica, contendo células com características meristemáticas (células pequenas, com citoplasma denso, núcleos volumosos, nucléolos evidentes, vacúolos fragmentados e intensa divisão celular) em intensa divisão celular, e por uma zona mais interna, compreendendo células parenquimáticas com vacuolização variável (Figura 18C). Diferentemente, calos obtidos em meio com Putrescina exibiam ampla zona interna formada por células com características meristemáticas e uma zona periférica composta por células com características parenquimáticas (altamente vacuoladas) (Figura 18D). Os dois tipos de calo apresentaram pouco acúmulo de amido, com eventuais compostos fenólicos (Figura 18E e F).

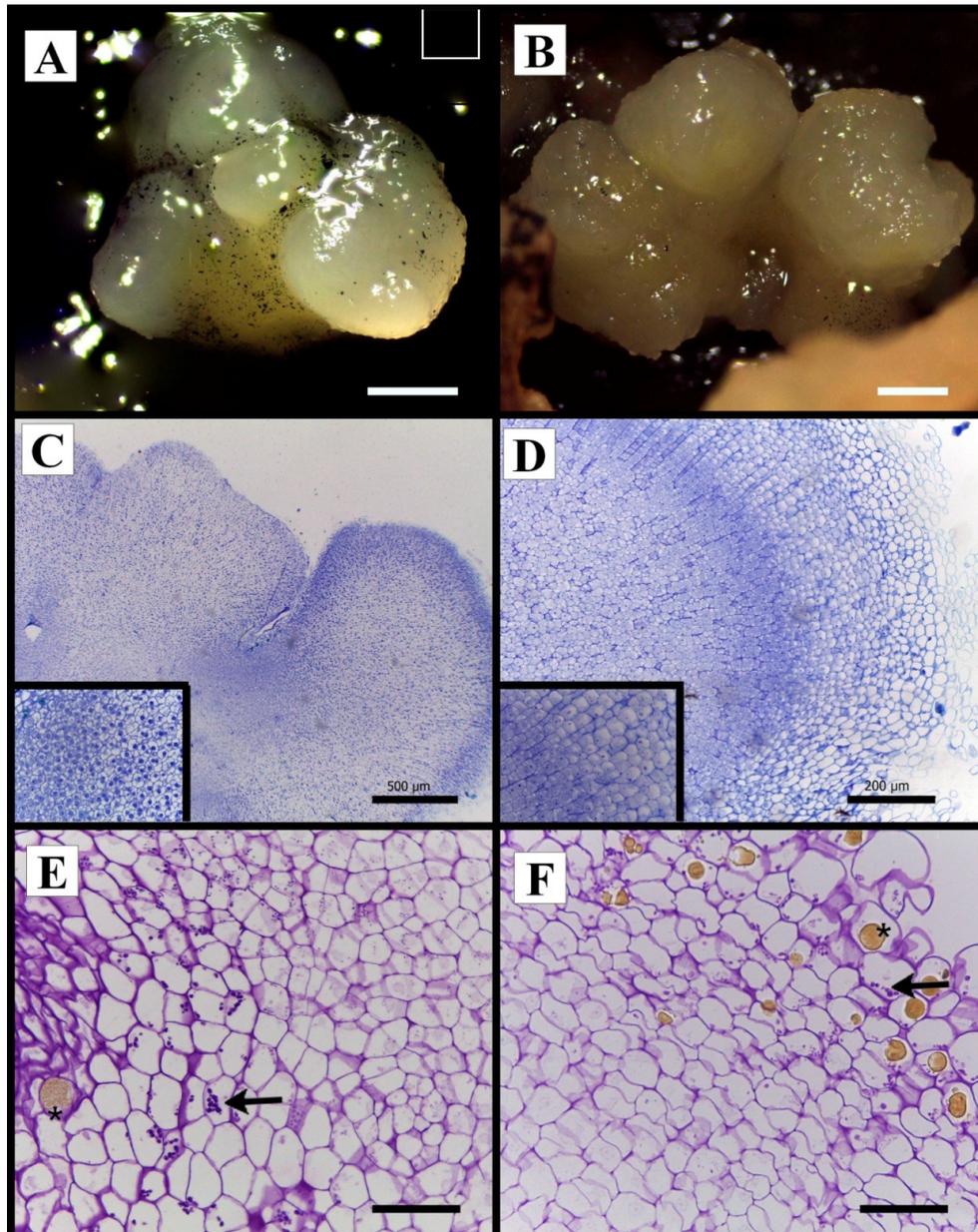


Figura 18. Análise anatômica e histoquímica (com *Periodic Acid Schiff* – PAS) de diferentes linhagens de calos obtidos a partir de tecidos foliares de macaúba (*Acrocomia aculeata*) cultivados sob efeito de Espermidina ou Putrescina durante a etapa de multiplicação. A: Calos obtidos em meio de multiplicação com Espermidina; B: Calos obtidos em meio de multiplicação com Putrescina; C: Corte anatômico de calos obtidos em meio de multiplicação com Espermidina; D: Corte anatômico de calos obtidos em meio de multiplicação com Putrescina; E: Corte anatômico de calos obtidos em meio de multiplicação com Espermidina apresentando acúmulo de grãos de amido (seta); notar composto fenólico (\*). F: Corte anatômico de calos obtidos em meio de multiplicação com Putrescina apresentando acúmulo de grãos de amido; (seta); notar composto fenólico (\*). Escalas: A e B: 1 mm; C: 500 µm; D: 200 µm; E e F: 50 µm.

### 3.4.3 Diferenciação

Durante o primeiro experimento de diferenciação de calos embriogênicos em embriões somáticos foi possível observar, diferente do esperado, organogênese caracterizada pela formação de raiz a partir de calos cultivados em meio contendo a auxina ANA associada com a citocinina BAP (Figura 19A). Isto é comprovado pelo corte anatômico, onde é possível observar a formação do feixe vascular (Figura 19B). Ainda é possível observar a formação de calo nessa região (Figura 19C), o que ratifica a participação de células provasculares na formação de calos e pequeno acúmulo de amido próximo a formação do calo (Figura 19 D e E).

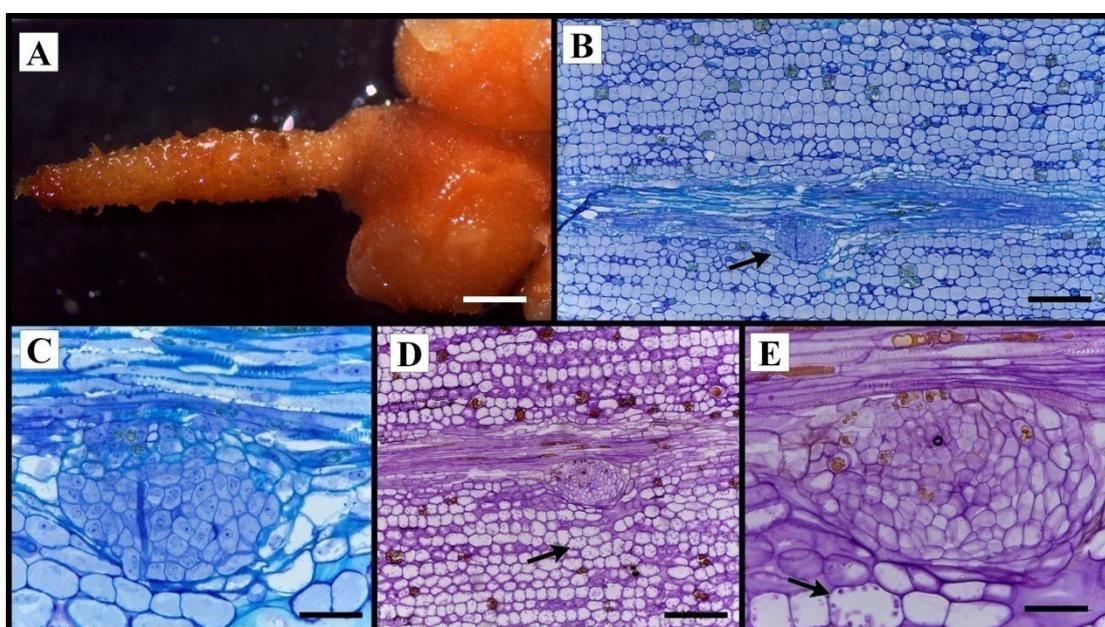


Figura 19. Análise anatômica e histoquímica (com *Periodic Acid Schiff* – PAS) de um calo com raiz obtido a partir de tecido foliar de macaúba (*Acrocomia aculeata*) cultivado sob efeito de ANA e BAP (fase de diferenciação). A: Calo apresentando raiz e cor alaranjada; B, C: Corte anatômico da raiz apresentando formação de calo; D, E: Acúmulo de grãos de amido na adjacência de calo formado a partir de células vasculares da raiz. Escalas: A: 2 mm; B e D: 200  $\mu$ m; C e E: 50  $\mu$ m.

Durante o segundo experimento, os calos mantidos em diferentes combinações de auxinas e citocininas apresentaram diferenças morfoanatômicas observados com azul de toluidina (Figura 20 e Figura 21) após 90 dias de cultivo. Ao utilizar o corante PAS para análise histoquímica do acúmulo de amido, nenhum dos tratamentos apresentou o acúmulo deste composto; portanto, esse dado não é mostrado aqui. Além disso, é

possível observar maiores diferenças entre os tratamentos em parâmetros como espessura da parede celular, núcleo evidente ou não, e tamanho e número de vacúolo.

Os tratamentos para diferenciação T1 (ANA + BAP, Figura 20 A, B e C), T3 (2,4-D + BAP, Figura 20 G, H e I), T7 (BAP, Figura 21 G, H e I) e T8 (2iP, Figura 21 J, K e L) apresentaram perfis celulares semelhantes. Nestes tratamentos é possível observar células com único vacúolo que preenche toda célula e células com diversos grandes vacúolos subdivididos. Além disso, é possível observar que estas células apresentaram núcleo e nucléolo bem evidente e parede celular espessa.

É possível observar que o calo do tratamento T2 (ANA + 2iP, Figura 20 D e E) apresentou certa padronização, onde aparentemente as células apresentam diferenciação em tecidos procambiais (Figura 20F). Estas células são caracterizadas por células mais alongadas e distribuídas de forma uniforme no calo.

No tratamento T4 (2,4-D + 2iP, Figura 20 J, K e L) é possível observar células menores e citoplasma menos denso, além de núcleo e vacúolo pouco evidente quando comparado aos outros tratamentos.

Os tratamentos T5 (Picloram + BAP, Figura 21 A, B e C) e T6 (Picloram + 2iP, Figura 21 D, E e F) evidenciaram células com maior relação núcleo/citoplasma, diversos vacúolos menores e bem evidentes.

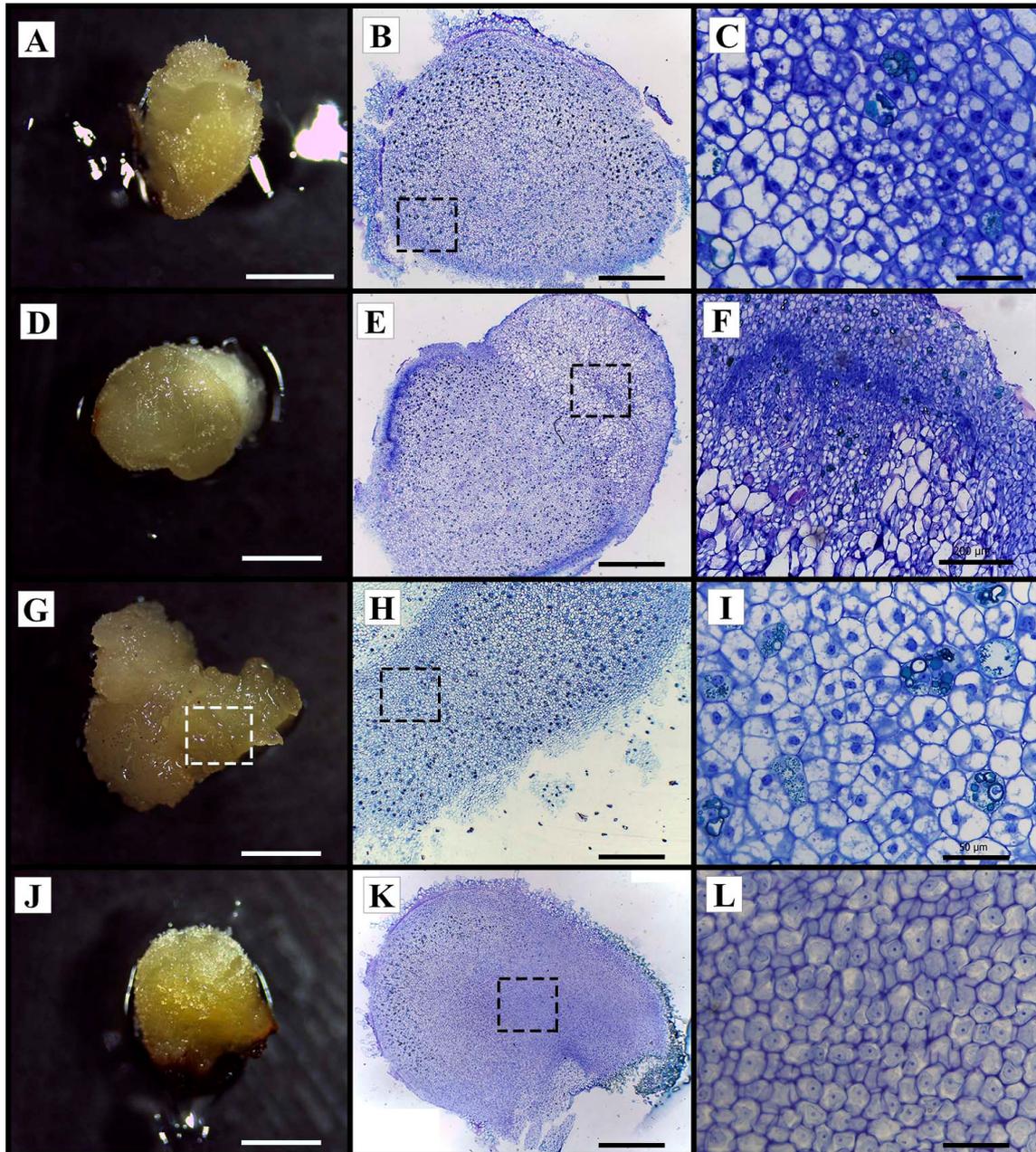


Figura 20 Análise anatômica de calos de *Acrocomia aculeata* obtidos na etapa de diferenciação de embriões somáticos aos 90 dias em meio de cultivo com diferentes combinações de auxinas e citocininas tratamentos de T1 a T4. A: Calo obtido em ANA + BAP (T1), B e C: Corte anatômico de T1, D: Calo obtido em ANA + 2iP (T2), E e F: Corte anatômico de T2; G: Calo obtido em 2,4-D + BAP (T3), H e I: Corte anatômico de T3; J: Calo obtido em 2,4-D + 2iP (T4), K e L: Corte anatômico de T4. Escalas A, D, G, J: 2mm; B, E, H, K: 500 µm F: 200µm; C, I, L: 50µm

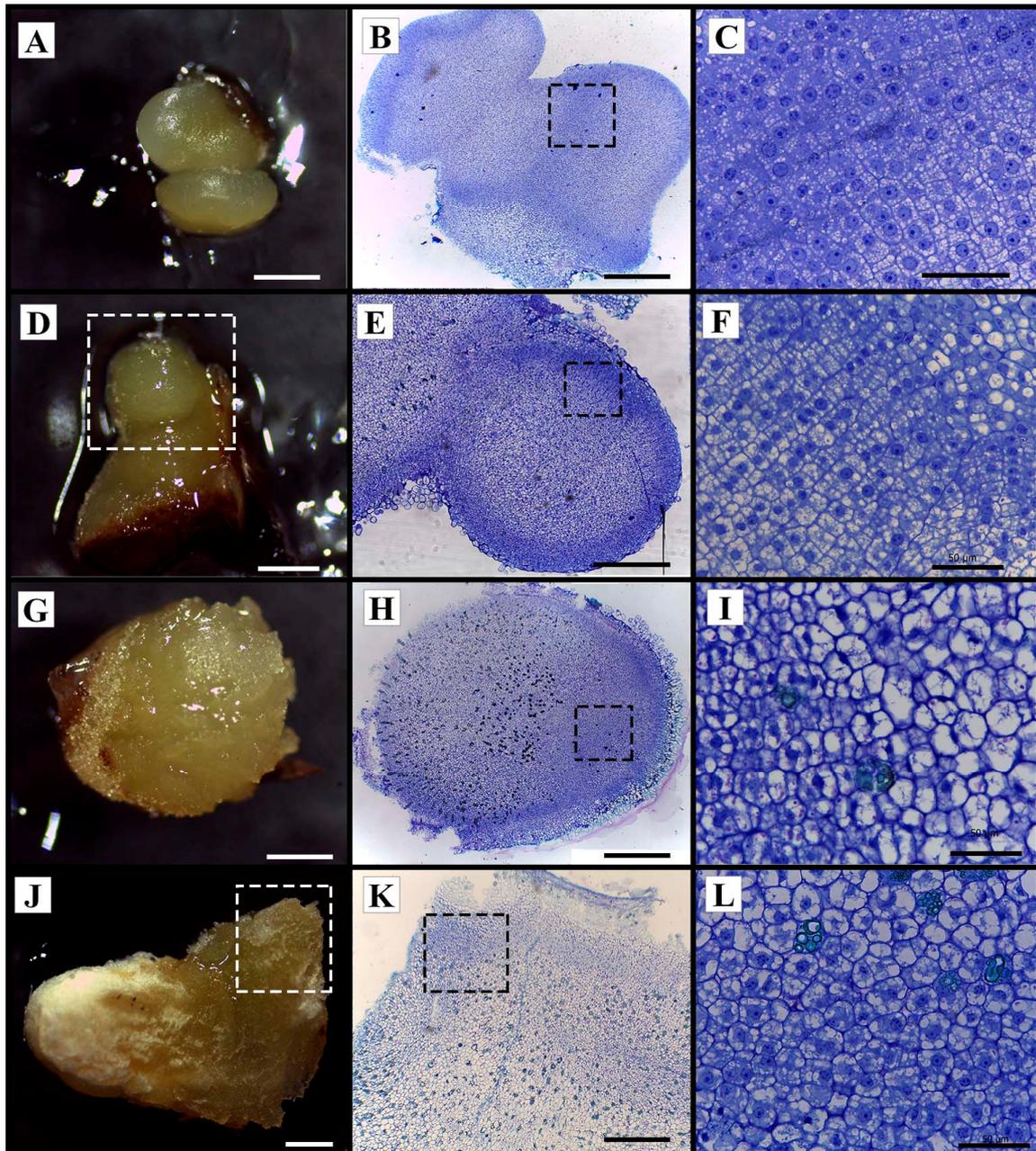


Figura 21 Análise anatômica de calos de *Acrocomia aculeata* obtidos na etapa de diferenciação de embriões somáticos aos 90 dias em meio de cultivo com diferentes combinações de auxinas e citocininas tratamentos de T5 a T8 A: Calo obtido em Picloram + BAP (T5), B e C: Corte anatômico de T5, D: Calo obtido em Picloram + 2iP (T6), E e F: Corte anatômico de T6; G: Calo obtido em BAP (T7), H e I: Corte anatômico de T7, J: Calo obtido em 2iP (T8), K e L: Corte anatômico de T8. Escalas A, D, G, J: 1 mm; B, E, H, K: 500  $\mu$ m; C, F, I, L: 50 $\mu$ m

### 3.5 Análise bioquímica

#### 3.5.1 Açúcares solúveis totais

Os resultados referentes aos teores de açúcares solúveis totais (AST) em razão do tempo de indução da embriogênese em folhas imaturas de três acessos de *Acrocomia aculeata* são apresentados na Figura 22. Observou-se que não houve diferenças significativas entre os acessos durante o período de indução de calos (120 dias). No entanto, é possível notar diferenças significativas imediatamente antes do estabelecimento da indução de calos (0 dias), onde o acesso de Buriti Vermelho apresentou menor quantidade de AST por miligrama de matéria seca (121,2 µg/mg MS) comparativamente aos acessos de Tiros (219,8 µg/mg MS) e Carmo do Parnaíba (192,7 µg/mg MS).

Além disso, é possível observar diferenças significativas nos teores de açúcares solúveis totais nos tipos de calos obtidos, sendo que o calo nodular apresentou 212,6 µg.mg<sup>-1</sup> de matéria seca em relação ao calo alongado que exibiu 111,5 µg/mg MS (Figura 23).

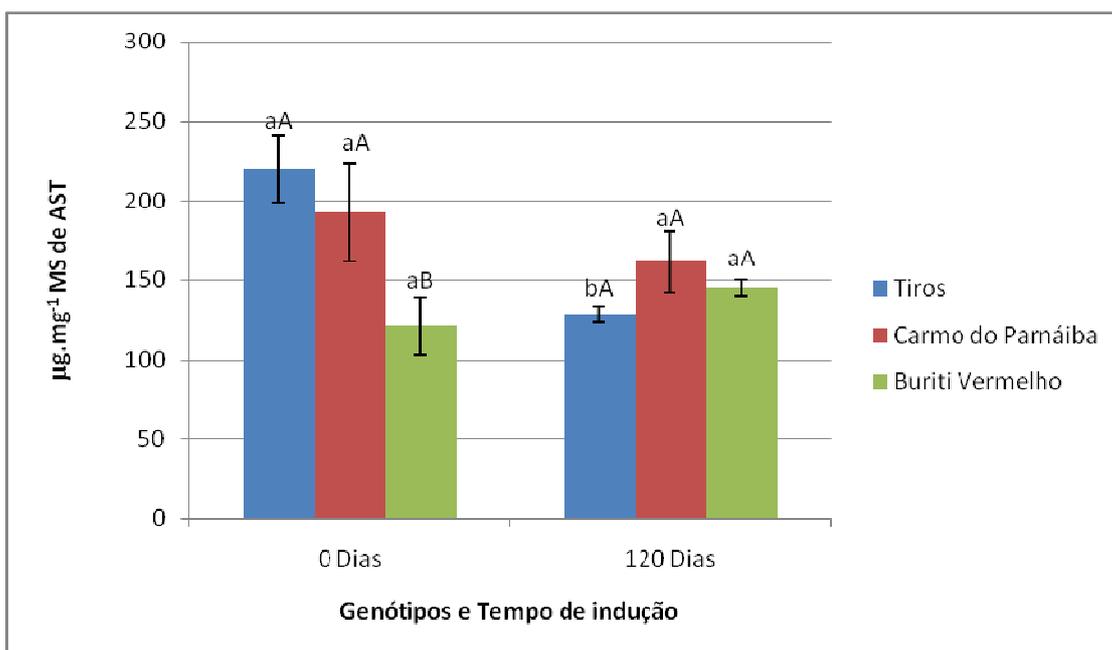


Figura 22. Teores de açúcares solúveis totais (AST) em explantes foliares imaturos de três acessos de *Acrocomia aculeata* testados na indução de calos visando a embriogênese somática, aos 0 dias (imediatamente antes da inoculação *in vitro*) e 120 dias após o estabelecimento do cultivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos, dentro de cada acesso e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os acessos dentro de cada tempo de avaliação, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

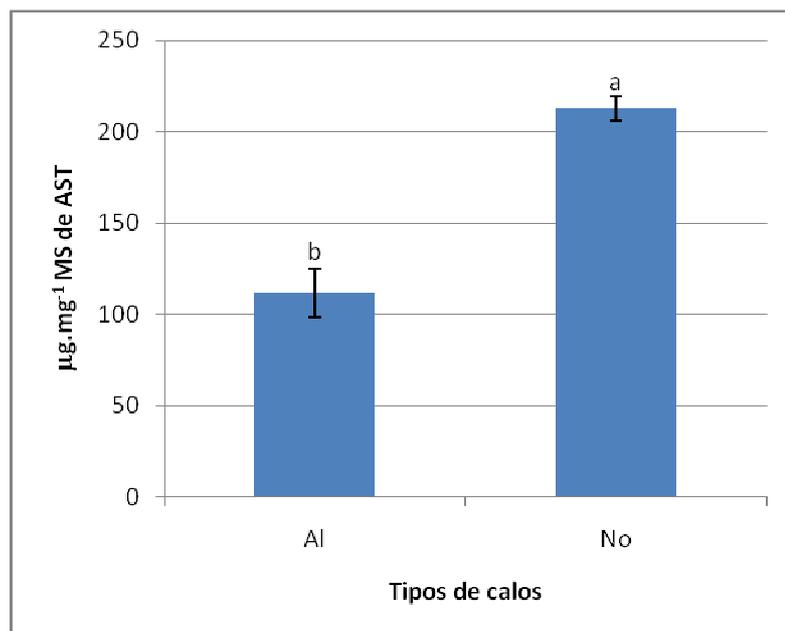


Figura 23. Teores de açúcares solúveis totais (AST) em calos alongados (Al) e nodulares (No) provenientes de explantes foliares imaturos de *Acrocomia aculeata* usados na indução da calogênese visando a embriogênese somática. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

### 3.5.2 Amido

Os resultados referentes aos teores de amido na indução de calos em três acessos de *Acrocomia aculeata* estão apresentados na Tabela 3. É possível observar diferenças apenas nas coletas dos palmitos utilizados no início da indução de calos, sendo que após o período de 120 dias de indução de calos as porcentagens deste composto se estabilizaram. Foi observado também que não houve diferenças significativas para teores deste composto nos calos, apresentando médias de  $43,09 \pm 5,14$  µg/mg MS para calos alongados e  $38,86 \pm 9,59$  µg/mg MS para calos nodulares.

Tabela 3 Teores de amido em explantes foliares na indução de calos em duas coletas dos três acessos de *Acrocomia aculeata* testados.

Acessos	Dia Inicial		120 Dias de indução	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
Tiros	5,2±2,1 bA	28,9±10,6 bA	36,8±7,0 aA	31,2±3,8 bA
Carmo do Parnaíba	50,2±2,7 aA	5,8±2,3 bB	24,6±9,3 aB	16,7±2,9 bB
Buriti Vermelho	39,8±2,2 aA	64,0±20,2 aA	57,0±15,9 aA	64,7±0,7 aA

Médias de letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre diferentes acessos dentro de cada tempo e médias seguidas por letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre tempo dentro de cada genótipo e pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

### 3.5.3 Proteínas totais

Os resultados referentes aos teores de proteínas totais em razão do tempo de indução da embriogênese em folhas imaturas de três acessos de *Acrocomia aculeata* são apresentados na Tabela 4. É possível observar que os teores de proteínas totais são maiores em todos os acessos das duas coletas no tempo inicial, em comparação aos 120 dias de indução; ou seja, os palmitos apresentavam teores maiores antes do contato com meio de cultura para indução de calos. Os valores variaram de 45,3 a 115,7 µg/mg MS.

Também é possível perceber diferenças significativas entre os tipos de calos obtidos durante a indução, sendo que o calo nodular apresentou 50,4 µg/mg MS e o calo alongado 8,03 µg/mg MS (Figura 24).

Tabela 4 Teores de Proteína totais na indução de calos em duas coletas dos três acessos de *Acrocomia aculeata* durante o tempo de indução

Acessos	Dia Inicial		120 dias de indução	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
Tiros	74,0±6,7cA	45,3±7,0bB	14,6±1,0aC	16,6±1,5aC
Carmo do Parnaíba	115,7±9,6aA	82,6±4,5aB	14,5±1,1aC	5,5±0,6aC
Buriti Vermelho	97,9±3,9bA	92,3±0,9aA	15,7±1,0aB	11,0±0,3aB

Médias de letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre diferentes acessos dentro de cada tempo e médias de letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre tempo dentro de cada genótipo pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância

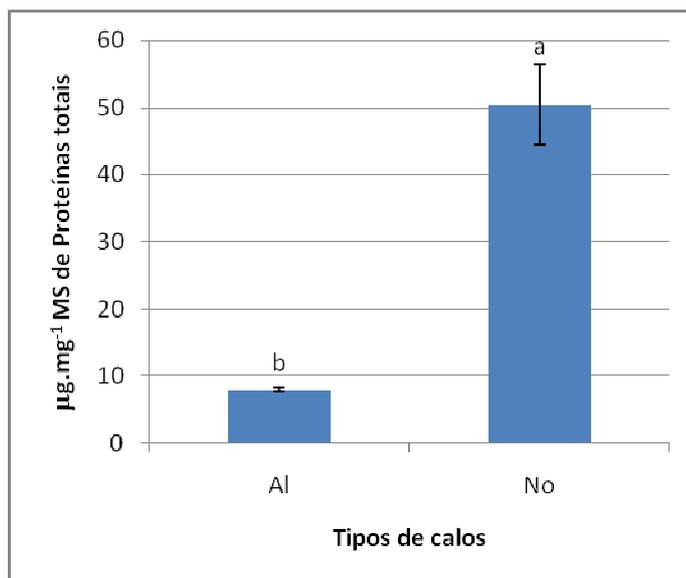


Figura 24. Teores de proteínas totais em calos Alongados (Al) e Nodulares (No) de explantes foliares imaturos de *Acrocomia aculeata*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

## 4 Discussão

### 4.1 Indução de calos

#### 4.1.1 Região do palmito

Nesse estudo, a região do palmito mais responsiva em termos de formação de calos variou em função dos demais fatores testados em conjunto. No experimento abordado no tópico 3.2.1, a região Mediana e Proximal, quando seccionadas, se sobressairam, ao passo que no experimento abordado no tópico 3.2.2, a região Mediana se destacou com taxa de 58% de calos formados quando inoculada verticalmente em meio de indução de calos sob efeito de 450 µM de Picloram. Nesse segundo experimento, as regiões Apical e Mediana, sob efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e inoculadas horizontalmente no meio, foram igualmente eficientes na formação de calos. Essa variabilidade dos resultados obtidos ratifica a complexidade dos eventos envolvidos na formação de calos a partir de tecidos foliares provenientes de plantas adultas, bem como, o caráter multifatorial do processo e reforçam a necessidade de estudos mais detalhados.

Estudos anteriores apresentaram resultados superiores com relação à resposta de indução de calos a partir de explantes foliares oriundos da região Distal (Meira et al. 2019b, *in press*). Portanto é possível manter a região Proximal e, conseqüentemente, o meristema na planta. Dessa forma, a planta tem a possibilidade de rebrotar, reduzindo as chances de morte do genótipo fornecedor do palmito.

A diferença de resposta de indução de calos nas diferentes regiões do palmito foi observada por outros autores. Ao avaliar a indução de calos em diferentes regiões do palmito de macaúba, Luis (2013) verificou que a região mais distal ao meristema é a mais responsiva (93% de formação de calos), principalmente, quando cultivada em meio Y3 suplementado com Picloram. Assim como observado por Gueye et al. (2009a) com tamareira (*Phoenix dactylifera*), a região mais distal ao meristema apresentaram melhores respostas quanto à formação de calos em relação à região mais basal.

Mais recentemente, Silva-Cardoso (2018) verificou que a região distal do palmito de *Syagrus oleracea* exibiu percentual superior de formação de calos que as demais regiões testadas (Mediana e Proximal) quando inoculada em meio MS, relatando até 84,4% de formação de calos. Essa autora aponta como uma possível explicação para o sucesso em termos de responsividade (formação de calos) dessa região, a presença de tecidos vasculares mais desenvolvidos, sobretudo, floema. Conforme Silva-Cardoso (2018), floema mais diferenciado, teoricamente, favoreceria o transporte de auxinas endógenas e exógenas. Essa hipótese é sugestiva pelo fato do floema ser considerado a mais rápida rota de transporte de AIA (Goldsmith et al. 1974; Grones and Friml 2015).

O maior aporte de auxina na região distal do palmito, seja pela exposição exógena de auxina indutora, juntamente com uma maior concentração de auxina endógena no floema mais diferenciado, de acordo com Silva-Cardoso (2018), poderia estimular a formação de calos a partir das divisões de células procambiais pré-existentes nas vizinhanças dos tecidos vasculares e/ou a desdiferenciação de células parenquimáticas, resultando na formação de calos primários.

Ho e Vasil (1983) também constataram maior divisão celular em explantes foliares de *Saccharum officinarum* que apresentavam tecidos vasculares com maior grau de diferenciação. Por outro lado, resultados observados em macaúba por Padilha et al. (2015) mostraram que a região meristemática e basal de plantas germinadas *in vitro* usadas como explantes iniciais proporcionaram aumentos significativos na formação de calos primários, quando associados ao Picloram.

Nesse trabalho, em meio a variabilidade dos resultados obtidos em função das diversas interações com outros fatores influenciadores do processo de formação de calos, a região Mediana proporcionou resultados, de modo geral, satisfatórios em termos de calogênese. Essa região, em termos anatômicos, apresenta características intermediárias entre as regiões Proximal e Distal, ou seja, não é totalmente diferenciando, nem totalmente indiferenciada. Essa constatação corrobora com o relatado por Gueye et al. (2009a) em *P. dactylifera*. Esses autores afirmam que a capacidade de formação de calos varia em função do grau de diferenciação do explante foliar, com destaque para aqueles nem totalmente diferenciados, nem insuficientemente diferenciados.

Diante do exposto, acredita-se que não somente o grau de diferenciação dos tecidos governa o processo de formação de calos. Isso é ratificado pelos relatos divergentes dos autores supracitados quanto a influência do grau de diferenciação de tecidos no processo de desdiferenciação celular e consequente produção de calos. Gueye et al. (2009a) chamam atenção para o fato de que as respostas às auxinas exógenas indutoras da calogênese não dependem somente do estado de diferenciação dos explantes, mas também dos níveis endógenos de auxina e da fisiologia inicial.

Como relatado por Roberts (1989) e Stasolla e Yeung (2003), diferentes tipos de tecidos em uma mesma planta ou o mesmo tecido em vários estádios de desenvolvimento podem apresentar respostas diferentes em condições *in vitro*. Além disso, o nível de auxina endógeno dos explantes é provavelmente um dos fatores que influenciam de alguma forma as respostas *in vitro* (Wang et al. 2011). Vários autores, inclusive trabalhando com palmeiras, como *P. dactylifera* (Gueye et al. 2009) e *Bactris gasipaes* (Nascimento-Gavioli et al. 2017), têm observado correlação positiva entre concentrações mais altas de auxina endógena com a iniciação do processo embriogênico.

#### 4.1.2 Posição e seccionamento do explante

Segundo Wang et al. (2011), a orientação dos explantes é provavelmente um dos fatores que influenciam de alguma forma as respostas *in vitro*. No presente trabalho, foram observadas diferenças significativas entre as posições testadas dos explantes quanto às repostas ao meio de indução de calos. Os explantes mantidos na posição horizontal (padrão), principalmente, quando oriundos da região Distal do palmito,

apresentaram maior formação de calos do que aqueles mantidos em posição vertical. Provavelmente, isso se deve ao maior contato com os componentes do meio de cultura, proporcionado pelo posicionamento horizontal. Resultado semelhante foi relatado por Silva-Cardoso (2018) em *S. oleracea*.

Além disso, foram observadas diferenças quanto à produção de calos dos explantes seccionados de forma semelhante a uma “cortina” e assim denominado nesse trabalho, comparativamente àqueles não seccionados ou padrão. Este tipo de explante apresentou resposta inicial ao meio de cultura (calogênese) superior ao explante do tipo padrão, o que provavelmente está associado com o aumento da superfície de contato do explante com o meio de cultivo. Além de maior indução de calos nos primeiros dias, estes explantes apresentaram maior taxa de oxidação, o que é previsível devido ao dano mecânico ocasionado.

O aumento da superfície de contato de tecidos foliares seccionados é descrito por outros autores, mediante a utilização da técnica de *TCL (Thin Cell Layer)* por Scherwinski-Pereira et al. (2010) e Padilha et al. (2015) em *E. guineensis* e *A. aculeata*, respectivamente.

Ressalta-se também que a exposição de explantes feridos às condições de cultivo *in vitro*, como às altas concentrações de reguladores de crescimento, promove alto nível de estresse celular (Silva-Cardoso 2018), o que pode desencadear o processo de embriogênese somática, dada a influência de diferentes estresses na indução dessa via (Fehér 2015; Nic-Can et al. 2015). Smith e Krikorian (1989) também salientam o fato de que o próprio estresse proporcionado pelo corte do explante pode ser suficiente para iniciar a embriogênese somática.

Quanto à alta taxa de oxidação observada em explantes seccionados, é comum após a transferência dos tecidos vegetais para condições *in vitro*, a ocorrência de oxidação devido a liberação de compostos fenólicos. Os ferimentos do explante promovem o rompimento dos compartimentos celulares e mistura dos seus conteúdos e pronta exposição dos compostos fenólicos ao ar e às diferentes enzimas que participam do processo oxidativo (Laukkanen et al. 1999). Além do mais, a exposição às altas concentrações de reguladores de crescimento também pode aumentar a formação de compostos fenólicos (North et al. 2012).

O acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação em torno da superfície excisada é relatado por Andrade et al. (2000) e Van Winkle et al. (2003) como fator responsável

por modificar a composição do meio de cultivo e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes pelos explantes. Estas substâncias tóxicas produzidas normalmente inibem o crescimento dos explantes ocasionando, não raramente, até a morte dos mesmos (Sato et al. 2001; Costa et al. 2006). É importante mencionar que devido à realização de subcultivos constantes e o uso de carvão ativado os níveis de oxidação se mantiveram toleráveis.

Salienta-se, todavia, que nem toda oxidação demonstra ser prejudicial. Altas concentrações de ROS (*Reactive Oxygen Species*) podem ser tóxicas, levando a danos oxidativos. Contudo, em concentrações apropriadas, estas espécies reativas também atuam como moléculas de sinalização que regulam muitas respostas fisiológicas e de desenvolvimento (Karami e Saidi 2010; Swanson e Gilroy 2010).

#### 4.1.3 Associação de auxinas

Foram observadas diferenças significativas durante o experimento de associação do Picloram com 2,4-D no meio de cultura para a indução de calos. A associação destas auxinas não foi favorável a formação de calos, sendo que os explantes sob efeito apenas da auxina Picloram apresentaram maior formação de calos, inclusive com características anatômicas embriogênicas (ver secção 3.4.1), como previamente constatado por Meira et al. (2019, *in press*).

Apesar do 2,4-D se destacar como indutor de calos visando a embriogênese somática em palmeiras (Saleh e Scherwinski-Pereira 2016), outras auxinas, como o Picloram, tem ganhado o cenário da iniciação da embriogênese somática em diferentes palmeiras (Steinmacher et al. 2007b; Pádua et al. 2013; Luis and Scherwinski-Pereira 2014; Padilha et al. 2015; Mazri et al. 2017). Alguns poucos trabalhos têm combinado auxinas, como o realizado aqui, dentre os quais se citam Yusnita e Hapsoro (2011) e Jayanthi et al. (2015), ambos em *E. guineensis*. No entanto, foram observadas diferenças anatômicas entre os tratamentos testados. Foi observado que as células dos calos obtidos com a associação de Picloram com 2,4-D apresentavam maiores características embriogênicas.

Verdeil et al. (2001) relata que foram obtidos calos embriogênicos ao passar os calos primários obtidos a partir de inflorescência imatura de *Cocos nucifera* para meio com aumento da concentração de 2,4-D. Estes calos apresentavam características como: uma alta relação núcleo:citoplasma, um núcleo central aumentado com um único

nucléolo proeminente, densamente corado e pequenos vacúolos, além de cercados por uma parede externa espessada.

#### 4.1.4 Acessos

Durante a fase de indução foram verificadas diferenças significativas entre os acessos testados, sendo que o acesso de Buriti Vermelho apresentou notavelmente maior formação de calos e em menor tempo, diferente dos outros acessos de Tiros – MG e Carmo do Parnaíba - MG que apresentaram respostas semelhantes.

Diversos outros autores relatam diferenças durante a embriogênese somática entre genótipos testados (Shoeb et al. 2001; Andrea et al. 2008; Raza et al. 2010; de Carvalho Silva et al. 2012; Satish et al. 2016). Em *E. guineensis*, de Carvalho Silva et al. (2012) relatam diferenças de 90 a 100% de formação de calo quando comparados diferentes genótipos. Essas diferenças alertam para a necessidade de otimização contínua dos protocolos e, de acordo com Mozgová et al. (2017), evidenciam a necessidade de compreensão mais detalhada das barreiras moleculares que previnem a embriogênese somática a partir de diferentes tecidos vegetativos.

A alta variabilidade nas respostas *in vitro* pode ser relacionada pela interação das condições de indução com os níveis de hormônios endógenos dos explantes que dependem do genótipo, fase de desenvolvimento, idade, entre outros (Jiménez 2005). Conforme Isah (2016), essas diferenças verificadas entre genótipos podem estar associadas com diferenças no grau de alterações epigenéticas.

## 4.2 Multiplicação de calos

Durante a fase de multiplicação foi observado que aqueles calos mantidos por em meio com poliaminas perderam sua qualidade embriogênica. Nascimento-Gavioli et al. (2017) constataram que calos não embriogênicos continham concentrações mais altas de poliaminas totais, especialmente putrescina. Assim como Santanen e Simola (1992) observaram que altas concentrações de espermidina em calos não embriogênicos, não apresentam efeito positivo na embriogênese somática. Diferentemente, Minocha et al. (1999) indicam que as poliaminas desempenham um papel crucial no processo de embriogênese somática. Dessa forma, novos trabalhos deverão ser realizados para verificar a presença desses compostos nos calos e a influência deles.

### 4.3 Diferenciação de calos em embriões somáticos

Os tratamentos mostrados no presente trabalho ainda não são suficientes para a diferenciação de calos em embriões somáticos. No entanto, foi observado que a associação de ANA+2iP (T2) e 2,4-D+BAP (T3) foram importantes para manter os calos com as características embriogênicas. Este resultado é importante, pois a manutenção destes calos em meio com outros reguladores pode ser prejudicial para os calos, uma vez que os calos mantidos nesses meios para diferenciação resultaram em calos não embriogênicos ou oxidaram.

A auxina 2,4-D é relatada por outros autores como um dos principais fatores de aquisição de competência embriogênica (Fehér 2015). Apesar dos resultados favoráveis da eficiência na indução de calos com a utilização do Picloram ter sido observada por vários autores em diversas espécies de palmeiras, tais como *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al. 2007a), *Elaeis guineensis* (Scherwinski-Pereira et al. 2010; de Carvalho Silva et al. 2012; Balzon et al. 2013) e *Acrocomia aculeata* (Luis 2013; Padilha et al. 2015), os resultados apresentados aqui demonstram que a auxina 2,4-D pode estar relacionada à aquisição de competência embriogênica, uma vez que os calos mantiveram estas características quando em presença desta auxina.

### 4.4 Análises anatômicas

As análises anatômicas realizadas nesse trabalho confirmam a participação de tecidos provasculares na formação de calos em tecidos foliares, já nos primeiros dias de cultivo.

Essa associação entre tecidos vasculares e calogênese durante a embriogênese somática tem sido comumente relatado em palmeiras (Buffard-Morel et al. 1992; Goh et al. 2001; Sané et al. 2006; Silva-Cardoso 2018) e tem levantado discussões. Schwendiman (1988), por exemplo, associaram a formação de calos a partir de tecidos foliares de *E. guineensis* à desdiferenciação de células perivasculares. Já Bar e Dawayati (2014) associaram a formação de embriões somáticos de *P. dactylifera* à divisão de células procambiais de tecidos foliares, similar ao relatado por Almeida et al. (2012) em *B. gasipaes*.

Nesse trabalho sugere-se, dada a proximidade dos calos formados dos feixes vasculares, a ocorrência das duas possíveis origens supracitadas: a partir de um provável

*pool* de células procambiais, *stem cells*, situado nas adjacências dos tecidos vasculares e/ou a partir da desdiferenciação de células parenquimáticas perivasculares e do sistema vascular, assim como relatado por Silva-Cardoso (2018), em tecidos foliares de *S. oleracea*. Porém, sugerem-se estudos ontogênicos futuros para elucidação da participação dessas vias na formação de calos de *A. aculeta* a partir de tecidos vasculares.

Diversos estudos do processo de embriogênese somática através de análises anatômicas demonstraram que as respostas de morfogênese tipicamente se originam de células procambiais ou de células epidérmicas e/ou subepidérmicas (Schmidt et al. 1997; Somleva et al. 2000; Rose et al. 2006; Moura et al. 2008; de Almeida et al. 2012; da Silva et al. 2015; Rocha et al. 2016a). As células procambiais podem ser consideradas como células-tronco vasculares pluripotentes e estão relacionadas à diferenciação em células do floema e do xilema, além de outros tecidos durante a embriogênese somática. Por outro lado, os mecanismos relacionados à plasticidade das células epidérmicas e sua capacidade de produzir linhagens celulares totipotentes que dão origem a embriões ainda permanecem elusivas (Rocha et al. 2016b).

Os calos considerados embriogênicos oriundos do experimento onde se utilizaram diferentes concentrações de 2,4-D combinadas 450  $\mu$ M de Picloram, de modo geral, exibiam tamanho reduzido; alta relação núcleo:citoplasma; vacúolos, quando presentes, fragmentados; paredes celulares aparentemente mais espessas, dentre outras características. Tais características, contudo, não foram comuns a todos os tratamentos testados, somente para os tratamentos 450  $\mu$ M de Picloram, e 300  $\mu$ M de 2,4-D + 450  $\mu$ M de Picloram. Salienta-se, nesse contexto, a necessidade de se testar diferentes reguladores de crescimento, combinados ou não, na busca de calos com qualidade embriogênica. Outros autores observaram resultados semelhantes. Yusnita e Hapsoro (2011) relatam maior formação de calos em meio com combinações de 2,4-D e Picloram; no entanto, aqueles que mantidos em meio com apenas 2,4-D apresentaram maiores características embriogênicas. Jayanthi et al. (2015) verificaram que a combinação dessas duas auxinas proporcionou melhores resultados quanto a indução de calos embriogênicos.

As características mencionadas para os calos aqui considerados embriogênicos são compatíveis com relatos de diferentes autores (Kurczynska et al. 2012; Rocha et al. 2016a; Silva-Cardoso 2018). Verdeil et al. (2001), por exemplo, relatam que foram

obtidos calos embriogênicos ao passar os calos primários obtidos a partir de inflorescência imatura de *Cocos nucifera* para meio com aumento da concentração de 2,4-D. Estes calos apresentavam características como: uma alta relação núcleo:citoplasma, ou seja, um núcleo central que ocupa grande parte da célula e com um único nucléolo proeminente densamente corado. Além disso, a presença de pequenos vacúolos e células cercadas por uma parede externa espessada são características relatadas para calos embriogênicos.

Durante a fase de diferenciação utilizando combinações de auxinas e citocininas foi possível observar linhagens de calos embriogênicos apresentando células como as mencionadas acima. Além disso, é possível perceber características como diferenciação em tecidos vascular e formação de raízes. Essas características também são relatadas por Rose et al. (2006) em *Medicago truncatula*, no qual foi observada a formação de raízes a partir de células de feixes vasculares utilizando a auxina ANA para indução de calos. O autor demonstra que as células do feixe vascular da folha são estimuladas em divisão pela adição de auxina formando o calo primário e são a partir dessas células que são formados os meristemas radiculares.

Estas observações estão de acordo com a visão de que os vários tipos de calos não são meramente massas homogêneas de células totalmente desdiferenciadas (Sugimoto et al. 2011), podendo ser observado células em diferentes graus de diferenciação. Além disso, o processo de embriogênese somática pode apresentar o que é considerado como transdiferenciação de um tecido de calo parcialmente diferenciado do que a rediferenciação de células isoladas dentro de uma massa celular desdiferenciada (Fehér 2015).

## **4.4 Análises bioquímicas**

### *4.4.1 Análise bioquímica dos acessos*

A análise de açúcares solúveis totais demonstrou maiores teores nos acessos antes da indução de calos, sendo que o palmito proveniente de Buriti Vermelho foi o que apresentou menores teores de açúcares solúveis totais (AST). Já a análise de amido demonstrou que após a indução, todos os palmitos apresentaram um aumento no teor de amido e que de forma geral, o acesso de Buriti Vermelho sempre apresentou teores maiores de amido.

Estes resultados corroboram para a hipótese de que a concentração de amido está intimamente relacionada com a capacidade de formar calos. O presente trabalho demonstrou que o acesso que apresentou maior teor de amido imediatamente antes da inoculação em meio de indução, Buriti Vermelho ( $\pm 55 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ), foi o que formou mais precocemente calos e o que apresentou maior taxa de produção de calos, em comparação, por exemplo, com o acesso Carmo do Parnaíba, que exibiu menor teor de amido ( $\pm 23 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ) que exibiu uma taxa de produção de calos menor do acesso Buriti Vermelho. Além disso, o teor de açúcares solúveis foi inversamente proporcional ao teor de amido, provavelmente por ter sido este metabolizado.

Os resultados obtidos aqui são distintos dos resultados relatados por Bartos (2016) ao estudar o perfil bioquímico da indução de calos em *E. guineensis*. Os autores relatam aumento de AST durante o processo, começando com  $\pm 100 \mu\text{g}/\text{mg MS}$  no estágio anterior à inoculação e chegando a  $\pm 150 \mu\text{g}/\text{mg MS}$  após indução de calos. No entanto, verificou-se que as menores concentrações de amido foram detectadas nos explantes iniciais ( $\pm 6 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ) e, ao decorrer do processo de indução de calos, ocorre um aumento dessas concentrações ( $\pm 15 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ), diferentemente daqueles que não induziram calos ( $\pm 5 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ). Sugerindo dessa forma a importância deste composto para formação de calos.

Gomes et al. (2014) também relatam uma queda nos níveis de AST nos tecidos dos cultivos em desenvolvimento (de  $\pm 180$  para  $\pm 130 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ) nos estágios de aquisição e desenvolvimento da embriogênese somática de embriões zigóticos de *E. guineensis*. Além disso, o autor relata um aumento nas concentrações de amido durante a indução de calos.

Diversos outros trabalhos relatam a importância do amido durante a embriogênese somática (Sharma et al. 2004; Warchoń et al. 2015; Bartos et al. 2018). Strickland et al. (1987) ao avaliarem o efeito da fonte de carbono no meio de cultura, demonstraram que fontes como maltose contribuem para embriogênese. Como o amido é quebrado em moléculas de maltose, novos estudos podem ser realizados para avaliar a relação desse composto na embriogênese somática. Grzyb et al. (2018) também relata que os teores de açúcares estão relacionados com a resposta embriogênica, sendo que estes são afetados pelos níveis de fito-hormônios dos explantes.

Magnani et al. (2017) ao comparar o transcriptoma das células de calos primários e das células embriogênicas, mostraram repressão de vias bioquímicas ligadas ao metabolismo de carboidratos e lipídios, sugerindo que este fator é importante para a formação de calos e posterior formação de embriões somáticos.

Quanto à análise de proteínas totais, assim como demonstrado por outros autores (Cangahuala-Inocente et al. 2009; Bartos 2016), há uma redução durante o processo de desenvolvimento *in vitro*. No presente trabalho, todos os acessos apresentavam teores maiores de proteínas antes da indução de calos ( $\pm 100 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ), reduzindo após 120 dias da indução ( $\pm 10 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ).

#### 4.4.2 Análise bioquímica dos calos

Quanto ao perfil bioquímico dos calos, foi possível observar que o calo do tipo nodular apresentou maior teor de AST que o calo alongado, não diferenciando nos teores de amido. Além disso, foi possível observar também que o calo do tipo nodular também apresenta maior teor de proteína que o calo alongado. Dessa forma, estes dados sugerem uma mobilização maior do calo alongado para o AST, uma vez que estes calos estão em alta divisão celular. Por outro lado, níveis maiores de proteínas totais no calo nodular podem estar relacionados ao processo de diferenciação celular.

Assim como relatado por Pescador et al. (2008) ao analisar bioquimicamente o teor de AST durante a embriogênese somática de *Acca sellowiana*. O autor observou altas e praticamente constantes quantidades destes compostos em todas as fases da embriogênese. Sugerindo dessa forma a importância deste açúcar para a diferenciação e desenvolvimento embrionário. Dessa forma, os teores observados no aqui para este composto possivelmente estão relacionados com a aquisição da competência embriogênica nesta fase.

Diferentemente do observado no presente trabalho, Bartos (2016) observou teores maiores de açúcares solúveis (aproximadamente  $220 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ ) para calos não embriogênicos, enquanto que nos calos embriogênicos os níveis destes compostos atingiram  $40 \mu\text{g}/\text{mg MS}$ . Segundo Baud et al. (2002), a mobilização de açúcares solúveis nos estágios iniciais do desenvolvimento embriogênico é de grande importância, pois atuam principalmente como fonte de energia metabólica, de esqueletos de carbono e/ou sinalização.

Quanto a teores de proteína, outros autores demonstram aumento durante a diferenciação de embriões somáticos. Isso possivelmente se deve ao armazenamento deste composto, assim como ocorre no desenvolvimento de embriões zigóticos (Sghaier et al. 2009), ou ainda, que a desdiferenciação e reprogramação para a aquisição da competência embriogênica pelas células somáticas envolve a expressão de uma grande quantidade de proteínas (Fehér et al. 2003).

## 5 Conclusões

- ✓ A região Mediana, de modo geral, proporciona resultados satisfatórios quanto à formação de calos a partir de explantes foliares de macaúba (*A. aculeata*)
- ✓ Manter explantes foliares de macaúba (*A. aculeata*) na posição horizontal favorece a formação de calos;
- ✓ O seccionamento dos explantes foliares de macaúba (*A. aculeata*) de forma semelhante a uma “cortina” proporciona maior formação de calos; embora resulte em maior oxidação dos calos;
- ✓ Nas condições estudadas, o acesso de *Acrocomia aculeata* Buriti Vermelho é mais responsivo em termos de calogênese em relação aos outros acessos avaliados aqui;
- ✓ A concentração inicial de amido em explantes foliares de macaúba (*A. aculeata*) parece ser um importante fator para a indução de calos visando à embriogênese somática;

## 6 Referências bibliográficas

- Ahee J, Arthuis P, Cas G, et al (1981) *In vitro* vegetative propagation of the oil palm by somatic embryogenesis. *Oléagineux* 36:113–116.
- Almeida M De, Vieira C, de Almeida M, et al (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: A histological study. *Plant Cell Rep* 31:1495–1515. doi: 10.1007/s00299-012-1264-6
- Amaral L, Gaspar M, Costa P, et al (2007) Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34:425–431. doi: 10.1590/S2236-89062007000400001
- Andrade MW, Luz JMQ, Lacerda AS, others (2000) Micropropagação da aroeira.
- Andrea J, Almeida S De, Silvarolla MB, et al (2008) Somatic embryogenesis in genotypes of *Coffea arabica* L. *Coffe Sci* 3:143–151.
- Balzon TA, Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2013) New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 49:41–50. doi: 10.1007/s11627-012-9479-3
- Bar OHA El, Dawayati MM El (2014) Histological changes on regeneration *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. *Aust J Crop Sci* 8:848–855.
- Bartos PMC (2016) Aprimoramento da embriogênese somática de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), a partir de folhas de plantas adultas: Influência do genótipo e caracterização morfoanatômica e bioquímica Aprimoramento da embriogênese somática de dendezeiro. Universidade de Brasília
- Bartos PMC, Gomes HT, do Amaral LIV, et al (2018) Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *3 Biotech*. doi: 10.1007/s13205-018-1238-7
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1992) Embryogenitise somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) k partir d'explants foliaires: etude histologique.
- Cangahuala-Inocente GC, Silveira V, Caprestano CA, et al (2009) Dynamics of biochemical and morphophysiological changes during zygotic embryogenesis in

- Acca sellowiana* (Berg.) Burr. Plant Growth Regul 59:103–115. doi: 10.1007/s10725-009-9393-9
- Cardoso A, Laviola BG, Santos GS, et al (2017) Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. Ind Crops Prod 107:573–580. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.04.023
- Clement CR (1999) 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources. I. The Relation Between Domestication and Human Population Decline. Econ Bot 53:188–202. doi: 10.1007/bf02866498
- Costa FHS da, Jonny Everson S-P, Pereira MAAA, Oliveira JP de (2006) Efeito Da Interação Entre Carvão Ativado E N 6 -Benzilaminopurina Na Propagação *in vitro* De Bananeira, Cv. Grand Naine (Aaa) 1 Interaction Effect Between Activated Charcoal and N 6 -Benzylaminopurine in the *in vitro* Propagation of Banana, Cultivar Grand N. Rev Bras Frutic 280–283. doi: 10.1590/S0100-29452006000200028
- da Silva GM, da Cruz ACF, Otoni WC, et al (2015) Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). Vitro Cell Dev Biol - Plant 51:539–545. doi: 10.1007/s11627-015-9699-4
- de Almeida M, de Almeida CV, Graner EM, et al (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: A histological study. Plant Cell Rep 31:1495–1515. doi: 10.1007/s00299-012-1264-6
- de Carvalho Silva R, Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2012) Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Cell Tissue Organ Cult 111:59–67. doi: 10.1007/s11240-012-0170-5
- Dubois M, Gilles K a., Hamilton JKJ, et al (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28:350–356. doi: 10.1021/ac60111a017
- Eeuwens CJ (1976) Mineral Requirements for Growth and Callus Initiation of Tissue Explants Excised from Mature Coconut Palms (*Cocos nucifera*) and Cultured *in vitro*. Physiol Plant 36:23–28. doi: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb05022.x
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech 1849:385–402. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.07.005

- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:201–228. doi: 10.1023/A:1024033216561
- Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep* 21:517–24. doi: 10.1007/s00299-002-0558-5
- Goh DKS, Bon MC, Aliotti F, et al (2001) *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 37:375–381. doi: 10.1007/s11627-001-0066-2
- Goldsmith MHM, Cataldo DA, Karn J, et al (1974) The rapid non-polar transport of auxin in the phloem of intact *Coleus* plants. *Planta* 116:301–317. doi: 10.1007/BF00390855
- Gomes HT, Bartos PMC, Silva CO, et al (2014) Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Growth Regul* 74:199–208. doi: 10.1007/s10725-014-9901-4
- Grones P, Friml J (2015) Auxin transporters and binding proteins at a glance. *J Cell Sci* 128:1–7. doi: 10.1242/jcs.159418
- Grzyb M, Kalandyk A, Mikula A (2018) Effect of TIBA, fluridone and salicylic acid on somatic embryogenesis and endogenous hormone and sugar contents in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Acta Physiol Plant*. doi: 10.1007/s11738-017-2577-4
- Guerra MP, Nodari R (2006) *Apostila de biotecnologia*. 41.
- Gueye B, Morcillo F, Collin M, et al (2009) Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 99:35–45. doi: 10.1007/s11240-009-9573-3
- Heringer AS, Steinmacher DA, Fraga HPFF, et al (2014) Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA®temporary immersion system. *Sci Hortic (Amsterdam)* 179:284–292. doi: 10.1016/j.scienta.2014.09.041
- Ho W-J, Vasil IK (1983) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118:169–180. doi: 10.1007/BF01281800
- Isah T (2016) Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiol Plant*. doi: 10.1007/s11738-016-2134-6

- Jayanthi M, Susanthi B, Murali Mohan N, Mandal PK (2015) *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). Springerplus 4:256. doi: 10.1186/s40064-015-1025-4
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regul 47:91–110. doi: 10.1007/s10725-005-3478-x
- Karami O, Saidi A (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. Mol Biol Rep 37:2493–2507. doi: 10.1007/s11033-009-9764-3
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27:137.
- Kurczynska EU, Potocka I, Dobrowolska I, et al (2012) Cellular Markers for Somatic Embryogenesis. Embryogenesis 307–332. doi: 10.5772/2143
- Laukkanen H, Häggman H, Kontunen-Soppela S, Hohtola A (1999) Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. Physiol Plant 106:337–343. doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.106312.x
- Lopes ADS, Pacheco TG, Nimz T, et al (2018) The complete plastome of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] and extensive molecular analyses of the evolution of plastid genes in Arecaceae. Planta. doi: 10.1007/s00425-018-2841-x
- Lorenzi G, Negrelle R (2006) *Acrocomia aculeata* (JACQ.) Lodd. EX Mart.: Aspectos ecológicos, usos e potencialidades.
- Lorenzi H (1992) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.
- Luis ZG (2013) Estratégias para a embriogênese somática e Conservação ex situ de germoplasma de macaúba [*Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Ex mart.]. Universidade de Brasília
- Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2014) An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. Plant Cell Tissue Organ Cult 118:485–496. doi: 10.1007/s11240-014-0500-x
- Magnani E, Jiménez-Gómez JM, Soubigou-Taconnat L, et al (2017) Profiling the onset of somatic embryogenesis in Arabidopsis. BMC Genomics 18:1–12. doi: 10.1186/s12864-017-4391-1

- Mazri MA, Belkoura I, Meziani R, et al (2017) Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda. 3 Biotech. doi: 10.1007/s13205-017-0676-y
- Meira FS (2015) Embriogênese somática em macaúba (*Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Ex Mart.) a partir de tecidos foliares de plantas adultas. Universidade de Brasília - UnB
- Meira FS, Luis ZG, de Araújo Silva-Cardoso I de AM, Scherwinski-Pereira JE (2019a) Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events. *Flora* 250:59–67. doi: 10.1016/j.flora.2018.11.011
- Meira FS, Luis ZG, Silva-Cardoso I de AM de A, Scherwinski-Pereira JE (2019b) Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.].
- Minocha R, Smithb DR, Reevesc C, et al (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiol Plant* 105:155–164.
- Moura EF, Motoike SY, Ventrella MC, et al (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Sci Hortic (Amsterdam)* 119:447–454. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.033
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, et al (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 95:175–184. doi: 10.1007/s11240-008-9430-9
- Mozgová I, Muñoz-Viana R, Hennig L (2017) PRC2 Represses Hormone-Induced Somatic Embryogenesis in Vegetative Tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 13:1–27. doi: 10.1371/journal.pgen.1006562
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90:1–8. doi: 10.1007/s11240-007-9249-9
- Nascimento-Gavioli MCA, Cangahuala-Inocente GC, Steinmacher D, et al (2017) Physiological and biochemical features of embryogenic and non-embryogenic peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 53:33–40. doi: 10.1007/s11627-017-9805-x

- Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, De-la-Peña C, et al (2015) Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. PLoS One 10:1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0126414
- North JJ, Ndakidemi PA, Laubscher CP (2012) Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. Int J Phys Sci 7:638–646. doi: 10.5897/IJPS11.786
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59:368–373. doi: 10.1007/BF01248568
- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure: principles and selected methods.
- Othmani A, Bayouhd C, Drira N, et al (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. Plant Cell Tissue Organ Cult 97:71–79. doi: 10.1007/s11240-009-9500-7
- Padilha JHD, Ribas LLF, Amano É, Quoirin M (2015) Somatic embryogenesis in *Acrocomia aculeata* Jacq. (Lodd.) ex Mart using the thin cell layer technique. Acta Bot Brasilica 29:516–523. doi: 10.1590/0102-33062015abb0109
- Pádua MS, Paiva L V., Labory CRGG, et al (2013) Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. An Acad Bras Cienc 85:1545–1556. doi: 10.1590/0001-37652013107912
- Pescador R, Kerbauy GB, Kraus JE, et al (2008) Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). Vitro Cell Dev Biol - Plant 44:289–299. doi: 10.1007/s11627-008-9118-1
- R Development Core Team (2008) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Raza G, Ali K, Mukhtar Z, et al (2010) The response of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) genotypes to callus induction, regeneration and different concentrations of the selective agent (geneticin -418). African J Biotechnol 9:8739–8747. doi: 10.5897/AJB10.012
- Roberts K (1989) The plant extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol 1:1020–1027.
- Rocha DI, Kurczy E, Potocka I, et al (2016a) Histology and Histochemistry of Somatic Embryogenesis. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Springer International Publishing Switzerland, pp 455–469

- Rocha DI, Pinto DLP, Vieira LM, et al (2016b) Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. *Protoplasma* 253:595–609. doi: 10.1007/s00709-015-0837-y
- Rose RJ, Wang XD, Nolan KE, Rolfe BG (2006) Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. *J Exp Bot* 57:2227–2235. doi: 10.1093/jxb/erj187
- Saleh EOL, Scherwinski-Pereira JE (2016) Advances in Somatic Embryogenesis of Palm Trees (Arecaceae): Fundamentals and Review of Protocols. In: *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*. Springer, pp 231–254
- Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, et al (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Ann Bot* 98:301–308. doi: 10.1093/aob/mcl104
- Santanen A, Simola LK (1992) Changes in Polyamine Metabolism during Somatic Embryogenesis in *Picea abies*. *J Plant Physiol* 140:475–480. doi: 10.1016/S0176-1617(11)80828-X
- Satish L, Rency AS, Rathinapriya P, et al (2016) Influence of plant growth regulators and spermidine on somatic embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 124:15–31. doi: 10.1007/s11240-015-0870-8
- Sato YA, Dias Teixeira HC, others (2001) Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação.
- Scherwinski-Pereira JE, da Guedes RS, Fermino PCP, et al (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 46:378–385. doi: 10.1007/s11627-010-9279-6
- Scherwinski-Pereira JE, da Silva Guedes R, da Silva RA, et al (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 109:501–508. doi: 10.1007/s11240-012-0115-z
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen M a, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124:2049–2062. doi: 10.1093/pcp/pci031
- Schwendiman J (1988) Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. *Cafe Cacao* 43–52.
- Sghaier B, Kriaa W, Bahloul M, et al (2009) Effect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos. *Sci Hort (Amsterdam)* 120:379–385. doi: 10.1016/j.scienta.2008.11.035

- Sharma DR, Dawra S, Chowdhury JB (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* Linn.) cv. 'Khadravi' through tissue culture.
- Sharma P, Pandey S, Bhattacharya A, et al (2004) ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze. *J Plant Physiol* 161:1269–1276. doi: 10.1016/j.jplph.2004.01.015
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam M V. (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: Improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Sci* 160:1229–1235. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00375-2
- Silva-Cardoso IM de A (2018) Embriogênese somática de Gueroba (*Syagrus oleracea* (Mart).Becc.) Com ênfase em aspectos anatômicos, istoquímicos e ultraestruturais. Universidade de Brasília
- Smith DL, Krikorian AD (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *Am J Bot* 76:1832–1843.
- Somleva MN, Schmidt EDL, De Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep* 19:718–726. doi: 10.1007/s002999900169
- Stasolla C, Yeung EC (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: Improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:15–35. doi: 10.1023/A:1023345803336
- Steinmacher DA, Clement CR, Guerra MP (2007a) Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: Towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 89:15–22. doi: 10.1007/s11240-007-9207-6
- Steinmacher DA, Krohn NG, Dantas ACMM, et al (2007b) Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. *Ann Bot* 100:699–709. doi: 10.1093/aob/mcm153
- Strickland SG, Nichol JW, McCall CM, Stuart DA (1987) Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. *Plant Sci* 48:113–121. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(87\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0168-9452(87)90138-5)
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM (2011) Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol* 21:212–218. doi: 10.1016/j.tcb.2010.12.004

- Swanson S, Gilroy S (2010) ROS in plant development. *Physiol Plant* 138:384–392. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01313.x
- Teixeira JB, Söndahl MR, Kirby EG (1993) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 34:227–233. doi: 10.1007/BF00029711
- Teixeira LC (2005) Potential of oils for the production of biodiesel. *Inf Agropecuário* 26:18–27.
- Van Winkle SC, Johnson S, Pullman GS (2003) The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Plant Cell Rep* 21:1175–1182. doi: 10.1007/s00299-003-0637-2
- Verdeil JL, Hocher V, Huet C, et al (2001) Ultrastructural Changes in Coconut Calli Associated with the Acquisition of Embryogenic Competence. *Ann Bot* 88:9–18. doi: 10.1006/anbo.2001.1408
- Wang XD, Nolan KE, Irwanto RR, et al (2011) Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: The fate of the pluripotent and totipotent stem cells. *Ann Bot* 107:599–609. doi: 10.1093/aob/mcq269
- Warchoń M, Skrzypek E, Kusibab T, Dubert F (2015) Induction of somatic embryogenesis and biochemical characterization of *Cordyline australis* (G. Forst.) Endl. “Red Star” callus. *Sci Hortic (Amsterdam)* 192:338–345. doi: 10.1016/j.scienta.2015.05.010
- Yusnita, Hapsoro DWI (2011) *In vitro* Callus Induction and Embryogenesis of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Leaf Explants. *HAYATI J Biosci* 18:61–65. doi: 10.4308/hjb.18.2.61

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES POTENCIALMENTE RELACIONADOS COM A CALOGÊNESE E HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* DO GENE *SERK* EM MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*)**

Resumo

Visando compreender melhor os processos moleculares desencadeados durante a formação de calos em macaúba, a expressão de sete genes potencialmente envolvidos nesse processo identificados em estudos prévios e a partir da literatura foi investigada por RT-qPCR. Além disso, foi realizada a hibridização *in situ* do gene *SERK*. Tecidos foliares de plantas adultas de dois acessos de macaúba foram inoculados em meio combinado com Picloram na concentração de 450 µM para a indução de calos. A análise da expressão foi realizada a partir de amostras de folhas de dois acessos de diferentes procedências (Tiros, MG e Buriti Vermelho, DF), sendo estes caracterizados como não responsivo (NR) e responsivo (R), respectivamente. O material foi coletado no momento do estabelecimento do experimento (0 DAI, dia inicial) e 120 dias após indução de calos (120 DAI). Foram avaliados genes relacionados com o desenvolvimento (*SERK*, *OASA*, *EF1*, *ANN1*) e estresse (*LEA*, *CAT2* e *MDAR5*). Os resultados obtidos mostraram que todos os genes envolvidos com o desenvolvimento da planta analisada tiveram suas expressões negativamente regulados em 0 DAI quando o acesso R foi comparado com o acesso NR. Por outro lado, foi possível observar que esses genes foram positivamente regulados aos 120 DAI. O gene de estresse *LEA* apresentou uma tendência a expressão aumentada no acesso NR, enquanto o acesso R apresentou expressão diminuída e os genes *CAT2* e *MDAR5* apresentaram expressão aumentada significativamente nos dois acessos. A hibridização *in situ* demonstrou expressão nos feixes vasculares, indicando a expressão de *SERK* nesta região, além da sua expressão em calos. Os resultados obtidos neste estudo corroboram nossa hipótese de que a regulação de genes envolvidos no controle do estresse oxidativo e desenvolvimento são cruciais para a formação de calos em macaúba.

Palavras-chaves: Arecaceae, Embriogênese somática, RT-qPCR, desenvolvimento e estresse oxidativo, *AacSERK*.

## 1 Introdução

A macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex. Martius] é uma espécie oleaginosa da família Arecaceae. É uma planta nativa brasileira e possui grande dispersão na América do Sul, sendo encontrada principalmente na região do Cerrado Brasileiro (Lima et al. 2018).

A macaúba possui grande valor econômico, sendo toda a planta aproveitada, tanto para culinária ou fins madeireiros (Cardoso et al. 2017). No entanto, são os frutos que apresentam maior interesse econômico. Eles apresentam altos teores de óleo (19,62% de óleo de polpa e 3,43% de óleo de semente) e, devido a isso, a macaúba tem alto potencial para a produção de biodiesel (Del Río et al. 2016). Mesmo assim, seus produtos ainda são obtidos de forma extrativista, o que tem mobilizado diferentes grupos de pesquisa na busca do melhor aproveitamento da espécie. Além disso, a reprodução exclusivamente de forma sexuada, presença de dormência das sementes e lento crescimento das plantas, também são empecilhos para que a macaúba tenha importância mais destacada na produção de óleo vegetal (Arkcoll 1990; César et al. 2015). Dessa forma, é importante para a exploração comercial da macaúba, a utilização de tecnologias que possam acelerar a obtenção e propagação de genótipos superiores a partir de populações naturais.

A embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos vegetais que se apresenta como uma ferramenta de grande potencial para a propagação clonal de espécies como a macaúba. Ela pode permitir, dentre outras aplicações, a clonagem de genótipos selecionados em curto tempo e espaço físico limitado (Fehér 2015; Guan et al. 2016).

Embora a técnica da embriogênese somática seja conhecida há mais de 60 anos (Steward et al. 1958), os mecanismos moleculares que governam as diferentes etapas do processo não são bem compreendidos (Vogel 2005; Gomes et al. 2014; Santos et al. 2018). Dessa forma, trabalhos vêm sendo desenvolvidos nessa área a fim de entender os mecanismos envolvidos durante o processo (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo 2016; Magnani et al. 2017; Karim et al. 2018; Ikeuchi et al. 2019). Para isso, diversos genes expressos diferencialmente durante a embriogênese somática vem sendo estudados (Xia et al. 2014; Santos et al. 2018)

Durante a fase inicial do cultivo *in vitro* e indução da embriogênese somática os explantes são expostos a um estímulo físico, químico ou biológico onde são

desencadeados processos morfogênicos que permitem a formação de calos. Esta etapa é uma das mais críticas para o estabelecimento das culturas embriogênicas *in vitro* (Guerra e Nodari 2006). Diversos fatores influenciam na indução da embriogênese somática, como por exemplo, a fonte de explantes utilizados (tecidos embrionários ou juvenis) e, geralmente, as altas concentrações das auxinas a que são submetidos (Guerra et al. 1999; Viñas e Jiménez 2011).

A técnica de RT-qPCR é o método comumente utilizado para análises de expressão gênica. Esta técnica se destaca por ser informativa e precisa para a quantificação de diferenças nos níveis de expressão gênica entre amostras, além de ser uma técnica sensível e que não requer manipulação após amplificação (Wong e Medrano 2005; Taylor et al. 2010). Dessa forma é possível avaliar a expressão de genes relacionados à formação dos calos e sua relação com a embriogênese somática.

As plantas possuem um grande número de receptores de sinais em sua superfície celular (receptor-like kinases, RLKs), os quais estão implicados na detecção de sinais extrínsecos e intrínsecos, e governam diversas respostas celulares (Santiago et al. 2013a). Dentre essas vias de sinalização, existe um pequeno grupo de RLKs conhecido como *Somatic Embryogenesis Receptor Kinases* (SERKs) envolvido em diversos processos celulares dentre os quais a embriogênese somática (Kumar e Van Staden 2019). Dentre estes genes envolvidos na embriogênese somática, destaca-se o gene SERK, que foi originalmente identificado como um marcador da competência embrionária na cultura de células de cenoura (Schmidt et al. 1997). Desde então ele tem sido considerado um marcador potencialmente confiável da competência embriogênica, uma vez que vários homólogos são encontrados em tecidos embriogênicos de diversas espécies vegetais (Thomas et al. 2004; Toorn et al. 2015; Song et al. 2017). Dentre estas espécies vegetais, o gene SERK já foi descrito para algumas palmeiras como *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al. 2009), *Phoenix dactylifera* (Rekik et al. 2013) e *Elaeis guineensis* (Lee et al. 2018).

A hibridização *in situ* é uma técnica citoquímica utilizada para localização de ácidos nucleicos, DNA ou RNA, em um organismo ou parte dele (Wilkinson 1992; McFadden 1995; Mukai 2017). A técnica baseia-se na utilização de uma sonda que pode ser de DNA ou RNA que, em condições específicas, hibridiza com uma sequência alvo complementar em um tecido ou organismo previamente fixado, tornando-se visível com alguma forma de marcador, sendo assim possível determinar sua localização (Tsai e

Harding 2013). Na cultura de tecidos, a técnica vem sendo relatada para avaliar a expressão de genes durante o processo de desenvolvimento *in vitro*, sobretudo, o gene *SERK*, por ser este relacionado com aquisição da competência embriogênica. Dentre os trabalhos com palmeiras, a hibridização já foi descrita em *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al. 2009) e *Elaeis guineensis* (Lee et al. 2018). Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a expressão diferencial de genes potencialmente relacionados com a calogênese em acessos contrastantes de macaúba com relação a resposta da formação de calos, além de analisar a localização *in situ* do gene *SERK* durante as diferentes etapas do processo visando correlacionar sua expressão como marcador da embriogênese somática em macaúba.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Expressão de genes e Hibridização *in situ***

Os experimentos de expressão de genes envolvidos na embriogênese somática de macaúba foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II) e no Laboratório de Genômica e Proteômica (LGP). Para a etapa de hibridização *in situ*, os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II), juntamente com os laboratórios de Regulação Gênica I (LRG-I), Reprodução Vegetal (LRV) e Microscopia (LBim), localizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

### **2.2 Material vegetal**

Tecidos foliares de plantas adultas de macaúba foram desinfestados e inoculados em meio para indução de calos. O meio de cultivo consistiu de sais do meio de cultura Y3 (Eeuwens 1976) e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 500 mg.L<sup>-1</sup> de glutamina, 500 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 500 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O meio foi solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO). Foi utilizada a auxina Ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloro- picolínico (Picloram) na concentração de 450 µM para a indução de calos. O pH foi ajustado para 5,8±0,01 antes da esterilização realizada por autoclavagem a 120 °C e 1,3 atm de pressão por 20 minutos.

A análise da expressão de genes foi realizada a partir de amostras de folhas de dois acessos (Tiros – MG e Buriti Vermelho – DF), sendo estes caracterizados segundo sua formação de calos como não responsivo (NR) e responsivo (R), respectivamente. O material foi coletado no momento do estabelecimento do experimento (0 DAI, dia inicial) e 120 dias após cultivo em meio de indução de calos (120 DAI). Além disso, amostras de calos com características embriogênicas também foram retiradas para extração de RNA para preparo da sonda para hibridização. Todo o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C.

### **2.3 Seleção de genes envolvidos na aquisição da competência embriogênica e genes de referência**

Estudos proteômicos prévios foram conduzidos no Laboratório de Genômica e Proteômica (LGP) e no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCTII) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Silva et al. 2014; Santos et al. 2018; Almeida et al. 2019). A partir destes resultados, foram selecionados genes envolvidos com a embriogênese somática. Destes resultados, foi selecionado um total de 29 genes para análise da expressão, sendo que destes, 16 destes genes foram expressos em macaúba. Nesse sentido, foram selecionados sete genes candidatos envolvidos com desenvolvimento e estresse da planta. Além disso, foram testados quatro genes de referência (*ELF2*, *PD00380*, *PD00569* e *ACT1*) para análise da expressão de genes envolvidos na embriogênese somática (Tabela 1).

### *2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA para análise da expressão*

A extração de RNA total para a expressão de genes foi realizada a partir de folhas. Para isso, foi realizada uma pré-extração pelo método CTAB utilizando 300 mg de material previamente macerado em nitrogênio líquido e em triplicada para maior rendimento ao final. Foi adicionado às amostras 1 mL de tampão de extração (CTAB 0,8%, NaCl 800 mM, EDTA 22 mM, Tris HCl 220mM pH 8, sarcosil 8%, Sorbitol 140 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%) e 0,4 mL de solução Clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) e os tubos mantidos sob agitação a 55°C por 10 min. O material foi centrifugado e a fase aquosa recuperada e então adicionado isopropanol para precipitação. Depois de centrifugado, o *pellet* obtido ao final foi ressuscitado em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma–Aldrich)

Após essa etapa, o RNA total foi re-extraído utilizando-se o método Trizol (Sigma–Aldrich). A extração foi realizada utilizando 40  $\mu$ L da pré-extração, onde foi adicionado 1 mL de Trizol e  $\beta$ -mercaptoetanol a 1%. Após agitação e centrifugação, foi coletada a parte aquosa e adicionado isopropanol para precipitação do RNA. Após centrifugação, o *pellet* obtido ao final foi suspenso em 10  $\mu$ L de água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma–Aldrich).

Após a extração, o RNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% e quantificado em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000c). As amostras foram tratadas com DNase I, RNase Free (Applied Biosystems/Ambion) para remoção de DNA genômico e então sintetizado o cDNA utilizando Next Generation M-MLV RNase Minus First Strand cDNA Synthesis (DNA express), segundo as especificações do fabricante.

Tabela 5 Genes e iniciadores desenhados para análise de RT-qPCR

Gene name	Acesso	Nome do gene	Foward primer (5' to 3')	TM (°C)	Reverse primer (5' to 3')	TM (°C)
<i>ANN1</i>	XM_010941329.2	annexin D1 (LOC105058405)	GTCATAGCCACTCGTGCTGA	60.0	CTCCAGAAGTGTCGCCCTTA	60.4
<i>CAT2</i>	NM_001319913.1	catalase isozyme 2 (LOC105054906)	ATTGGGATCTCCTGGGAAAC	60.1	ACTCCTGGATGTGGGACTTG	60.0
<i>OASA</i>	XM_010919421.2	cysteine synthase (LOC105042287)	AATATCATCTGGGGCTGCTG	60.1	GCTCACCAAAGCTAGGGAAA	59.5
<i>MDAR5</i>	XM_010942780.2	monodehydroascorbate reductase 5, mitochondrial (LOC105059480)	AGCCAAGAAGGTTGCCATTA	59.7	GTGCTCCTCGGGAAATATGA	60.0
<i>EF1</i>	JN003517.1	elongation factor 1 (EF1)	AGGCTGACTGTGCTGTCCTT	60.1	TCTGCTTCACACCAAGGGTA	59.3
<i>LEA</i>	XP_010927880.1	Putative late embryogenesis abundant (LEA) protein	TGGGGTTTTGTAATCAGCACA	54.5	TGAAGAAAAGGGAGGCTTCA	53.9
<i>SERK</i>	XP_010916943.1	Somatic Embryogenesis Receptor Kinase	GCATCACCTTCCGAGTTAGC	55.8	TCGTATGGATCTGGGGAGAC	55.6
<i>CPN1</i>	XM_010935102.1	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1-like (LOC105053810)	TGAAAGATGGCTCTCACACG	60.0	TTTGAAGTGGTGC GGTTGTA	60.1
<i>ACT1</i>	NM_001319906.1	actin-3-like (LOC105038005)	CACTTCCTCATGCCATCCTT	60.1	CTAACAATTTCCCGCTCTGC	59.8
<i>ENO1</i>	XM_010909626.2	enolase-like (LOC105034448)	GTCAGCGAGTACCCCATGT	60.0	TCGTCTCCAACAATCTGCAC	59.8
<i>HSP81-1</i>	XM_010914921.2	heat shock protein 81-1 (LOC105038974)	TTCGGTGTGGGGTTCTACTC	60.0	ATCCCTAGTCACGGTGAACG	60.0
<i>PPF-BETA</i>	XM_010915114.2	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta (LOC105039111)	TGTGCTCCTGTTGAGGAATG	59.8	CCTTCTTTATCACGGGCTTG	59.9
<i>RUBA</i>	XM_010920378.1	ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha (LOC105042992), transcript variant X2	GCGTGGCAGTTATCAAGGTT	60.1	TCCTCTATGGCTGCGAAAGT	60.0
<i>FAH</i>	XM_010915669.2	fumarylacetoacetase (LOC105039501)	GCATGGGAATATGTGCCTCT	59.9	GAGCATCGCAAACAAAAGGT	60.3
<i>PRB1</i>	XM_010940037.2	pathogenesis-related protein 1-like (LOC105057431)	CCTCGACCCAGTTCAAGTTC	59.7	TTTGCCTTGGCTACCTCATC	60.2
<i>GBSS1</i>	XP_010940833.1	Granule-bound starch Synthase	AGCCTTGATGCTGCTTTTGT	55.6	GCATCGCACTTCATCTCAA	53.5

Tabela 1 (Continuação...)

Gene name	Acesso	Nome do gene	Foward primer (5' to 3')	TM (°C)	Reverse primer (5' to 3')	TM (°C)
<i>LOC105050379</i>	XP_010928670.1	AP2-like ethylene-responsive transcription factor AIL5 isoform X2	ACAAGAGGAAGCTGCAGAGG	57.1	GCATTGGAGTTGGAGGATGT	55.1
<i>GSTU17</i>	XP_010919191.1	Glutathione S-transferase U17-like	ACTCCACACTCCGGTTCATC		GGTAGAGTTCGCCAAGTTGC	
<i>BGLUC</i>	XP_010938396.1	Beta-glucosidase 22-like	TCAGTTTGTTCACCCACA	54.6	AGTGTGCTTCCCATGAAACC	55.6
<i>PGM</i>	XM_010924524.2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (LOC105046041)	TGGACGCAATAGAGCAAGTG	60.0	GTCCCCCTTTTTATCGAGGA	60.3
<i>GER5</i>	XM_010934113.2	germin-like protein 8-14 (LOC105053091)	ACCTTAATCCAGGGGGTGTC	60.1	GTTATTGGCGGTGGAGATGA	60.9
	XM_010919558.1	granule-bound starch synthase 2, chloroplastic/amyloplastic-like (LOC105042381)	TCTGTTGGCATGTTCCATGT	60.0	TCAGTCCGTGGTCACGATAA	60.1
<i>LOC106346350</i>	XM_013785648.1	protein SUPPRESSOR OF K(+) TRANSPORT GROWTH DEFECT 1-like (LOC106346350)	CCCAAGATGCCATGTTCTTT	59.9	CGAGCCCTTTTTCTGCTAAA	59.6
<i>PDIL1-4</i>	XM_010932368.2	protein disulfide-isomerase (LOC105051770)	AACAAGCACCCCTTGTCATC	60.0	CAAGCTGCCATCCAGGTAAT	60.1
<i>MYRS</i>	XM_010111256.1	Myrcene synthase partial	AAGTGAATCAACGGCGATCT	59.7	AGTCGGTCGGCATGTA ACTC	60.1
<i>PRB1-3</i>	XM_010943665.2	pathogenesis-related protein PRB1-3-like (LOC105060073)	ACTACGCCAACCAGCGAAT	60.7	TCACTCACCCACGAGTTCAC	59.7
<i>WUS1</i>	XP_008776170.1	WUSCHEL-related homeobox 3B-like	TGCCCTCAATCTTCCCATAG	54.2	AAAGATGCCCCAGACTCCTT	56.2
<i>F-Box</i>	XP_010935552.1	F-box family protein	TGATGGCAGTGCTTTCAGAG	55.3	TGGTAGCAGCGTCACAAAAG	55.6
<i>FIE2</i>	XP_010906361.1	Polycomb group protein FIE2 isoform X2	TAGCCGCACCATAACATTGA	54.3	TTGATGGTCGCTTGTGGTA	54.4
<i>PD00569</i>	EL682210	Manganese superoxide dismutase	CACCACCAGACGTACATCACAAA	60.0	GATATGACCTCCGCCATTGAACT	60.0
<i>PD00380</i>	EY397675	Predict 40s ribosomal protein S27-2	GATGGTCTTCCGAACGATATTGA	63.0	TCACATCCATGAAGAATGAGTTTCG	63.0
<i>ACT2</i>	GAJH01031170.1	Actin/mreB/sugarkinase/HSP70 superfamily	CTCAACCCCAAGGCGAAC	80.9	GTAACACCATCTCCCGAGTCAA	80.9

## 2.5 Validação de cDNAs por RT-PCR convencional

O RT-PCR foi utilizado para a avaliação dos cDNAs sintetizados e para a validação dos primers selecionados para a análise de expressão gênica. As reações foram conduzidas com cDNA diluído 10x, 20x e 50x em água ultrapura, 2,5 µL de tampão de reação 5x (GE Healthcare Life Sciences) 1 µL de cada primer a 10 µM (forward e reverse), 0,5 µL de dNTPs, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM e 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (GE Healthcare Life Sciences) em um volume final de 25 µL. A reação ocorreu em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler - Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30s e 72°C por 1 min; finalizando com um passo de 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

## 2.6 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

A análise da expressão relativa por RT-qPCR baseada na detecção de SYBR Green foi projetada para as análises da expressão de 29 genes candidatos com possível envolvimento na calogênese em um conjunto de dois tempos distintos (0 DAI e 120 DAI) e dois acessos (Tiros – MG e Buriti Vermelho – DF). Os experimentos de RT-qPCR foram realizados no termociclador 7300 96-well Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Todas as reações foram compostas por 5 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µL de cada primer em uma concentração inicial de 10 mM (forward e reverse) e 2 µL de cDNA fita simples referente a cada amostra a ser analisada (diluído 50x). O programa de PCR utilizado foi um passo a 95°C por 10 min para ativação da enzima Taq DNA polimerase (hot start), 95°C por 15 s, 60°C por 60 s repetidos por 40 ciclos. Para a verificação da presença de dímeros de primers e produtos inespecíficos, a curva de desnaturação (*melting curve*) foi analisada após o término da amplificação. Todos os experimentos foram feitos utilizando duas réplicas biológicas e para cada réplica biológica, três réplicas técnicas foram utilizadas. Todas as reações de RT-qPCR foram feitas em placas 96 poços e em cada placa foi colocado um controle negativo sem a presença de cDNA para confirmar a ausência de contaminação. Reações com RNA tratado com DNase também foram feitas para confirmar a ausência de contaminações com DNA genômico.

## 2.7 Análise de dados

Os dados brutos da fluorescência de todas as corridas foram importados para o software Real-time PCR Miner, para a determinação da eficiência da PCR (Zhao e Fernald 2005). Os valores de Cq da triplicata biológica e o valor da eficiência de cada gene foram gerados pelo software Real Time PCR Miner para determinar a expressão relativa dos genes alvos. O software geNorm foi utilizado para a seleção dos genes de referência. Após a determinação dos genes normalizadores mais estáveis (ACT2 e PD00569) pelo software geNorm, foi feita a análise da expressão relativa de cada gene candidato pelo software REST (Pfaffl 2001). As análises foram realizadas comparando as amostras de R e NR em cada tempo de coleta (0 DAI e 120 DAI). Foi feito também um *time course* da expressão relativa dos genes ao longo dos estágios para as amostras de R e NR, utilizando o tempo 0 (antes da indução) como controle. Na análise da expressão relativa de cada gene, o controle utilizado foi o acesso NR sob as mesmas condições do acesso R em cada tempo separadamente. Para determinar as expressões relativas foi realizada análise estatística ( $p \leq 0,05$ ). A expressão relativa dos genes foi considerada diminuída, aumentada ou não estatisticamente válida, sendo considerado um Fold Change  $\leq 0,5$  e  $\geq 1,5$ .

## 2.8 Extração de RNA e síntese de cDNA para hibridização *in situ*

O RNA total foi extraído a partir dos calos embriogênicos utilizando-se o método Trizol (Sigma–Aldrich). A extração foi realizada utilizando 10 mg de calo fresco pulverizado com nitrogênio líquido. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de Trizol e  $\beta$ -mercaptoetanol 1% ao material pulverizado. Após centrifugado e coletada a parte aquosa, foi adicionado isopropanol para precipitação do RNA. Em seguida, o *pellet* obtido ao final foi ressuspenso em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma–Aldrich).

Após a extração, o RNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% e quantificado em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000c). As amostras foram tratadas com DNase I, RNase Free (Fermentas, Alemanha) para remoção de DNA genômico e então sintetizado o cDNA (Superscript III), segundo as especificações do fabricante.

## 2.9 Isolamento do *SERK* e seqüenciamento

Após o preparo do cDNA, o isolamento do gene *SERK* das amostras foi realizado utilizando *primers* degenerados desenhados segundo seqüências conservadas de outras espécies já descritas. Além disso, foram usados *primers* utilizados em *Cocos nucifera*, segundo descrito por Pérez-Núñez et al. (2009). As seqüências dos *primers* degenerados utilizados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 6 Seqüências de primers utilizados para clonagem do gene *AacSERK*

Descrição	Foward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
Degenerados	BCNACTCTKGTTAATCCATG	YGCCATRCTAATCAKYTCRACY
	STTGAYCTTGGRAATGCAM	KGCYTCRAASTCYTCRTCC
<i>CnSERK</i>	TATCTGGTACATTGGTCCCTC	TGATGTGCCTGCTGAAGA

Além dos *primers* e o cDNA, na etapa de amplificação, foi utilizado Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> 50mM e dNTP 2,5mM (Kit Ludwig). O programa de amplificação seguido foi: desnaturação a 94°C por um minuto, 94°C por 40 segundos, seguido de 30 ciclos de 50°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos, após um ciclo de 72°C por 30 minutos. As reações foram realizadas em termociclador (Veriti™ thermal cycler, Applied Biosystems) e, após o processo de amplificação, os produtos da PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado (BioCell).

Foi realizado o seqüenciamento das amostras no Laboratório de Genética Vegetal (LGV). As amostras foram seqüenciadas utilizando Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante, e em seqüenciador automático ABI 3700. A seqüência adquirida foi analisada no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o serviço BLAST. Além disso, o alinhamento da seqüência foi realizado utilizando o programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). A predição dos domínios da proteína obtida foi realizada utilizando a ferramenta *Search Sequence* da plataforma Pfam (<https://pfam.xfam.org/search/sequence>).

### 2.10 Preparo do vetor

Os fragmentos purificados obtidos da amplificação foram ligados ao vetor pGEM®-T Easy (Promega®, Madison, WI), na proporção de 3:1 de inserto:vetor, por meio da reação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos obtidos foram introduzidos em células competentes de *Escherichia coli* por eletroporação. As células transformadas foram selecionadas a partir do método de triagem azul-branco (*blue-white screening*). Após a eletroporação, 100 µL de meio contendo as células foram plaqueadas em meio seletivo LB sólido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de cloreto de sódio e 1,6% de ágar) contendo 40 µL de tetraciclina, 20 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-galactopiranosídeo (X-Gal) e 80 µL de isopropil-beta-D (IPTG) e incubadas a 37°C, por aproximadamente 15 horas para isolamento das colônias transformadas (brancas) daquelas não transformadas (azul). Após esse período, colônias transformadas foram selecionadas e o seu DNA plasmidial foi isolado pelo método de purificação em colunas, com o Kit Miniprep (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 2.11 Preparo da sonda

As sondas de RNA foram preparadas usando o Digoxigenin RNA Labeling Kit (Roche, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Nesta etapa, o vetor obtido na etapa anterior foi utilizado para preparo da sonda para a hibridização. Para tanto, o DNA plasmidial contendo o gene *SERK* foi linearizado pela digestão com *NcoI* ou *Sall*, e foi utilizado *Sp6 polymerase* para obtenção da fita no sentido antisenso e *T7 polymerase* para obtenção da fita no sentido senso. As sondas de RNA foram tratadas utilizando DNase I livre de RNase por 15 min a 37°C e EDTA 0,2M (pH 8,0). Após centrifugação, o *pellet* formado foi ressuspenso com água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma–Aldrich).

### 2.12 Preparo do tecido e hibridização

As etapas de preparo do material vegetal e hibridização *in situ* foram feitas de acordo com Dusi (2015). Folhas com calo e calos embriogênicos foram fixados em 4% paraformaldeído, 0,25% glutaraldeído, e 0,1 M NaCl em 0,01 M tampão fosfato de sódio, pH 7,2 por um período de 24h e sob vácuo durante a primeira hora. Depois de

fixadas, as amostras foram desidratadas em uma série etanólica crescente (30 - 100%) por 1 hora cada. Logo em seguida, as amostras foram transferidas para etanol:histoclear nas proporções 3:1, 1:1, 1:3 e em histoclear puro 3x por uma hora cada e infiltradas em parafina (Paraplast, Sigma). Posteriormente, secções de 10 µm foram obtidas em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidas e aderidas às lâminas de vidro para microscopia próprias para imunohistoquímica (EasyPath™ ImmunoSlides) em placa aquecida a 42 °C.

Além disso, foram realizados testes com laranja de acridina para verificar a preservação do RNA nos tecidos. Para isso, as lâminas previamente preparadas foram colocadas em tampão acetato (pH 2,0) durante 10 min e, em seguida, acrescentados 100 µL laranja de acridina por 30 min. Logo após, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão veronal-acetato pH 7,8 por 15 min. Então, os resultados foram registrados em microscópio fluorescente (Zeiss Axiophot) utilizando filtro de luz ultravioleta, acoplado a um computador com um software de captura de imagens (Software AxioVision).

As secções obtidas foram hibridizadas com 60 ng de RNA da sonda preparada com a Digoxigenina, diluída em 100 µl tampão de hibridização (50% formamida, 1x solução de Denhardt, 0,6 ng de tRNA/µl, NaCl 300 mM, sulfato de dextran 10%, Tris-HCl 10mM - pH 7,5- e 1mM de EDTA - pH 8,0 - em água). A hibridização foi realizada em câmara úmida por um período de 18h, no escuro e a 42 °C. Logo em seguida, as secções foram lavadas em uma série decrescente (4x, 2x, 1x e 0,5x) de SSC (sendo a concentração 1x equivalente a 0,15 M de NaCl e 15mM de citrato de sódio - pH 7,0) a 42 °C por 30 min. Após, foi feito o bloqueio com “Blocking reagent” Roche a 1% em tampão 1 (NaCl 0,15 M, 0,1M Tris-HCl, pH 7,5) por 30 min sendo em seguida adicionado o anticorpoanti-digoxigenin-AP fragmentos Fab (Roche), 1µL em 1 mL de tampão de hibridização por 1 h. Após esse período as lâminas foram lavadas em tampão 1 para remoção de anticorpos que não foram ligados. Após, as lâminas foram transferidas para tampão de detecção 3 (Tris-HCl a 0,1M, pH 7,5, 0,1M de NaCl e 0,05 M de MgCl<sub>2</sub>; pH final ajustado para 9,5). Em cada lâmina foi adicionada de coloração 20 µL de solução comercial de cloreto de tetrazólio nitroazul junto com 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (50 mg/ml) em 1 mL de tampão 3. Logo após, a reação de coloração foi finalizada utilizando solução tampão (0,01M de Tris-HCl, pH 8,0, 1mM de EDTA) e então os resultados foram registrados em microscópio de luz (Zeiss

Axiophot), acoplado a um computador com um software de captura de imagens (Software AxioVision).

### 3 Resultados

#### 3.1 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Buscando compreender melhor os processos moleculares e os padrões de expressão de genes envolvidos na indução de calos em dois acessos de macaúba contrastantes (Tiros, MG e Buriti Vermelho, DF) quanto à formação de calos foi realizada uma análise por RT-qPCR em dois estádios (0 e 120 DAI). O RNA total extraído apresentou rendimento médio de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e, após a síntese de cDNA, foi realizada RT-PCR para uma avaliação preliminar dos cDNAs utilizando um par de primers para actina (Figura 1). Como não houve diferença na amplificação entre as diluições de cDNA, foi utilizada a diluição 1:50. Como esperado, os controles negativos (com água e sem cDNA) não produziram produto de amplificação, confirmando a ausência de contaminantes.

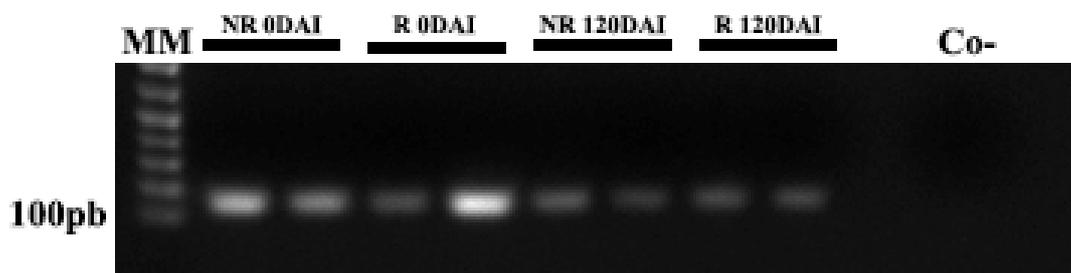


Figura 25 Avaliação dos cDNAs por RT-PCR utilizando um par de primers para actina diluído 1:50. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. As replicas do acesso responsivo e tempos de coleta estão indicados por R 0DAI, R 120DAI, e do acesso não responsivo por NR 0DAI, NR 120DAI. MM: Marcador 1 Kb Plus, Co-: Controle negativo.

Foi realizado ainda um teste para verificar contaminações com DNA genômico por RT-qPCR. Para isso, foi feito um *pool* com todos os RNAs tratados com DNase. Os primers para o gene de referência *PD00569* foi utilizado para esta avaliação e os resultados mostraram que não houve amplificação, confirmando a ausência de contaminação por DNA genômico (Figura 2A B).

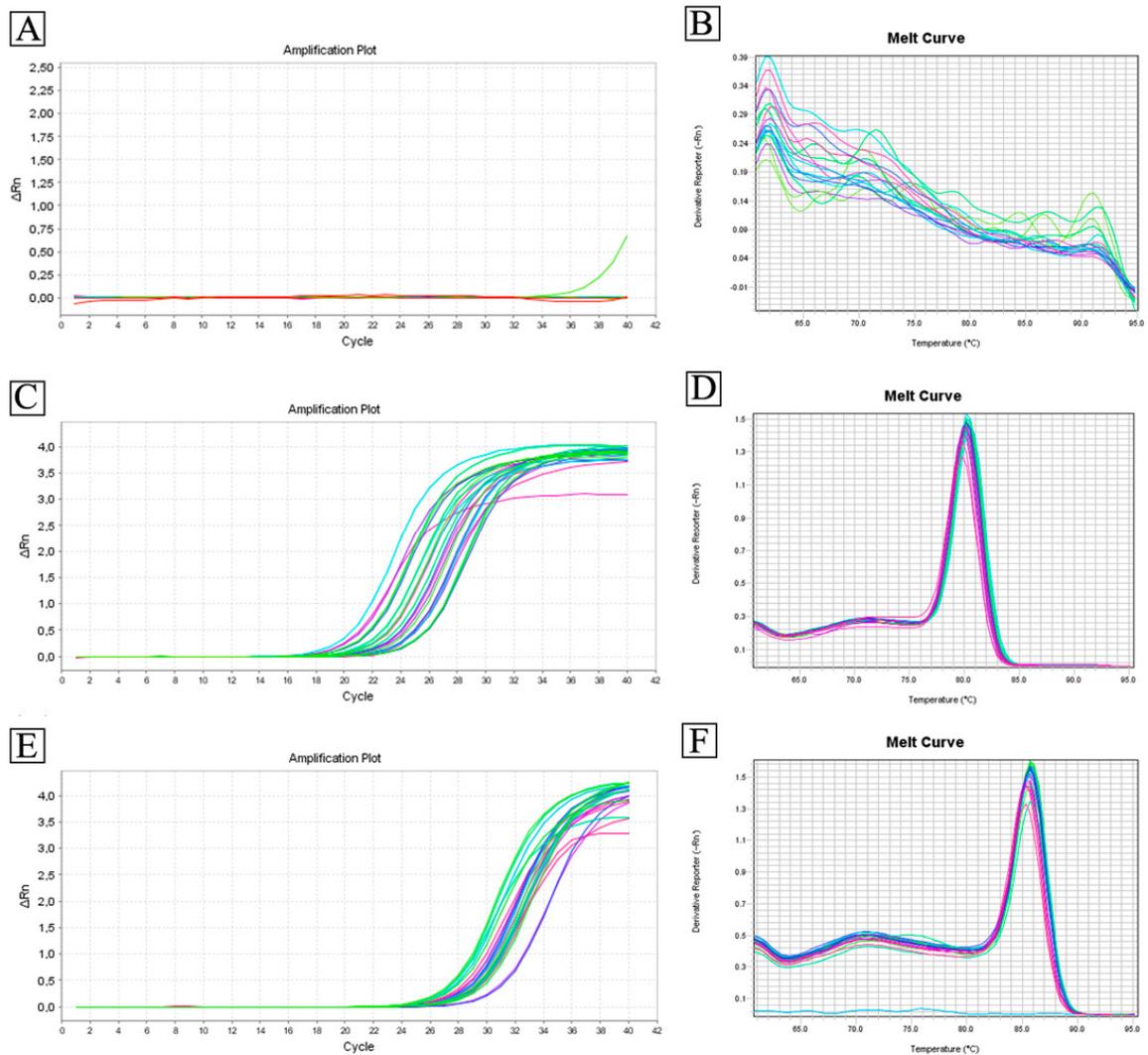


Figura 26 Gráficos mostrando ausência de contaminação com DNA genômico e amplificação dos genes de referência ACT2 e PD00569. A e B: Gráfico e curva de dissociação da RT-qPCR feita com um *pool* de todos os RNAs tratados com DNase para verificar contaminações com DNA genômico utilizando o primer de referência PD00569. Gráficos de amplificação dos genes de referência ACT2 (C) e sua curva de dissociação (D), e gráficos de amplificação do gene de referência PD00569 (E) e sua curva de dissociação (F).

Os quatro primers dos genes de referência, predicted 40S ribosomal protein S27-2 (*PD00380*), eukaryotic initiation factor 4A (*EIF2*), manganese superoxide dismutase (*PD00569*), actin/mreB/sugarKinase/HSP70 superfamily (*ACT2*) foram avaliados para verificar sua viabilidade para uso na expressão gênica no acessos testados. Os primers para *PD00380* produziram amplificação de produto inespecífico e os primers para *EIF2*

não apresentaram produto de amplificação. Assim, estes primers foram excluídos das análises e os primers PD00569 e ACT2 foram utilizados (Figura 2).

Com a finalidade de avaliar a estabilidade dos genes candidatos e de referência, foi utilizado o software geNorm que calcula o valor da estabilidade da expressão gênica (M), baseado na média geométrica dos genes testados e na média de variação par a par de um gene contra todos os outros nas diferentes amostras. O software classifica os genes de acordo com seu valor de M. Assim, quanto menor o valor de M, mais estável é a sua expressão. Os resultados mostraram que os genes com o menor valor de M foram os genes *PD00569* e *ACT2* (Figura 3). Portanto, estes foram utilizados para a normalização das expressões relativas.

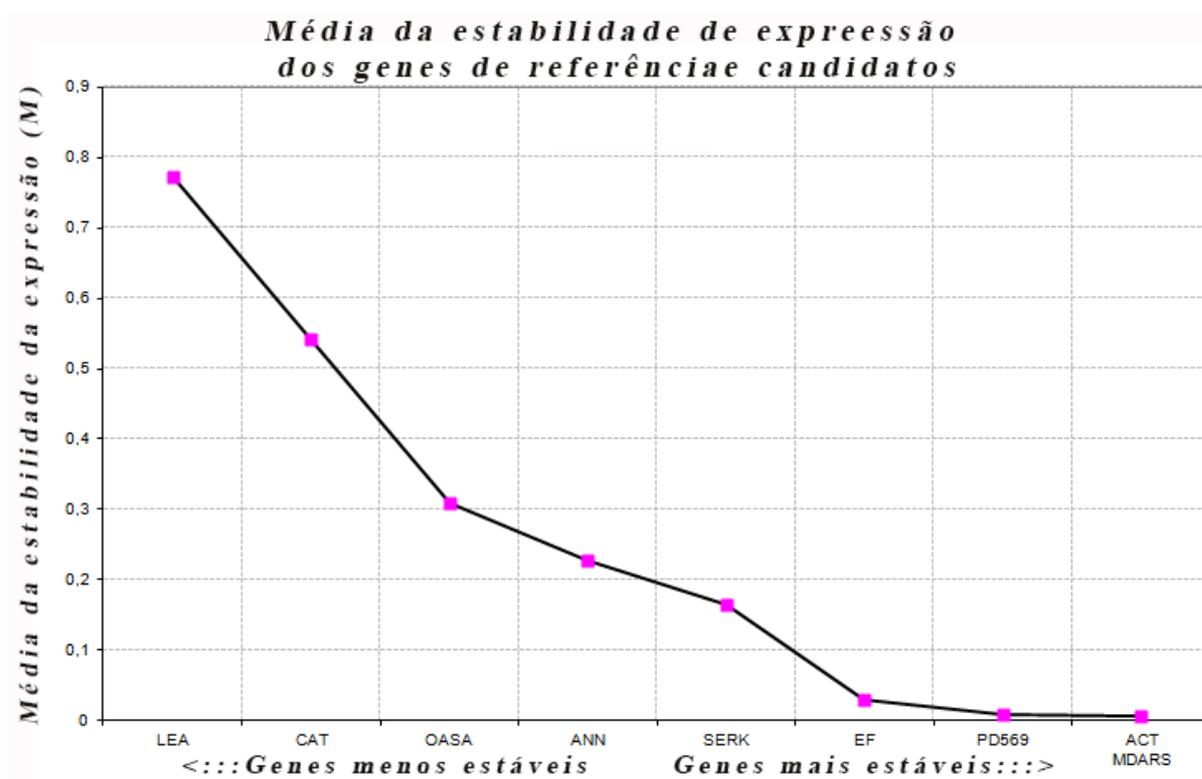


Figura 27 Média da estabilidade da expressão dos genes de referência e genes candidatos.

Após a confirmação de ausência de contaminação com DNA genômico foi feita a análise da expressão relativa por RT-qPCR e análise da curva de dissociação (Curva de Melting) dos 29 genes candidatos com possível envolvimento na aquisição de competência embriogênica. A análise das curvas de melting indicou que dos 29 pares de

primers utilizados para amplificar os genes candidatos, 16 foram específicos na amplificação, gerando um único produto de PCR. Nesse sentido, foram selecionados sete genes candidatos envolvidos com desenvolvimento e estresse da planta com tamanho desejado de amplicon, indicando especificidade dos primers em todos os tempos de coleta (Figura 4). Portanto, esses sete genes seguiram para as análises de expressão relativa por RT-qPCR.

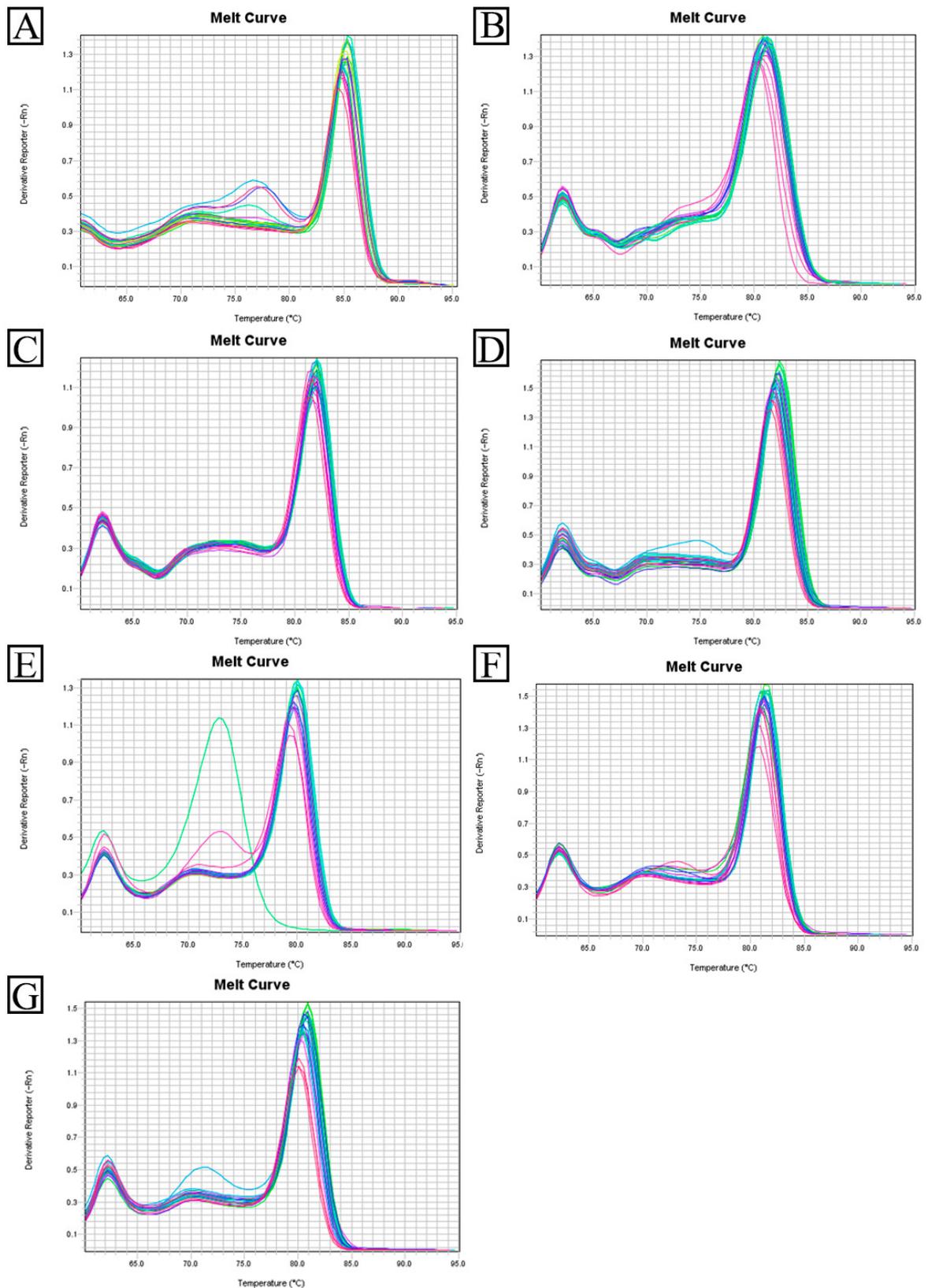


Figura 28 Curva de dissociação da amplificação (*Melt curve*) dos sete genes candidatos que apresentaram amplificação em todos os acessos e tempos de coleta. A: *SERK*, B: *OASA*, C: *EF1*, D: *ANN1*, E: *LEA*, F: *CAT2* e G: *MDAR5*.

### 3.1.1 Comparação da expressão relativa no acesso responsivo (R) e não responsivo (NR)

Visando avaliar a expressão diferencial de genes potencialmente envolvidos na indução de calos em macaúba e compreender os processos moleculares envolvidos, foram selecionados sete genes para a análise da expressão relativa em dois acessos contrastantes para a formação de calos. Os genes avaliados foram separados em categorias segundo Santos et al. (2018), em genes relacionados ao desenvolvimento: *SERK*, *OASA*, *EF1* e *ANN1*, e genes relacionados a estresse: *LEA*, *CAT2* e *MDAR5*. Para a análise da expressão relativa foram utilizados os genes de referência *ACT2* (Xia et al. 2014) e *PD00569* (Chan et al. 2014) como genes normalizadores.

Os resultados obtidos mostraram que todos os genes envolvidos com o desenvolvimento da planta analisados neste estudo, tiveram suas expressões negativamente reguladas em 0 DAI e positivamente reguladas aos 120 DAI quando o acesso R foi comparado com o acesso NR (Figura 5). Esse aumento em expressão destes genes após a indução possivelmente indicam que os mecanismos de resposta à formação de calos foram ativados no acesso R. Os genes relacionados a estresse tiveram diferentes padrões de expressão, enquanto o gene *LEA* apresentou uma tendência de expressão diminuída em 0 DAI e 120 DAI o gene *CAT2* apresentou uma tendência de expressão aumentada no mesmo período, e o gene *MDAR5* apresentou uma tendência de expressão diminuída aos 0 DAI e aumentada aos 120 DAI.

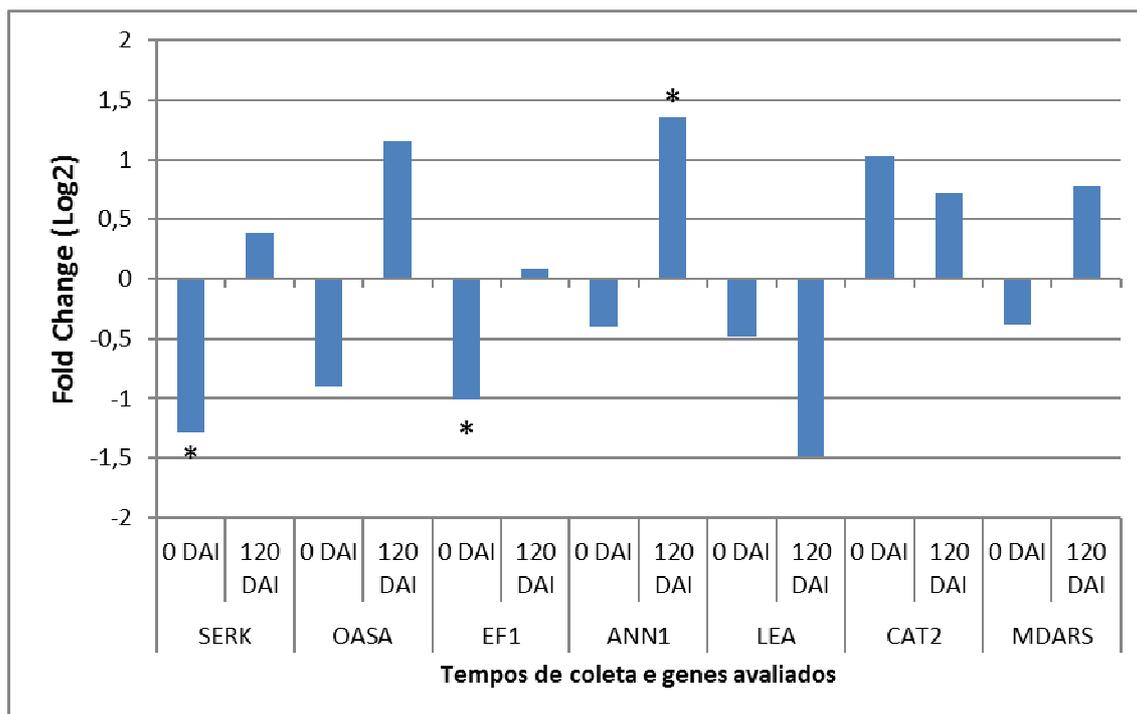


Figura 29 Análise da expressão relativa dos genes candidatos comparando o acesso R x NR (Responsivo e Não-responsivo) aos 0 DAI e 120 DAI (Dias após indução) em cada estágio de coleta. Barras com \* indicam expressão significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2 Time-course da expressão relativa dos acessos R e NR

Visando observar a expressão dos sete genes potencialmente envolvidos na indução de calos em macaúba, uma análise da expressão relativa para os dois acessos foi realizada utilizando o material antes da indução (0 DAI) de cada acesso como controle para comparar com o material aos 120 dias após a indução (120 DAI). Os resultados da análise da expressão relativa dos genes nesse período para cada acesso revelaram que os genes de desenvolvimento *SERK* e *EF1* apresentaram expressão significativamente diminuída aos 120 DAI nos dois acessos, enquanto os genes *OASA* e *ANN1* apresentaram expressão significativamente aumentada no acesso R e uma tendência positiva no acesso NR (Figura 6). Foi possível observar ainda que o gene de estresse *LEA* apresentou uma tendência a expressão aumentada no acesso NR, enquanto o acesso R apresentou uma tendência expressão diminuída, enquanto os genes *CAT2* e *MDAR5* apresentaram expressão aumentada significativamente nos dois acessos.

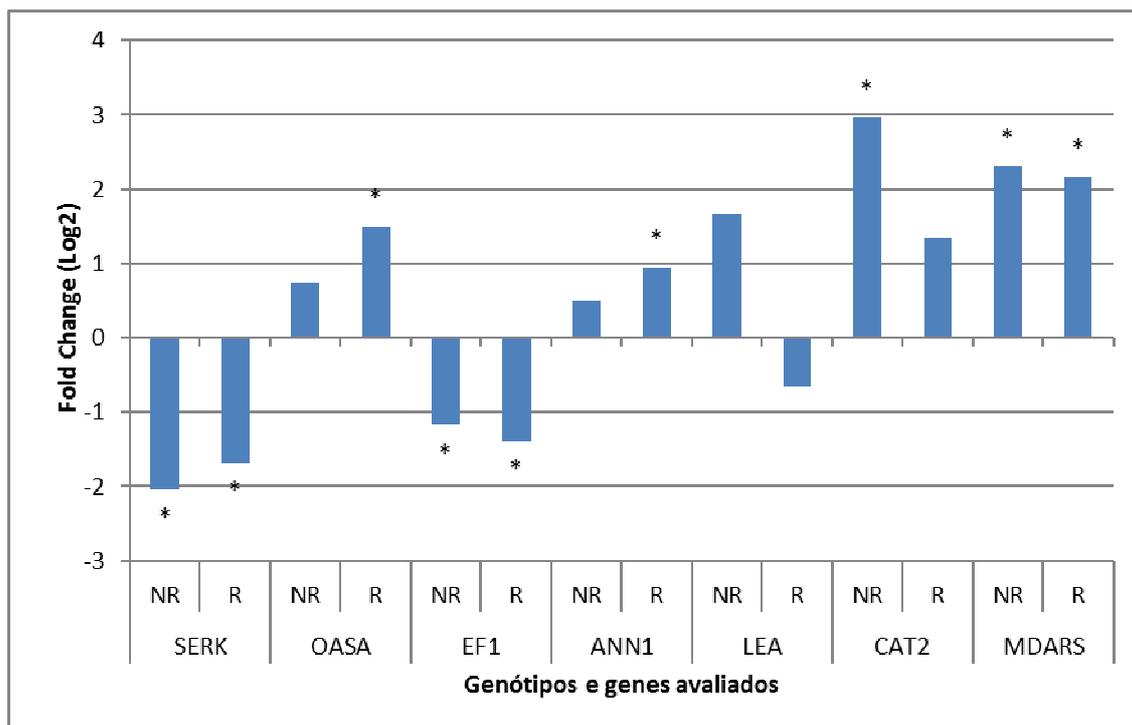


Figura 30 Análise da expressão relativa dos genes candidatos aos 120 DAI (dias de indução) dos acessos R e NR (Responsivo e Não-responsivo), utilizando o tempo inicial como controle, *time-course*. Barras com \* indicam expressão significativa.

### 3.2 Hibridização *in situ* do gene SERK

#### 3.2.1 Clonagem e seqüenciamento do gene SERK

Foi obtido o gene *SERK* parcialmente a partir da reação de RT-PCR utilizando os *primers* de *Cocos nucifera* descritos por Pérez-Núñez et al. (2009). A quantificação da amostra com espectrofotômetro apresentou uma concentração de aproximadamente 2,5 ng/μL, assim como a análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 7).

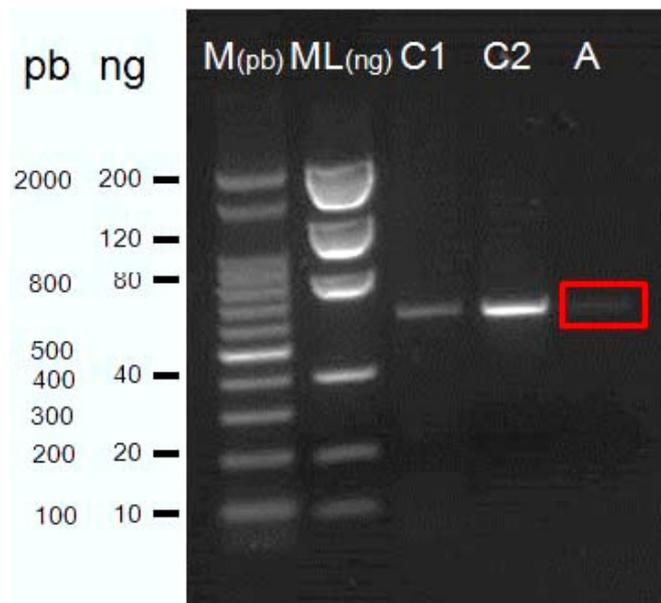


Figura 31. Eletroforese em gel de agarose para a confirmação do gene *SERK* isolado a partir de calos embriogênicos de *Acrocomia aculeata*. M: Marcador 100 plus Ladder ML: Marcador DNA Low Mass (concentração em 4  $\mu$ L); C1 e C2: Controle 1 e 2, A: Banda da amostra do gene *SERK* isolado destacado em vermelho.

O gene *SERK* em *Acrocomia aculeata*, obtido com 586 pb após sequenciamento, apresentou seqüências de nucleotídeos altamente conservadas, quando comparadas com outras espécies, tais como as palmeiras: *Elaeis guineenses* (*EgSERK1*), *Cocos nucifera* (*CnSERK*) e *Phoenix dactylifera* (*PdSERK2*), com identidades de 98% e E-value 0,0. Foi realizado também, o alinhamento das seqüências de aminoácidos (Figura 8), resultando em 99% de semelhança com *Elaeis guineensis* e *Cocos nucifera* (acessos: XM\_010918641.1, AY791293.2, respectivamente) e 96% com *Phoenix dactylifera* (acesso: XM\_008813000.2).



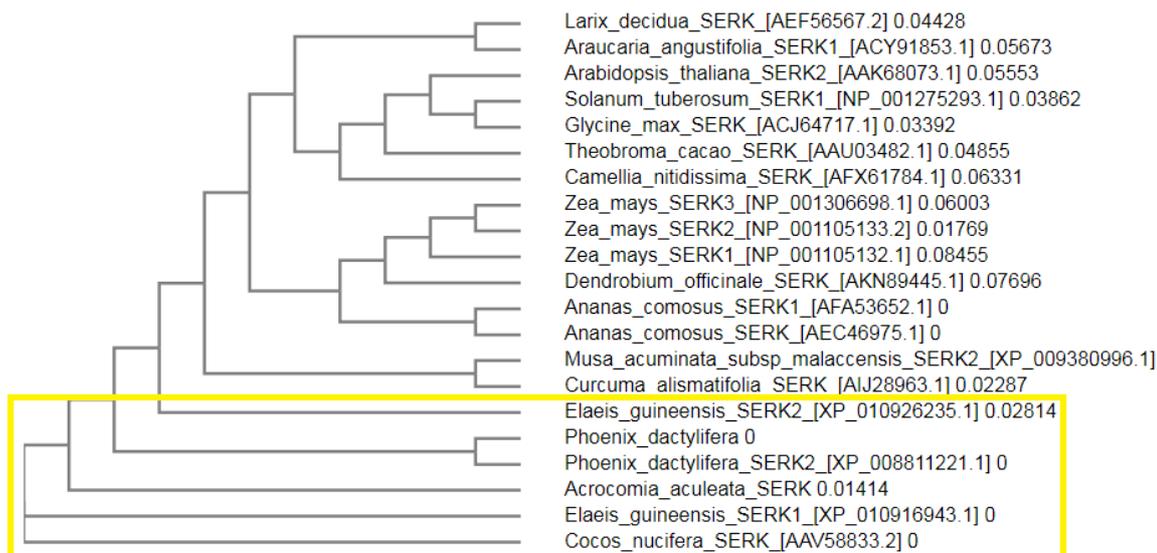


Figura 33. Filogenia de 21 seqüências de aminoácidos da família do gene *SERK* em relação ao gene da macaúba (*Acrocomia aculeata*) com respectivos acessos no NCBI.

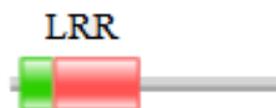


Figura 34 Representação esquemática dos domínios da proteína de AacSERK de acordo com o gene parcial obtido e desenhado utilizando o software *Search Domain Pfam*. LRR: *Leucine Rich Repeat*.

### 3.2.2 Teste com laranja de acridina e localização da expressão de *SERK* por hibridização *in situ*

O tecido escolhido para hibridização possuía parte da folha com calo (Figura 11A). O teste com o corante laranja de acridina em secções de calos de macaúba, mostrou coloração laranja no citoplasma e nucléolo, e coloração esverdeada no núcleo das células nos tecidos analisados. A coloração laranja indica presença de RNA total e demonstrou que o tecido, após o processamento, ainda possui seu RNA preservado, sendo a ausência deste um fator limitante para a hibridização (Figura 11B). Na folha, após hibridização com a sonda senso, não foi observado sinal de hibridização (Figura 11C), enquanto após hibridização com a sonda antisenso, coloração azul arroxeadada foi observada principalmente nos feixes vasculares, indicando ocorrer a expressão de *SERK* nesta região (Figura 11D). Em calos, a hibridização com a sonda senso também não

resultou em sinal (Figura 11E) enquanto a hibridização com a sonda antisense resultou em sinal hibridização (Figura 11F).

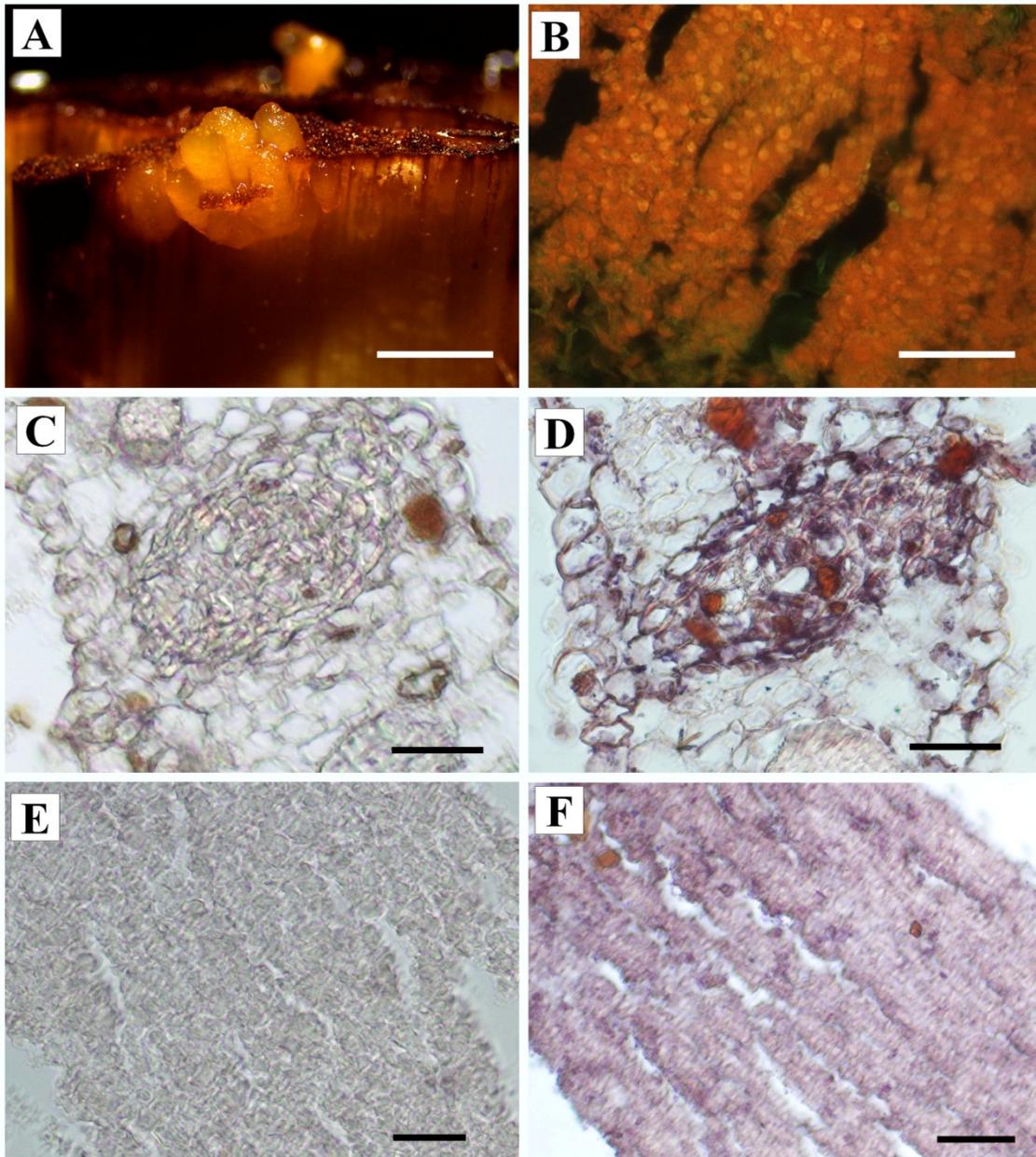


Figura 35. Folha imatura com calo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e localização da expressão do gene *SERK* por hibridização *in situ* em cortes histológicos. A: Folha imatura com calo de macaúba separados para a hibridização *in situ*; B: Cortes histológicos evidenciando a presença de RNA total (coloração laranja) após teste com laranja de acridina; C,D: Cortes histológicos da região da nervura da folha que foram utilizados em C para controle da hibridização *in situ* utilizando sonda Senso, não apresentando hibridização, e em D apresentando sinal hibridização, após hibridização *in situ* utilizando sonda anti-Senso; E, F: Cortes histológicos de calos que utilizados em E para controle da hibridização utilizando sonda Senso, sem apresentar sinal de

hibridização *in situ*, e F apresentando sinal de hibridização *in situ* utilizando sonda anti-Senso. Escalas: A: 0,5 mm, B, C e D: 40  $\mu\text{m}$ . E e F: 200  $\mu\text{m}$ .

## 4 Discussão

### 4.1 Expressão gênica de genes candidatos

O presente trabalho indica que as respostas da expressão diferencial de genes entre o acesso responsivo e não responsivo e sua comparação após 120 dias de indução podem estar relacionados com indução da embriogênese somática em macaúba. Assim como descrito por Santos et al. (2018), os sete genes analisados foram separados segundo a análise de ontologia gênica (GO) para se obter sua classificação funcional. Os genes avaliados neste estudo apresentam importantes papéis relacionados com respostas ao desenvolvimento e estresse. Estes genes parecem participar no controle do estresse e adaptação dos genótipos à condição *in vitro* imposta durante a indução da calogênese visando a embriogênese somática.

#### 4.1.1 Genes associados com desenvolvimento

Os genes envolvidos com o desenvolvimento segundo a classificação pela ontologia gênica foram: somatic embryogenesis receptor kinase 2-like (*SERK*, GO: 0007165 e GO: 0006468), cysteine synthase (*OASA*, GO: 0006535), elongation factor 1-alpha-like (*EF1*, GO: 0006414), *ANN1* annexin D1-like.

Entre os genes envolvidos na indução da embriogênese somática descritos aqui, o gene *SERK* tem um papel que destaca por ser considerado como um marcador molecular para embriogênese somática (Schmidt et al. 1997; Somleva et al. 2000; Kumar e Van Staden 2019). Os resultados apresentados sugerem que a expressão desse gene está relacionada à calogênese em macaúba, uma vez que o acesso mais responsivo apresentou expressão maior após 120 dias de indução de calos, embora menor que antes da indução. O mesmo foi observado por Santos et al. (2018) ao comparar a expressão do gene *SERK* em dois genótipos de palma de óleo que apresentam diferentes respostas à calogênese.

Pérez-Núñez et al. (2009) relata que a expressão do gene *CnSERK* em tecidos somáticos, assim como em calos não embriogênicos, ocorreu em níveis inferiores aos observados em tecidos embriogênicos e que sua expressão ocorreu em centros meristemáticos, onde as estruturas embriogênicas são formadas. Dessa forma, estes resultados podem explicar o nível menor de expressão quando comparado o *time-course*

nos tecidos avaliados no presente trabalho, uma vez que o gene *SERK* apresentou níveis de expressão menores após a indução.

Por sua vez, Pérez-Núñez et al. (2009) descreve que os tecidos embriogênicos que mais expressaram o gene *SERK* formaram os embriões somáticos, sugerindo que a expressão de *CnSERK* poderia ser usada como marcador de células competência para formar embriões somáticos em tecidos de coco cultivados *in vitro*. Isso também foi verificado por Santos et al. (2005), onde os autores sugerem fortemente que o *TcSERK* é um gene funcional que desempenha um papel importante no desenvolvimento de embriões de cacau.

Hecht et al. (2001) sugerem que o *AtSERK1* poderia ser um componente de uma via de sinalização da embriogênese, que é recrutado a partir de uma via que opera normalmente durante o desenvolvimento do óvulo. Portanto, as células competentes podem conter um receptor inativo, que é ativado pela presença do ligante adequado para ativar o programa de embriogênese. Assim como observado por Baudino et al. (2001) em culturas *in vitro* de milho, ambos os genes *ZmSERK1* e *ZmSERK2* foram expressos em tecidos embriogênicos e não embriogênicos. Já *in vivo*, *ZmSERK1* apresenta expressão em tecidos reprodutivos. Como descrito por Santiago et al. (2013), as proteínas SERKs abrigam domínios conservados que permitem estabelecer interações específicas com diferentes receptores quinases.

Outro gene avaliado neste trabalho e que pode estar relacionado à calogênese em macaúba é o gene *OASA*. Este gene teve sua expressão regulada negativamente em 0 DAI e positivamente em 120 DAI no acesso responsivo (R) quando comparado ao não responsivo (NR), além de ser mais expresso ao longo tempo. Este resultado está em conformidade com o observado por Santos et al. (2018) em palma de óleo, que observou que o genótipo responsivo apresentou maiores níveis de expressão para esse gene. O gene *OASA* é relacionado ao processamento de proteínas que estão envolvidas como reguladores da expressão gênica, no controle da proliferação celular e no contexto da resistência ao estresse oxidativo, como doador de equivalentes redutores para a eliminação de espécies reativas de oxigênio (*ROS*, *Reactive oxygen species*) (May et al. 1998).

As *ROS* apresentam uma dupla função em muitos processos de desenvolvimento da planta, que dependem do nível e da distribuição dessas moléculas. As altas concentrações de *ROS* são tóxicas, levando a danos oxidativos. No entanto, em

concentrações apropriadas, podem atuar como moléculas sinalizadoras que regulam muitas respostas fisiológicas e de desenvolvimento (Mittler et al. 2011; Kocsy et al. 2013). Assim, estudos têm mostrado que fatores de estresse como as ROS desempenham um papel importante durante a embriogênese somática (Karami e Saidi 2010; Jin et al. 2014; Zhou et al. 2016)

Dessa forma, a expressão do gene *OASA*, além de atuar também na regulação do estresse oxidativo, podendo estimular a diferenciação celular em presença de auxina, promove a formação de embriões somáticos (Youssefian et al. 2002; Pan et al. 2010). Assim, isto pode explicar o aumento da expressão deste gene no acesso responsivo, sugerindo que este gene é um potencial marcador da indução de calos.

Durante a síntese de proteínas, a fase de tradução é dividida em três etapas: iniciação, alongamento e término. Nestas etapas, diversos fatores envolvidos regulam a síntese de proteínas. Dentre estes fatores, o fator de alongamento eucariótico 1A (*EFI*) catalisa a primeira etapa do ciclo de alongamento (Kaziro et al. 1991; Lamberti et al. 2004). Dessa forma, a maior expressão do gene *EFI* pode estar relacionada à maior síntese proteica nos tecidos. Assim como observado por Santos et al. (2018), este gene possui maior expressão no genótipo responsivo (R).

A *ANN1* é uma proteína multifuncional que interage com os componentes da membrana, que estão envolvidos na organização estrutural da célula, atuando na sinalização e no controle do crescimento intracelular (Moss e Morgan 2004). Há fortes evidências de que eles também estão diretamente envolvidos divisão celular (Gallardo et al. 2003).

A proteína Annexin D1 tem sido relacionada à embriogênese somática. Esta proteína foi identificada em embriões somáticos de mandioca (Baba et al. 2008). Almeida et al. (2019), ao avaliar o perfil de proteínas em dois genótipos de palma de óleo, observaram que o genótipo mais responsivo apresentava nível superior da proteína. Este resultado pode estar relacionado com o observado aqui, onde o acesso mais responsivo apresentou maior expressão desse gene após 120 dias de indução. Possivelmente, este resultado está envolvido com a formação de calos devido à maior divisão celular nessa fase. Esse aumento da expressão destes genes, após a indução, possivelmente indicam que os mecanismos de resposta à formação de calos que foram ativados no acesso responsivo apresentam maiores níveis de expressão dos genes candidatos avaliados do que no acesso não responsivo.

#### 4.1.2 Genes associados com o estresse

Os genes expressos durante a indução de calos em macaúba associados com o estresse segundo a classificação pela ontologia gênica foram: catalase isozyme 2 (*CAT2*, GO:0098869, GO:0055114 e GO:0042542), monodehydroascorbate reductase mitochondrial 5 isoform X1 (*MDAR5*, GO:0055114) e putative late embryogenesis abundant (LEA) protein (*LEA*, GO:0009269 e GO:0009735). Estes genes apresentaram diferentes respostas de expressão, sendo que, de forma geral, o gene *LEA* apresentou expressão diminuída no acesso responsivo e aumentada no não responsivo, enquanto os genes *CAT2* e *MDAR5* apresentaram expressão aumentada nos dois acessos, após a indução de calos.

Os genes *CAT2* e *MDAR5* apresentaram uma tendência similar aos dados apresentados por Santos et al. (2018) e dados proteômicos obtidos por Almeida et al. (2019). Estes genes apresentaram maior expressão em genótipos mais responsivos à formação de calos. De acordo com Araldi et al. (2016) e Zhou et al. (2016), a catalase é uma proteína antioxidante que age na regulação de *ROS* (*Reactive oxygen species*) e sua atividade reduzida resulta no acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A principal função da catalase no tecido foliar é a quebra de  $H_2O_2$  nos peroxissomos resultando em água e oxigênio estável, removendo dessa forma  $H_2O_2$  formado sob condições de estresse (Mhamdi et al. 2010).

O gene *LEA* é comumente associado a respostas ao processo da embriogênese somática e expresso durante fases mais tardias (Godoy et al. 1994). Além disso, as proteínas LEA são acumuladas principalmente nas fases tardias do desenvolvimento de sementes e em tecidos vegetativos em resposta ao estresse exógeno (Hundertmark e Hinch 2008, Banerjee e Roychoudhury 2016). No presente trabalho, este gene apresentou níveis menores de expressão no genótipo responsivo, sugerindo dessa forma que, nas condições testadas aqui, sua expressão pode estar envolvida em diferentes respostas.

## 4.2 Caracterização do gene *SERK* e Hibridização *in situ*

Com a obtenção do gene *SERK* a partir de calos embriogênicos de *Acrocomia aculeata* e com seu seqüenciamento, sugere-se aqui a nomenclatura para o gene na espécie de *AacSERK*, e assim será tratada neste trabalho.

A análise da seqüência parcial obtida mostrou que o *AacSERK* codifica parte uma proteína *SERK* com os domínios de repetição rico em leucinas (LRR). Este domínio de repetição rico em leucina do receptor de membrana quinase é responsável pela ligação com diversos sinais extracelulares, como hormônios esteróides, peptídeos e proteínas. No entanto, ainda não se sabe como a ligação de esteróides na superfície da célula ativa o domínio de quinase citoplasmática (Santiago et al. 2013a).

Assim como descrito por Pérez-Núñez et al. (2009) para o gene *CnSERK*, Shah et al. (2001) para o gene *AtSERK1* e por Ma et al. (2014) para o gene *AcSERK3*, os domínios do gene consistem basicamente em um peptídeo sinal, um domínio de leucina *Zipper*, cinco regiões ricas em leucina (LRR), uma região rica em serina-prolina (domínio SPP). O domínio SPP é uma região que se destacam por distinguem proteínas *SERK* de outras proteínas pertencentes à família LRR-RLK. Além disso, as proteínas *SERK* comumente apresentam um único domínio transmembrana, o domínio *Kinase* com 11 subdomínios e, finalmente, a região do C terminal.

A análise filogenética da similaridade dos aminoácidos apresentou que o *AacSERK* está próximo ao *CnSERK*, sugerindo assim sua proximidade na expressão e função. No mesmo grupo, é encontrado o *SERK1* e *SERK2* das espécies *P. dactylifera* e *E. guineensis*, ambos os registros são derivados de seqüências genômicas (acessos: NW\_008247047.1 e NC\_025995.1, respectivamente). A maior similaridade desta seqüência foi observada em espécie da família *Arecaceae*.

Além disso, a alta similaridade da seqüência *AacSERK* entre e as proteínas *SERK* de outras espécies, sugerem que este gene desempenha algum papel na embriogênese somática, como foi proposto para estes ortólogos, tais como *AtSERK1* (Hecht et al. 2001), *ZmSERK1* (Baudino et al. 2001), *TcSERK* (Santos et al. 2005) e *OsSERK1* (Hu et al. 2005).

A hibridização *in situ* é uma técnica utilizada para determinar os padrões de distribuição celular de transcritos de mRNA em secções dos tecidos. Essa técnica fornece respostas de alta resolução da distribuição de transcritos alvo e ainda com capacidade de diferenciar padrões de expressão de genes intimamente relacionados. No

entanto, devido à vasta gama de aplicações, infelizmente não existe um protocolo universal único (McFadden 1995; Tsai and Harding 2013), sendo necessário sempre um ajuste de protocolo para cada situação.

O experimento de hibridização *in situ* da folha revelou a expressão do gene *SERK* principalmente nos feixes vasculares. Esse resultado pode estar relacionado ao princípio de formação de calos. Em macaúba, os calos primários são formados nos feixes vasculares de menor calibre, assim como relatado por Meira et al. (2018) ao demonstrar anatomicamente a formação dos calos em *A. aculeata*. O mesmo é relatado por Lee et al. (2018) ao examinar a localização do mRNA *EgSERK I* em folhas imaturas de *Elaeis guineensis* por hibridização *in situ*, detectando sinais positivos em feixes vasculares. Este mesmo padrão de expressão é observado em outras espécies. Resultados semelhantes foram relatados por Nolan et al. (2009) em *Medicago truncatula* (*MtSERK I*) e por Ge et al. (2010) em *Citrus sinensis* (*CitSERK1*), onde estes genes foram expressos em células circundando tecidos vasculares e nas bordas de corte do explante foliar.

Assim como descrito por Alves et al. (2007), após a coloração com o laranja de acridina, o RNA torna-se laranja sob luz UV, enquanto o DNA apresenta coloração verde. Dessa forma, foi possível observar que o RNA estava bem preservado no citoplasma, assim como no nucléolo das células.

## 5 Conclusão

Os genes *SERK*, *OASA*, *EF1*, *ANN1*, *LEA* e *MDAR5* parecem estar envolvidos na formação de calos em macaúba, apresentando diferentes níveis de expressão. Assim, uma vez que aparecem expressos também em outras espécies, como a palma de óleo, os genes testados aqui podem ser explorados futuramente como potenciais marcadores da embriogênese somática nesta espécie. Assim como os genes de referência utilizados aqui (*ACT2* e *PD00569*) são normalizadores da expressão e podem ser utilizados.

Os resultados da expressão do gene *AacSERK* sugerem que este pode estar associado à calogênese por meio da reprogramação e desdiferenciação de células que envolvem feixes vasculares em explantes foliares para formar o calo primário, podendo ser usado como marcador molecular.

Os resultados descritos aqui são inéditos e, no nosso entendimento, importantes como indicativos para aplicação da técnica de hibridização *in situ* em macaúba no

sentido de facilitar a localização das regiões de origem dos embriões somáticos, podendo a técnica ser utilizada para a detecção do início da aquisição da competência embriogênica a partir de células somáticas.

## 6 Referências Bibliográficas

- Almeida RF, Santos IR, Meira FS, et al (2019) Differential protein profiles in interspecific hybrids between *Elaeis oleifera* and *E. guineensis* with contrasting responses to somatic embryogenesis competence acquisition. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 0:0. doi: 10.1007/s11240-018-01545-8
- Alves ER, Carneiro VTC, Dusi DMA (2007) *In situ* localization of three cDNA sequences associated with the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. *Protoplasma* 231:161–171. doi: 10.1007/s00709-007-0253-z
- Araldi CG, Coelho CMM, Gaziola SA, Azevedo RA (2016) Storage elicits a fast antioxidant enzyme activity in *Araucaria angustifolia* embryos. *Acta Physiol Plant*. doi: 10.1007/s11738-016-2219-2
- Arkcoll D (1990) New Crops from Brazil. *Adv new Crop* 367–371.
- Baba AI, Nogueira FCS, Pinheiro CB, et al (2008) Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Sci* 175:717–723. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.07.014
- Banerjee A, Roychoudhury A (2016) Group II late embryogenesis abundant (LEA) proteins: structural and functional aspects in plant abiotic stress. *Plant Growth Regul* 79:1–17. doi: 10.1007/s10725-015-0113-3
- Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, et al (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213:1–10. doi: 10.1007/s004250000471
- Cardoso A, Laviola BG, Santos GS, et al (2017) Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. *Ind Crops Prod* 107:573–580. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.04.023
- César ADS, Almeida FDA, De Souza RP, et al (2015) The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaúba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. *Renew Sustain Energy Rev* 49:1213–1220. doi: 10.1016/j.rser.2015.04.125
- Chan PL, Rose RJ, Abdul Murad AM, et al (2014) Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in oil palm elite planting materials propagated by tissue

- culture. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0099774
- Del Río JC, Evaristo AB, Marques G, et al (2016) Chemical composition and thermal behavior of the pulp and kernel oils from macauba palm (*Acrocomia aculeata*) fruit. *Ind Crops Prod* 84:294–304. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.02.018
- Dusi DMA (2015) Hibridização *in situ* para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais. In: Ana Cristina Miranda Brasileiro VT de CC (ed) *Manual de Transformação de Plantas*, 2nd edn. Embrapa, Brasília, pp 303–327
- Eeuwens CJ (1976) Mineral Requirements for Growth and Callus Initiation of Tissue Explants Excised from Mature Coconut Palms (*Cocos nucifera*) and Cultured *in vitro*. *Physiol Plant* 36:23–28. doi: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb05022.x
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1849:385–402. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.07.005
- Gallardo K, Signor C Le, Vandekerckhove J, et al (2003) Proteomics of *Medicago truncatula* Seed Development Establishes the Time Frame of Diverse Metabolic Processes Related to Reserve Accumulation. *Plant Physiol* 133:664–682. doi: www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.025254
- Ge XX, Fan GE, Chai LJ, Guo WW (2010) Cloning, molecular characterization and expression analysis of a SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE gene (CitSERK1-like) in Valencia sweet orange. *Acta Physiol Plant* 32:1197–1207. doi: 10.1007/s11738-010-0515-9
- Godoy JA, Lunar R, Torres-Schumann S, et al (1994) Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol* 26:1921–1934. doi: 10.1007/BF00019503
- Gomes HT, Bartos PMC, Silva CO, et al (2014) Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Growth Regul* 74:199–208. doi: 10.1007/s10725-014-9901-4
- Guan Y, Li S-G, Fan X-F, Su Z-H (2016) Application of somatic embryogenesis in

- woody plants. *Front Plant Sci* 07:1–12. doi: 10.3389/fpls.2016.00938
- Hecht V, Vielle-Calzada J-PP, Hartog M V., et al (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. *Plant Physiol* 127:803–816. doi: 10.1104/pp.010324.In
- Hu H, Xiong L, Yang Y (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* 222:107–117. doi: 10.1007/s00425-005-1534-4
- Hundertmark M, Hinch DK (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9:1–22. doi: 10.1186/1471-2164-9-118
- Ikeuchi M, Favero DS, Sakamoto Y, et al (2019) Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annu Rev Plant Biol* 70:annurev-arplant-050718-100434. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100434
- Jin F, Hu L, Yuan D, et al (2014) Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: Evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnol J* 12:161–173. doi: 10.1111/pbi.12123
- Karami O, Saidi A (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol Biol Rep* 37:2493–2507. doi: 10.1007/s11033-009-9764-3
- Karim R, Tan YS, Singh P, Khalid N (2018) Expression and DNA methylation of SERK , BBM , LEC2 and WUS genes in *in vitro* cultures of *Boesenbergia rotunda* ( L . ) Mansf . *Physiol Mol Biol Plants*. doi: 10.1007/s12298-018-0566-8
- Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, et al (1991) SIGNAL-TRANSDUCING STRUCTURE AND FUNCTION OF GTP-BINDING PROTEINS. *Annu Rev Biochem* 60:349–400.
- Kocsy G, Tari I, Vanková R, et al (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Sci* 211:77–91. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.07.004

- Kumar V, Van Staden J (2019) Multi-tasking of SERK-like kinases in plant embryogenesis, growth, and development: current advances and biotechnological applications. *Acta Physiol Plant* 41:31. doi: 10.1007/s11738-019-2819-8
- Lamberti A, Caraglia M, Longo O, et al (2004) The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: Review article. *Amino Acids* 26:443–448. doi: 10.1007/s00726-004-0088-2
- Lee F, Ong-Abdullah M, Ooi S, et al (2018) Cloning and characterization of Somatic Embryogenesis Receptor Kinase I (EgSERK I) and its association with callus initiation in oil palm. *Vitr Cell Dev Biol - Plant*. doi: 10.1007/s11627-018-9942-x
- Lima NE de, Carvalho AA, Meerow AW, Manfrin MH (2018) A review of the palm genus *Acrocomia*: Neotropical green gold. *Org Divers Evol* 1–11. doi: 10.1007/s13127-018-0362-x
- Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (2016) Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications.
- Ma J, He YH, Hu Z, et al (2014) Characterization of the third SERK gene in pineapple (*Ananas comosus*) and analysis of its expression and autophosphorylation activity *in vitro*. *Genet Mol Biol* 37:530–539. doi: 10.1590/S1415-47572014000400009
- Magnani E, Jiménez-Gómez JM, Soubigou-Taconnat L, et al (2017) Profiling the onset of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 18:1–12. doi: 10.1186/s12864-017-4391-1
- May M, Vernoux T, Leaver C, et al (1998) Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49:649–667. doi: 10.1093/jexbot/49.321.649
- McFadden GI (1995) *In situ* Hybridization. In: Braith DG-, Bourque D, Bohnert H (eds) *METHODS IN CELL BIOLOGY*. Academic Press, San Diego, pp 165–183
- Meira FS, Luis ZG, de Araújo Silva-Cardoso I de AM, Scherwinski-Pereira JE (2019) Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events. *Flora* 250:59–67. doi: 10.1016/j.flora.2018.11.011

- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, et al (2010) Catalase function in plants: A focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61:4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, et al (2011) ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci* 16:300–309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Moss SE, Morgan RO (2004) Protein family review: The annexins. *Genome Biol* 5:1–8.
- Mukai Y (2017) *In situ* hybridization. In: *Plant Chromosomes*. CRC press, pp 155–170
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2009) Expression of the SOMATIC Embryogenesis receptor-like KINASE1 (SERK1) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 60:1759–1771. doi: 10.1093/jxb/erp046
- Pan Z, Zhu S, Guan R, Deng X (2010) Identification of 2,4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 103:145–153. doi: 10.1007/s11240-010-9762-0
- Pérez-Núñez MT, Souza R, Sáenz L, et al (2009) Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep* 28:11–19. doi: 10.1007/s00299-008-0616-8
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:16–21. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Rekik I, Elleuch A, Kriaa W, Drira N (2013) Molecular cloning and in silico analysis of three somatic embryogenesis receptor kinase mRNA from date palm. *Genetika* 45:837–853. doi: 10.2298/GENSR1303837R
- Santiago J, Henzler C, Hothorn M (2013a) Molecular Mechanism for Plant Steroid Receptor Activation by Somatic Embryogenesis Co-Receptor Kinases. *Science*

(80-) 341:889–892. doi: 10.1126/science.1242468

Santiago J, Henzler C, Hothorn M (2013b) Molecular Mechanism for Plant Steroid Receptor Activation by Somatic Embryogenesis Co-Receptor Kinases. *Science* (80-) 341:889–892. doi: 10.1126/science.1242468

Santos IR, Maximiano MR, Almeida RF, et al (2018) Genotype-dependent changes of gene expression during somatic embryogenesis in oil palm hybrids (*Elaeis oleifera* x *E. Guineensis*). *PLoS One* 13:e0209445. doi: 10.1371/journal.pone.0209445

Santos MDO, Romano E, Yotoko KSC, et al (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci* 168:723–729. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.10.004

Schmidt ED, Guzzo F, Toonen M a, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124:2049–2062. doi: 10.1093/pcp/pci031

Shah K, Gadella Jr TWJ, van Erp H, et al (2001) Subcellular Localization and Oligomerization of the Arabidopsis thaliana Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 Protein. *J Mol Biol* 309:641–655. doi: 10.1006/jmbi.2001.4706

Silva R de C, Carmo LST, Luis ZG, et al (2014) Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Proteomics* 104:112–127. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.013

Somleva MN, Schmidt EDL, De Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep* 19:718–726. doi: 10.1007/s002999900169

Song W, Han Z, Wang J, et al (2017) Structural insights into ligand recognition and activation of plant receptor kinases. *Curr Opin Struct Biol* 43:18–27. doi: 10.1016/j.sbi.2016.09.012

Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells.

Am J Bot 45:653–704. doi: 10.2307/2439728

- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, et al (2010) A practical approach to RT-qPCR publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50:S1--S5.
- Thomas C, Meyer D, Humber C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol Biochem* 42:35–42. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.10.008
- Toorn M Den, Albrecht C, Vries S De (2015) On the Origin of SERKs: Bioinformatics Analysis of the Somatic Embryogenesis Receptor Kinases. *Mol Plant* 8:762–782. doi: 10.1016/J.MOLP.2015.03.015
- Tsai C-J, Harding SA (2013) *In situ* Hybridization. In: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp 339–359
- Vogel G (2005) How does a single somatic cell become a whole plant. *Science* (80- ) 309:86. doi: 10.1126/science.309.5731.86
- Wilkinson DG (1992) *In situ* hybridization :a practical approach. Oxford University Press
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39:75–85. doi: 10.2144/05391RV01
- Xia W, Mason AS, Xiao Y, et al (2014) Analysis of multiple transcriptomes of the African oil palm (*Elaeis guineensis*) to identify reference genes for RT-qPCR. *J Biotechnol* 184:63–73. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.008
- Youssefian S, Nakamura M, Orudjev E, Kondo N (2002) Increased Cysteine Biosynthesis Capacity of Transgenic Tobacco Overexpressing an O-Acetylserine(thiol) Lyase Modifies Plant Responses to Oxidative Stress. *Plant Physiol* 126:1001–1011. doi: 10.1104/pp.126.3.1001
- Zhao S, Fernald RD (2005) Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Comput Biol* 12:1047–1064. doi: 10.1089/cmb.2005.12.1047
- Zhou T, Yang X, Guo K, et al (2016) ROS Homeostasis Regulates Somatic

Embryogenesis via the Regulation of Auxin Signaling in Cotton. *Mol Cell Proteomics* 15:2108–2124. doi: 10.1074/mcp.M115.049338