



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

**Expressão diferencial de genes potencialmente envolvidos
na aquisição da competência embriogênica em palma de
óleo (*E. oleifera* x *E. guineensis*)**

Aluno: Ivonaldo Reis Santos

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Co-orientadores: Angela Mehta/Luciano Paulino da Silva

Brasília – DF

Agosto/2018

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

**Expressão diferencial de genes potencialmente envolvidos
na aquisição da competência embriogênica em palma de
óleo (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Botânica da Universidade de
Brasília como requisito à obtenção do título de
Mestre em Botânica

Ivonaldo Reis Santos

Brasília – DF

Agosto/2018

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

Dissertação de Mestrado, autoria de Ivonaldo Reis Santos, intitulada: **EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA EM PALMA DE ÓLEO (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*)**, apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Botânica pela Universidade de Brasília, em 2018, definida e aprovado pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Orientador
Programa de Pós-Graduação em Botânica - UnB

Dra. Patrícia Messenberg Guimarães
Membro 1
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - EMBRAPA

Dra. Cristiane da Silva Ferreira
Membro 2
Programa de Pós-Graduação em Botânica - UnB

Dr. João Batista Teixeira
Suplente
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - EMBRAPA

“Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança; o seu anjo da guarda”.

Joseph Addison

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Em primeiro lugar a Deus, pela saúde, paz e sabedoria concedida para realizar esse sonho. Agradeço por todos os obstáculos que Deus colocou em meu caminho. Nos momentos de dificuldades posso não compreender, mas quando chego ao topo da montanha, reconheço na paisagem a lição que ele me deu.

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Aos meus queridos pais Maria Domingas dos Reis e José Francisco Lima e aos meus quatro irmãos, que com toda dificuldade que passamos nunca deixaram de me apoiar. Agradeço, pela saúde concedida por Deus, neste tempo de mestrado a minha mãe.

Aos meus orientadores: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, Dra. Angela Mehta e Dr. Luciano Paulino da Silva pela confiança e pela oportunidade de fazer parte da equipe. Em especial, gostaria de agradecer a Dra. Angela Mehta que, desde a minha iniciação científica, nunca deixou de acreditar no meu potencial.

Aos meus amigos e companheiros dos laboratórios de Genômica e Proteômica (LGP) e Cultura de Tecidos 2 (LCT2) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que de alguma forma, contribuíram com o resultado final deste trabalho. Agradeço em especial a Mariana Rocha Maximiano por ter me auxiliado nas análises.

A todos os funcionários e docentes do Departamento de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília. Agradeço a todos os meus professores, pelos ensinamentos e paciência.

A todos os colaboradores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA), onde foi desenvolvida minha dissertação.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante o período do mestrado.

Por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso desta dissertação.

RESUMO

Visando compreender melhor os processos moleculares desencadeados durante as etapas da embriogênese somática (ES) em palma de óleo, a expressão de 29 genes potencialmente envolvidos nesse processo identificados em estudos prévios e a partir da literatura foi investigada por RT-qPCR. O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão diferencial de genes envolvidos com a embriogênese somática em dois genótipos do híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*), contrastantes para a aquisição de competência embriogênica. Foram utilizadas folhas aclorofiladas de dois híbridos F1 interespecíficos (*E. oleifera* x *E. guineensis*) denominados B351733 (responsivo - R) e B352933 (não responsivo - NR) a embriogênese somática. O material utilizado para as análises foi submetido a indução de aquisição de competência embriogênica em meio de Murashige e Skoog (MS), suplementado 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolizada, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel. Nestas condições, os materiais foram coletados nos tempos 0 (antes da indução), 14, 30, 90 e 150 dias após o início da indução (DAI). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os genes avaliados foram negativamente regulados no tempo 14 (DAI), no R em relação ao NR. Também foi possível observar que a maioria dos genes avaliados foram positivamente regulados em 150 DAI, com exceção dos genes *Annexin D1 (ANN1)* e *Pathogenesis-related protein 1-like (PRB1)* que não tiveram uma expressão significativa, e o gene *Pathogenesis-related protein PRB1-3-like (PRB1-3)*, que teve sua expressão diminuída. A análise da expressão relativa dos genes ao longo dos estágios para cada genótipo revelou que no genótipo NR a maioria dos genes foi positivamente regulados em 14 DAI quando comparado com o tempo 0 (antes da indução). Já no genótipo R a maioria dos genes foi negativamente regulado em 14 DAI quando comparados com o tempo 0 DAI. Os resultados obtidos neste estudo corroboram nossa hipótese de que a regulação de genes envolvidos no controle do estresse oxidativo e metabolismo energético são cruciais para a aquisição da competência embriogênica em palma de óleo.

Palavras-chave: Arecaceae, Embriogênese somática, RT-qPCR, metabolismo e estresse oxidativo.

ABSTRACT

To understand the molecular processes triggered during the stages of somatic embryogenesis (SE) in oil palm, the expression of 29 genes potentially involved in this process identified in previous studies and from literature was investigated by RT-qPCR. The objective of this work was to evaluate the differential expression of genes involved in somatic embryogenesis in two interspecific hybrid genotypes (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) contrasting for the acquisition of embryogenic competence. In this study acolorophylated leaves of two interspecific F1 hybrids (*E. oleifera* x *E. guineensis*) called B351733 (Responsive - R) and B352933 (Nonresponsive - NR) to somatic embryogenesis were used. The material used for the analysis was submitted to induction of the acquisition of embryogenic competence in MS culture medium (MS), supplemented with 0,5 g l⁻¹ glutamine; 30 g l⁻¹ sucrose; 0,5 g l⁻¹ of hydrolyzed casein; 2,5 g l⁻¹ of activated carbon; 450 µM picloram and solidified with 2,5 g l⁻¹ phytigel. The plant material was collected at 0 (before induction), 14, 30, 90 and 150 days after induction initiation (DAI). The results obtained in this study showed that the evaluated genes were down-regulated at 14 DAI, in R genotype when compared to NR. It was also possible to observe that most of the evaluated genes were up-regulated at 150 DAI, except Annexin D1 (*ANN1*) and Pathogenesis-related protein 1-like (*PRB1*) genes that were not have significant expression, and the Pathogenesis-related protein PRB1-3-like (*PRB1-3*) was decreased. The relative expression analysis of genes at all stages for each genotype showed that in NR genotype the most of the genes were up-regulated in 14 DAI when compared to 0 DAI (before induction). In R genotype, the most of the genes were down-regulated in 14 DAI when compared to 0 DAI. The results obtained in this study corroborate our hypothesis that the regulation of genes involved in the control of oxidative stress and energy metabolism are crucial for the acquisition of embryogenic competence in oil palm.

Key words: Areaceae, Somatic embryogenesis, RT-qPCR, metabolism and oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos da palma de óleo. Fonte: Ivonaldo Reis Santos.

Figura 2. Cruzamento entre a variedade homozigótica Dura, cujo fruto tem endocarpo espesso, e a variedade Pisifera que possui endocarpo limitado ou ausente. Disponível em: http://www.nature.com/nature/journal/v500/n746/fig_tab/nature12356_F1.html. Acessado em 28 de dezembro de 2017.

Figura 3. *E. oleifera*, *E. guineensis* e híbrido F1 interespecífico. Disponível em: <http://frutasnativasdaamazonia.blogspot.com.br/2012/07/>.

Figura 3. Hábito de crescimento de *E. oleifera*. Disponível em: <http://frutasnativasdaamazonia.blogspot.com.br/2012/07/>.

Figura 4. Figura ilustrativa do material e métodos utilizados neste estudo. Desinfestação do material vegetal (A); meio MS composto por sais e vitaminas (B); explantes foliares dos dois genótipos avaliados nos cinco tempos de coleta (C); maceração dos explantes (D); Purificação de RNA (E) e análise dos genes envolvidos na aquisição de competência embriogênica selecionados (F).

Figura 4. Figura ilustrativa do material e métodos utilizados neste estudo. Desinfestação do material vegetal (A); meio MS composto por sais e vitaminas (B); explantes foliares dos dois genótipos avaliados nos cinco tempos de coleta (C); maceração dos explantes (D); Purificação de RNA (E) e análise dos genes envolvidos na aquisição de competência embriogênica selecionados a partir de estudos preliminares realizados no LGP e LCTII e a partir da literatura (F).

Figura 5. Equipamento e *softwares* utilizados para análise de expressão gênica. Realização dos experimentos de RT-qPCR no termociclador 730 96-well Real-Time PCR Systems (A); Importação dos dados brutos da fluorescência para o *software* Real-time PCR Miner (B); Importação dos dados brutos da fluorescência do *software* Real-time PCR Miner para o *software* REST (C); e análise de estabilidade dos genes referência no *software* geNorm (D).

Figura 6. Avaliação dos cDNAs por RT-PCR, diluídos 1:10 e 1:20. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Gel A - tempo 0 antes da indução de calos embriogênicos. Gel B - 14 DAI (dias após a indução). Gel C - 30 DAI. Gel D - 90 DAI. Gel E - 150 DAI. As replicas do genótipo responsivo estão indicadas por RR1, RR2, RR3, e do genótipo não responsivo por NRR1, NRR2, NRR3.

Figura 7. Avaliação dos *primers* referência por RT-PCR. Eletroforese em gel de agarose 1%.

Figura 8. Gráficos de amplificação dos genes de referência *ACT2* (A), *PD00569* (B), *EIF2* (C), *PD00380* (D).

Figura 9. Média da estabilidade da expressão dos genes de referências.

Figura 10. Ausência de contaminação com DNA genômico, utilizando os *primers* de referência que codificam *ACT2* e *EIF2*.

Figura 11. Curva de dissociação da amplificação dos 19 genes candidatos que apresentaram amplificação em todos os tempos de coleta.

Figura 12. Análise da expressão relativa dos genes candidatos comparando o genótipo R x NR em cada estágio de coleta. Branco: não houve expressão relativa, vermelho: diminuição da expressão relativa, azul: aumento da expressão relativa.

Figura 13. Análise da expressão relativa dos genes candidatos ao longo dos estádios, utilizando o tempo 0 como controle. Branco: não houve expressão relativa, vermelho: diminuição da expressão relativa, azul: aumento da expressão relativa.

Figura 14. Gráfico 1- análise da expressão relativa comparando o genótipo “R x NR” em cada estágio de coleta. **A-** Resposta ao estresse; **B-** Desenvolvimento; **C-** Metabolismo enérgico e **D-** Resposta de defesa. As barras vermelhas indicam os genes negativamente regulados, as barras azuis os genes positivamente regulados e as barras cinzas expressão relativa não significativa. **Gráfico 2-** análise da expressão relativa dos genes ao longo dos estádios (“Time- course”) para o genótipo R (azul) e NR (laranja), utilizando o tempo 0 como controle $p \leq 0,05$.

LISTA DE TABELAS

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

Tabela 2. Processos Biológicos nos quais estão inseridos os genes potencialmente envolvidos na aquisição da competência embriogênica em palma de óleo.

LISTA DE ABREVIACOES

ES – Embriogênese somática

cDNA - cido Dessoxibunuclico Complementar

Ct - Ciclo Threshold

RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real

AF - Amarelecimento fatal

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RT – Transcrição reversa

EZ – Embriogênese zigótica

2,4-D - 2,4-diclorofenoxiacético

DAI – Dias após a inoculação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Aspectos gerais da palma de óleo	17
2.2 Embriogênese somática (ES)	20
2.3 Expressão diferencial de genes durante a embriogênese somática	21
2.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 Obetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Material vegetal	25
4.2 Indução de calos embriogênicos	25
4.3 Seleção de genes envolvidos na aquisição da competência embriogênica e genes de referência	26
4.4 Extração e purificação de RNA total	31
4.5 Quantificação e avaliação de ácidos nucleicos	31
4.6 Tratamento de RNA total e síntese de cDNA para RT-qPCR	32
4.7 Validação de cDNAs por RT-PCR convencional	32
4.8 Análise de expressão gênica por RT-qPCR	32
4.9 Análise de dados	33
5. RESULTADOS	35
5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR	42
5.1.1 Comparação da expressão relativa no genótipo responsivo (R) e não responsivo (NR).....	42
5.1.2 “Time-course” da expressão relativa do genótipo R e do genótipo NR.....	44
6. DISCUSSÃO	48
6.1 Genes diferencialmente regulados no genótipo responsivo associados ao estresse durante a ES	48
6.2 Metabolismo energético	51
6.3 Genes associados com desenvolvimento	52
7. CONCLUSÃO	56
APÊNDICE A. Análise da expressão relativa Genótipo R x Genótipo NR.	67

APÊNDICE B. Análise da expressão relativa Genótipo R utilizando o tempo 0 (antes da indução) como controle.....	70
APÊNDICE C. Análise da expressão relativa Genótipo NR utilizando o tempo 0 (antes da indução) como controle.....	73
APÊNDICE D. TRABALHOS PUBLICADOS, SUBMETIDOS E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS (2º/2016 – 1º/2018)	76

1. INTRODUÇÃO

As palmeiras pertencem à família Arecaceae, compreendendo cerca de 240 gêneros e 2.700 espécies (LORENZI et al., 2010). No Brasil, existem 423 espécies distribuídas em 46 gêneros, tendo a região amazônica a maior representatividade, com aproximadamente 173 espécies (LEITMAN et al., 2013). Dentre as palmeiras de importância, destaca-se a palma de óleo, do gênero *Elaeis*, em especial as pertencentes às espécies *Elaeis guineensis* Jacq. e *Elaeis oleifera*. O dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.), planta nativa da África e conhecida como palma de óleo africana, é considerado uma das espécies com maior importância entre as palmeiras domesticadas. Introduzida na Bahia no final do século XVI, ainda no período de tráfico de escravos africanos, a cultura não teve obstáculos frente às condições climáticas da região, semelhantes ao centro de origem, sendo posteriormente levada à região amazônica, onde predominam as maiores áreas cultivadas (VENTURIERI et al., 2009).

O cultivo do dendezeiro se destaca na agricultura mundial devido à importância econômica (DE TOUCHET et al., 1991) e sua alta produtividade, alcançando rendimentos anuais médios de 5-7 toneladas de óleo por hectare por ano (RAJESH et al., 2003). Esta produtividade da palma de óleo é, na maioria dos casos, maior do que as demais culturas oleaginosas (NGALLE et al., 2014). O óleo do dendezeiro tem muitas aplicações na indústria de alimentos (óleo de alta qualidade e seus derivados), além de ser uma importante fonte de energia (biocombustível) (BENJUMEA et al., 2008).

Diferentemente do dendê africano, o caiaué (*E. oleifera*), conhecido como palma de óleo americana, é encontrado na América tropical úmida e amplamente dispersa, entre as Américas Central e do Sul, em países como Colômbia, Panamá, Costa Rica, Honduras, Nicarágua, Brasil, Suriname e Equador (ESCOBAR, 1982, RAJANAIDU, 1986, BALSLEV 1986; HARTLEY, 1998). *E. oleifera* é vista como um recurso genético promissor para os programas de melhoramento da palma de óleo, já que representa importante fonte de variabilidade genética e, devido às suas características agronômicas como, taxa anual de crescimento do tronco reduzida, que confere menor porte na idade adulta, resistência a doenças e elevado teor de ácidos graxos insaturados, o que confere maior fluidez do óleo, tem sido utilizada em cruzamentos interespecíficos com *E. guineensis* (HARTLEY, 1988).

Nos últimos anos, plantações do híbrido interespecífico Manicoré (*E. oleifera* × *E. guineensis*) têm aumentado substancialmente devido à sua resistência principalmente ao amarelecimento fatal (AF), doença de origem ainda desconhecida que pode inviabilizar o

cultivo dessa palmeira nas regiões onde ocorre, e à podridão de gemas (*bud rot*), doença causada por *Phytophthora palmivora* (TORRES et al., 2010; 2016). O híbrido interespecífico se destaca ainda pelo porte baixo e elevado rendimento, podendo produzir de 4 a 6 t/ha/ano de óleo (CHIA et al., 2009).

Elaeis guineensis Jacq e *E. oleifera* são duas espécies monocotiledôneas, com um único meristema apical e que não apresentam perfilhamento. Este fato impede que as mesmas sejam propagadas vegetativamente por técnicas convencionais. Portanto, nestas espécies, a micropropagação por meio da embriogênese somática (ES) é possivelmente a única alternativa para a propagação clonal de plantas (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010). A ES, descrita pela primeira vez em palmeiras por Staritsky (1970) e Rabechault et al. (1970), é o processo pelo qual as células somáticas se diferenciam para formar embriões, reorganizando suas propriedades epigenéticas e ciclo celular para a formação de tecidos, em etapas morfológicas semelhantes à embriogênese zigótica (EZ) (WILLIAMS e MAHESWARAN 1986). A utilização de fitorreguladores é um dos fatores que influenciam a indução da ES, pois são de suma importância para estimular processos bioquímicos e fisiológicos (TAIZ e ZEIGER, 2009). Dentre os reguladores de crescimento utilizados no processo de indução da ES, podemos destacar as auxinas, como o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) e o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que são determinantes ao processo. As auxinas e as citocininas são fatores chave na determinação da resposta embriogênica, uma vez que participam fortemente na regulação do ciclo celular e diferenciação celular (FEHER et al., 2003).

A otimização dos protocolos tem sido o foco central da pesquisa, mas etapas específicas do processo como a multiplicação, maturação e a conversão dos embriões somáticos permanecem pouco estudadas em muitas espécies de palmeiras (REE et al., 2015). Em todo o mundo, milhões de plantas de diferentes espécies são produzidas anualmente por meio da ES. Entretanto, a compreensão dos mecanismos que regulam as diferentes etapas do processo ainda é bastante limitada (GOMES et al., 2014). Apesar de se compreender muito bem os aspectos práticos do uso da ES para aumentar a produção, há muito ainda a ser explorado e investigado acerca dos mecanismos envolvidos na ES das plantas.

Assim, a questão chave no campo da ES parece ser o mecanismo que faz com que as células mudem seu destino e se tornem embriogênicas. Para compreender esses mecanismos, alguns estudos têm focado na expressão gênica durante as diferentes fases da embriogênese somática (TAN et al., 2016). Uma das técnicas utilizadas para estudos de expressão gênica é a

técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR). Esta técnica baseia-se no processo de transcrição reversa (RT), seguida por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), sendo o produto quantificado por meio de moléculas fluorescentes incorporadas ao DNA, as quais podem ser monitoradas durante a cinética da reação (VALASEK et al., 2005).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de genes envolvidos na aquisição da embriogênese somática em genótipos do híbrido F1 interespecífico (*E. oleifera* x *E. guineensis*) contrastantes para a aquisição da competência embriogênica por RT-qPCR. Genes previamente identificados pelo nosso grupo, bem como genes já descritos na literatura com possível envolvimento na ES, foram selecionados. Espera-se com este trabalho contribuir inicialmente para um melhor entendimento do processo, além de permitir que se otimize protocolos visando a obtenção de um maior número de plantas regeneradas a partir da embriogênese somática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da palma de óleo

A palma de óleo, pertencente ao gênero *Elaeis*, é uma palmeira monocotiledônea perene, monóica, oleaginosa e de ciclo de vida longo (HARTLEY, 1988; MORCILLO et al., 2007). De acordo com a classificação atual, o gênero *Elaeis* é pertencente à classe Liliopsida, tribo Cocoseae, subtribo Elaeidinae, família Arecaceae e subfamília Arecoideae. *Elaeis guineensis* é originária da África Central (APICHAETMETA et al., 2017) e Ocidental e conhecida também popularmente como dendém, coqueiro-de-dendezeiro e palma-de-guiné (LORENZI et al., 1996). A palma de óleo é uma cultura de rendimento importante nos trópicos (ZHENG et al., 2017) e produz dois óleos de grande importância econômica, chamados vulgarmente como óleo de palma e óleo de palmiste, obtidos a partir do mesocarpo e do endosperma, respectivamente (SINGH et al., 2013). Os frutos da palma de óleo (Figura 1) são compostos pelo epicarpo (camada externa); mesocarpo (camada média entre epicarpo e endocarpo) e endocarpo (camada interna) (SUMATHI et al., 2008).



Figura 1. Frutos da palma de óleo. Fonte: Ivonaldo Reis Santos.

Existem três variedades de dendê, sendo elas Tenera, Dura e Pisifera, que são diferentes nas características do fruto (Figura 2). A variedade Tenera, cujo fruto possui endocarpo fino, é obtida por meio do cruzamento entre as variedades Dura, cujo fruto tem endocarpo espesso, e Pisifera, que possui endocarpo limitado ou ausente (GOMES et al., 2015, RUTTAJORN et al., 2016). O dendezeiro é uma cultura de polinização cruzada (DRANSFIELD e UHL, 1998), cultivada em muitos países tropicais da Ásia, África, América Central e do Sul como fonte para obtenção de óleo vegetal. É uma planta monoica,

indicando uma maior adaptabilidade ambiental comparada à palma de óleo africana (CORLEY e TINKER, 2003). *Elaeis oleifera* possui características de resistência a doenças e pragas, principalmente ao amarelecimento fatal, além de menor crescimento vertical do estipe (CONCEIÇÃO et al., 2000; CUNHA et al., 2010). De fato, uma característica que distingue *E. oleifera* das demais palmeiras é o tronco mais curto (Figura 3). A alta proporção de frutos partenocárpicos que podem constituir até 90% do total é outra característica marcante de *E. oleifera* em comparação com a espécie africana. *Elaeis oleifera* têm uma diferença no posicionamento das folhas em relação a *E. guineensis* (Corley e Tinker, 2003) e depende da polinização pelos insetos (GOMES, 2011). As espécies africana e americana de palma de óleo são sexualmente compatíveis (HARDON e TAN, 1969) e os híbridos F1 mostram o vigor vegetativo e menor incremento do crescimento do caule parental (CORLEY e TINKER, 2003).



E. oleifera



E. guineensis



Híbrido F1 interespecífico

Figura 3. *Elaeis oleifera*, *E. guineensis* e híbrido F1 interespecífico. Disponível em: <http://frutasnativasdaamazonia.blogspot.com.br/2012/07/>.

Essa cultura apresenta dificuldades na produção de mudas assexuadamente e em larga escala devido ao fato de possuírem um único meristema apical, o que impede a propagação vegetativa por formas convencionais de propagação, como por meio de estacas. O principal método utilizado atualmente para a produção de mudas é via sementes, que impede que características de interesse agrônomo sejam perpetuadas durante etapas de multiplicação de material, ou que ganhos genéticos sejam fixados em gerações de cruzamentos nos programas de melhoramento genético da espécie (MARTINE et al., 2009; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010).

2.2 Embriogênese somática (ES)

Desde a primeira descrição da produção de embriões somáticos a partir de células de calo de cenoura por Steward et al. (1958), a ES tem sido reconhecidamente como o único caminho eficiente para a propagação assexual de palmeiras (ZIMMERMAN, 1993). A ES pode ser compreendida como o processo pelo qual as células somáticas haploides ou diploides se desenvolvem em estruturas que se assemelham a embriões zigóticos, chamados embriões somáticos, por meio de uma série de estádios embriogênicos que originam uma nova planta, sem que haja fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986).

Os embriões somáticos podem ser originados por duas vias de regeneração: a direta e a indireta. A embriogênese somática direta consiste na formação de embriões somáticos diretamente dos explantes, sem que haja a formação de estágios intermediários de calos. Por outro lado, na embriogênese somática indireta, os embriões somáticos se formam a partir de um calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação (GUERRA et al., 1999). Entretanto, o embrião somático, quando em desenvolvimento, passa geralmente por estádios característicos da embriogênese zigótica: globular, cordiforme (quando em dicotiledôneas), torpedo, cotiledonar e maduro, em um processo ontogênico, no qual ao final ocorre a formação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular (ZIMMERMAN, 1993; GUERRA et al., 1999).

Já é sabido que o estresse celular desempenha um papel fundamental na mudança de destino da célula, levando à diferenciação celular e formação do embrião. Contudo, não se sabe exatamente como e por que as células vegetais diferenciadas readquirem totipotência e por que esse fenômeno se restringe a certos genótipos (FEHÉR et al., 2015). Sabe-se que para que ocorra a reprogramação celular levando as células somáticas a se tornarem totipotentes e a se diferenciarem em embrião, o padrão de expressão de genes deve ser alterado (VINAS et

al., 2011), sugerindo que o mecanismo da regulação gênica durante a ES envolva grande número de genes com padrões de expressão complexos (ZENG et al., 2007).

A ES vem sendo amplamente estudada em diversas palmeiras, como em açazeiro (DA SILVA LÉDO et al., 2007), pupunheira (STEINMACHER et al., 2007), tamareira (SANÉ et al., 2006) e dendezeiro (DA SILVA ANGELO et al., 2009). Todavia, alguns desses estudos utilizam grandes quantidades de reguladores de crescimento, o que pode gerar problemas futuros nas plantas regeneradas, como variações somaclonais. De acordo com VON ARNOLD et al. (2002), reguladores de crescimento, principalmente as auxinas, desempenham um papel fundamental na transdução do sinal para desencadear um determinado padrão de expressão de genes. A maioria das espécies necessita de altas concentrações de auxinas e baixas concentrações de citocininas para a indução de calos. E para a regeneração e obtenção de brotos, geralmente usam-se concentrações mínimas de auxinas e mais elevadas concentrações de citocininas (LENIS-MANZANO et al., 2010).

A biotecnologia foi introduzida nos estudos de propagação da palma de óleo há mais de três décadas, objetivando originar clones elite da palma de óleo em larga escala (ABDULLAH, 2005). Os estudos iniciais foram os desenvolvidos por RABÉCHAULT et al. (1970) e MARTIN (1976), CORLEY et al. (1977), PANNETIER et al. (1981) e De TOUCHET et al. (1991). No entanto, dada à importância econômica da palma de óleo, a micropropagação desta cultura tropical vem sendo estudada com maior aprofundamento para que se possa multiplicar indivíduos com características agrônomicas desejáveis, capazes de aumentar a produção de óleo de palma (DE TOUCHET et al., 1991).

Protocolos de indução da embriogênese somática e regeneração ainda precisam ser validados para uso em escala larga comercial, pois além da dificuldade da definição de um protocolo eficiente, foi observado que dentro de uma faixa de até 10% dos clones obtidos *in vitro* poderiam resultar em indivíduos com características fenotípicas diferentes das plantas matrizes quando as mesmas alcançavam o estágio adulto (RIVAL et al., 1997). De acordo com PARANJOTHY et al. (1995), este fenômeno denominado de variação somaclonal surge devido à adição de altas concentrações de auxinas no meio de cultura de indução.

2.3 Expressão diferencial de genes durante a embriogênese somática

Estudos genômicos e proteômicos durante os diferentes estádios da ES têm sido realizados com a finalidade de identificar marcadores moleculares para a detecção de

competência embriogênica (HENRY et al., 1994; KAWAHARA & KOMAMINE, 1995; MEINKE, 1995; WILDE et al., 1995; DONG & DUNSTAN, 2000; CHE et al., 2006; KISELEV et al., 2009; FLOH et al., 2007; OSORIO et al., 2012). O estudo da expressão gênica por meio da análise do transcriptoma oferece informações importantes sobre os genes de um organismo transcritos em uma determinada condição biológica, embora ela não reflita diretamente a abundância das proteínas deste organismo (CHEN e HARMON, 2006). Diversos mecanismos estão envolvidos no controle da síntese proteica, mecanismos estes que atuam desde a transcrição do gene até a obtenção da proteína na forma ativa. Durante o processo da síntese proteica podem ocorrer modificações pós-transcricionais e pós-traducionais alterando a conformação espacial de proteínas, gerando diferentes classes proteicas, as quais bioquimicamente e estruturalmente podem desempenhar diferentes funções nas vias metabólicas e na composição do proteoma do organismo.

É conhecido que para a formação do embrião vegetal é requisitada a indução e ativação de uma ampla diversidade de genes (SCHMIDT et al., 1997; CHUGH e KHURANA et al., 2002). O processo da embriogênese envolve a expressão diferencial de genes conferindo às células somáticas a habilidade de demonstrarem seu potencial embriogênico. A ES também envolve várias vias de transdução de sinal para indução ou repressão de um grande número de genes (CHUGH e KHURANA et al., 2002). No entanto, os mecanismos precisos que controlam a expressão gênica vegetal e os passos detalhados pelos quais estes genes dirigem o processo específico da embriogênese vegetal ainda não estão bem compreendidos.

De fato, diversos genes já foram descritos como marcadores específicos da ES em plantas, dentre eles os genes conhecidos como SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) são expressos em culturas de embriões somáticos e foram isolados em culturas de suspensão de cenoura em várias fases de crescimento (THOMAS et al., 2004). O gene SERK foi descrito pela primeira vez em culturas de células competentes de cenoura (DcSERK) (SCHMIDT et al., 1997), e podem servir como um marcador da ES para diferenciar células competentes de não competentes (CHUGH & KHURANA, 2002). Alguns estudos identificaram genes homólogos ao SERK em *Arabidopsis thaliana* (AtSERK1) (HECHT et al., 2001), *Dactylus glomerulata* (DgSERK) (SOMLEVA et al., 2000) e *Medicago truncatula* (MtSERK) (NOLAN et al., 2003).

2.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Até o momento, vários genes foram descritos como envolvidos no processo de

aquisição de competência embriogênica através de projetos genoma e transcriptoma, embora estudos de validação da expressão sejam limitados. A RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real), que monitora em tempo real a amplificação de genes (VAN PELT-VERKUIL et al., 2008) é uma técnica bastante eficiente para a validação da expressão gênica. A técnica de RT-qPCR baseia-se no processo de transcrição reversa (RT) seguida pela reação em cadeia da polimerase, sendo o produto quantificado por meio de moléculas fluorescentes incorporadas ao DNA, as quais podem ser monitoradas durante a cinética da reação (HIGUSHI et al., 1993; KUBISTA et al., 2006).

A RT-qPCR tornou-se uma técnica muito informativa para a quantificação de diferenças nos níveis de expressão gênica entre amostras (TAYLOR et al., 2010). A escolha de genes referência apropriados é fundamental para se obter resultados precisos, uma vez que, apesar desses genes apresentarem uma expressão uniforme na maioria dos tecidos, eles podem variar em diferentes fases de desenvolvimento, tratamentos biológicos e condições ambientais (EXPOSITO-RODRIGUEZ et al., 2008). 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.

Vários softwares têm sido utilizados para a identificação e a classificação dos genes constitutivos mais adequados, entre eles destacam-se o geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). O programa geNorm determina os genes de referência mais estáveis em um conjunto de amostras e determina também quantos genes de referência são necessários para que a normalização seja segura. Este software calcula o valor de M baseado na média geométrica dos genes testados e na média da variação par a par de genes contra os outros presentes nas diferentes amostras (VANDESOMPELE et al., 2002).

Atualmente, estudos de RT-qPCR têm sido empregados como análise complementar em estudos proteômicos, a fim de avaliar quantitativamente a expressão de genes potencialmente envolvidos em diversos processos biológicos, como em estudos de ES (BRAYBROOK et al., 2006; OOI et al., 2012). Apesar dessa técnica já ter sido utilizada em estudos de ES e na identificação de genes referência em várias espécies (CHAN et al., 2014; XIA et al., 2014), ainda são relativamente poucos os relatos de trabalhos de RT-qPCR para avaliar a expressão de genes envolvidos especificamente na aquisição de competência embriogênica, possivelmente uma das fases mais determinantes do processo.

3. OBJETIVOS

3.1 Obetivo geral

Avaliar a expressão diferencial de genes envolvidos com a embriogênese somática em dois genótipos do híbrido interespecífico entre *Elaeis oleifera* e *E. guineensis* (Jacq.) contrastantes para a aquisição de competência embriogênica.

3.2 Objetivos específicos

- Submeter dois genótipos F1 interespecíficos (*E. oleifera* e *E. guineensis* Jacq.) ao processo de indução da embriogênese somática;
- Selecionar genes já identificados pelo nosso grupo por meio da análise proteômica, bem como genes descritos na literatura, como envolvidos na aquisição da competência embriogênica em dendezeiro;
- Analisar a expressão diferencial dos genes selecionados nos dois genótipos contrastantes em diferentes estádios da ES;
- Identificar genes envolvidos com a aquisição da competência embriogênica em palma de óleo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para este estudo, foram utilizadas folhas aclorofiladas de dois híbridos F1 interespecífico de palma de óleo (*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés x *E. guineensis* Jacq.), coletadas de plantas adultas dos genótipos: B352933 [genótipo não responsivo – (NR) à embriogênese somática] e B351733 [genótipo responsivo (R) à embriogênese somática], conforme estabelecido por Bartos (2016) e Gomes et al. (2017). O genótipo B351733 foi derivado do cruzamento entre *E. oleifera* (origem Manicoré) e *E. guineensis* (origem La Mé). Já o genótipo B352933 foi gerado a partir do cruzamento entre *E. oleifera* (origem Tefé) e *E. guineensis* introduzido de Angola. Em ambos os cruzamentos, a fonte de pólen foi das palmeiras da espécie *E. guineensis*. O material foi disponibilizado pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Amazônia Ocidental (Estação experimental do Rio Urubu), localizado no município de Rio Preto da Eva, AM.

4.2 Indução de calos embriogênicos

A indução de calos foi realizada conforme metodologia descrita por BALZON et al. (2013), com modificações. Folhas aclorofiladas dos respectivos híbridos interespecíficos de palma de óleo foram coletadas de plantas adultas e submetidas à desinfestação com etanol 70% durante 3 min e, posteriormente, com hipoclorito de sódio a 2,5% durante 20 min. As folhas foram lavadas em água destilada estéril por três vezes e, em seguida, os explantes foliares foram excisados com auxílio de pinça e bisturi para inoculação em meio de cultura de indução de calos (MIC). O MIC foi composto por sais e vitaminas de MS (MURASHIGE e SKOOG 1962) e suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®). Durante o período de indução de calos, os explantes foram armazenados em sala de crescimento, na ausência de luz e com temperatura 25 ± 2 °C.

A coleta do material vegetal para as análises de RT-qPCR de ambos os genótipos foi realizada em triplicatas biológicas (RB1, RB2 e RB3) nos tempos 0 (antes da indução de calos embriogênicos), 14, 30, 90 e 150 dias após a indução (DAI) de calos embriogênicos. Cada réplica biológica foi composta por seis placas selecionadas aleatoriamente, que continham seis explantes, os quais foram macerados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C (Figura 4).

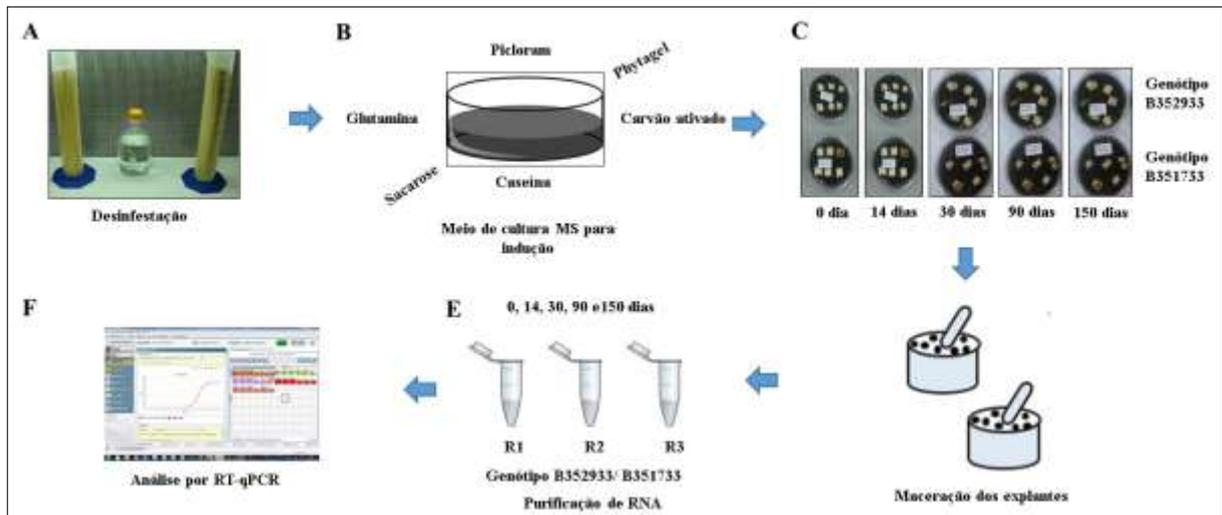


Figura 4. Figura ilustrativa do material e métodos utilizados neste estudo. Desinfestação do material vegetal (A); meio MS composto por sais e vitaminas (B); explantes foliares dos dois genótipos avaliados nos cinco tempos de coleta (C); maceração dos explantes (D); Purificação de RNA (E) e análise dos genes envolvidos na aquisição de competência embriogênica selecionados (F).

4.3 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 (DE CARVALHO SILVA et al., 2014, ALMEIDA et al., 2017 (dados submetidos à publicação). Um total de 19 genes potencialmente envolvidos na aquisição da competência embriogênica foram selecionados a partir desses estudos e outros 17 genes foram selecionados a partir da literatura, sendo 10 genes candidatos e 7 genes de referência (LOW et al. 2008, CHAN et al., 2010, KLIMASZEWSKA et al. 2011, THUC et al. 2011, SANTA CATARINA et al. 2012, CHAN et al., 2014, XIA et al., 2014) (Tabela 1). O software Primer3plus (UNTERGASSER et al., 2012) foi usado para desenhar os primers, exceto para os genes que foram obtidos da literatura. A ausência de amplificação e produtos inespecíficos foram avaliados utilizando o software OligoAnalyzer 3.1 (OWCZARZY et al. 2008). Os parâmetros utilizados para o desenho dos primers foram: temperatura média de 57°C a 63°C para cada primer, tamanho dos primers 20 nucleotídeos e tamanho do amplicon entre 110-130 pares de base.

Após a seleção dos genes, seus GIs (Gene Identifiers) foram utilizados para a obtenção das sequências FASTA no banco de dados NCBI. Posteriormente, estas sequências foram utilizadas no *software* Blast2GO® para a obtenção dos GOs (Gene Ontology) e anotação funcional das proteínas, sendo possível observar os processos biológicos em que esses genes estão envolvidos, suas funções moleculares e a localização celular. Além disso, também foi possível observar as rotas metabólicas em que esses genes estão participando. Os termos GOs foram agrupados em categorias de acordo com sua anotação funcional.

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

Nome do gene	Símbolo Gene	Acesso sequência NCBI	Forward Primer (5' to 3')	Tm °C	Reverse Primer (5' to 3')	Tm °C	Amplicon
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase •	<i>PGM</i>	XM_010924524.2	TGGACGCAATAGAGCAAGTG	60.0	GTCCCCCTTTTTATCGAGGA	60.3	116
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1-like	<i>CPNI</i>	XM_010935102.1	TGAAAGATGGCTCTCACACG	60.0	TTTGAAGTGGTGC GGTTGTA	60.1	119
Actin-3-like •	<i>ACT1</i>	NM_001319906.1	CACTTCCTCATGCCATCCTT	60.1	CTAACAATTTCCCGCTCTGC	59.8	121
Annexin D1 •	<i>ANN1</i>	XM_010941329.2	GTCATAGCCACTCGTGCTGA	60.0	CTCCAGAAGTGTCGCCCTTA	60.4	106
Catalase isozyme 2 •	<i>CAT2</i>	NM_001319913.1	ATTGGGATCTCCTGGGAAAC	60.1	ACTCCTGGATGTGGGACTTG	60.0	111
Cysteine synthase •	<i>OASA</i>	XM_010919421.2	AATATCATCTGGGGCTGCTG	60.1	GCTCACCAAAGCTAGGGAAA	59.5	101
Enolase-like •	<i>ENO1</i>	XM_010909626.2	GTCAGCGAGTACCCCATGT	60.0	TCGTCTCCAACAATCTGCAC	59.8	113
Monodehydroascorbate reductase 5, mitochondrial •	<i>MDAR5</i>	XM_010942780.2	AGCCAAGAAGGTTGCCATTA	59.7	GTGCTCCTCGGAAATATGA	60.0	106
Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta •	<i>PFP-BETA</i>	XM_010915114.2	TGTGCTCCTGTTGAGGAATG	59.8	CCTTCTTTATCACGGGCTTG	59.9	100
Rubisco large subunit-binding protein subunit alpha •	<i>RUBA</i>	XM_010920378.1	GCGTGGCAGTTATCAAGGTT	60.1	TCCTCTATGGCTGCGAAAGT	60.0	103
Heat shock protein 81-1	<i>HSP81-1</i>	XM_010914921.2	TTCGGTGTGGGGTTCTACTC	60.0	ATCCCTAGTCACGGTGAACG CAAGCTGCCATCCAGGTAAT	60.0	126
Protein disulfide-isomerase •	<i>PDIL1-4</i>	XM_010932368.2	AACAAGCACCCCTTGTCATC	60.0		60.1	113
Pathogenesis-related protein 1-like •	<i>PRBI</i>	XM_010940037.2	CCTCGACCCAGTTCAAGTTC	59.7	TTTGCTTGGCTACCTCATC	60.2	117
Pathogenesis-related protein PRB1-3-like •	<i>PRBI-3</i>	XM_010943665.2	ACTACGCCAACCAGCGAAT	60.7	TCACTCACCCACGAGTTCAC	59.7	127
Elongation factor 1 (EF1) •	<i>EF1</i>	JN003517.1	AGGCTGACTGTGCTGTCTT	60.1	TCTGCTTACACCAAGGGTA	59.3	120
Germin-like protein 8-14	<i>GER5</i>	XM_010934113.2	ACCTTAATCCAGGGGTGTC	60.1	GTTATTGGCGGTGGAGATG	60.9	110

Nome do gene	Símbolo do Gene	Acesso NCBI	Primer Forward (5' to 3')	Tm °C	Primer Reverse (5' to 3')	Tm °C	Amplicon
Fumarylacetoacetase	<i>FAH</i>	XM_010915669.2	GCATGGGAATATGTGCCTCT	59.9	GAGCATCGCAAACAAAAGGT	60.3	109
Myrcene synthase	<i>MYRS</i>	XM_010111256.1	AAGTGAATCAACGGCGATCT	59.7	AGTCGGTCGGCATGTAACTC	60.1	106
Protein SUPPRESSOR OF K(+) TRANSPORT GROWTH DEFECT 1-like	<i>LOC106346350</i>	XM_013785648.1	CCCAAGATGCCATGTTCTTT	59.9	CGAGCCCTTTTTCTGCTAAA	59.6	114
Putative late embryogenesis abundant (LEA) protein + •	<i>LEA</i>	XP_010927880.1	TGGGGTTTGTAATCAGCACA	54.5	TGAAGAAAAGGGAGGCTTCA	53.9	176
Polycomb group protein FIE2 isoform X2 + •	<i>FIE2</i>	XP_010906361.1	TAGCCGCACCATAACATTGA	54.3	TTGATGGTCGCTTGTGGTA	54.4	176
Beta-glucosidase 22-like + •	<i>BGLUC</i>	XP_010938396.1	TCAGTTTGTCCAACCCACA	54.6	AGTGTGCTTCCCATGAAACC	55.6	
Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1+ •	<i>SERK1</i>	XP_010916943.1	GCATCACCTCCGAGTTAGC	55.8	TCGTATGGATCTGGGGAGAC	55.6	153
F-box Family protein +	<i>F-BOX</i>	XP_010935552.1	TGATGGCAGTGCTTTCAGAG	55.3	TGGTAGCAGCGTCACAAAAG	55.6	170
Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic + •	<i>GBSS1</i>	XP_010940833.1	AGCCTTGATGCTGCTTTTGT	55.6	GCATCGCACTTCATCTCAA	53.5	-
Putative germin-like protein 2-1 +	<i>LOC10503779</i>	XP_010911724.1	GAGTCACATTGGACCCAACC	55.8	GCCAACTCCAAGACTTCTGC	56.3	159
Glutathione S-transferase U17-like +	<i>GSTU17</i>	XP_010919191.1	ACTCCACACTCCGTTTCATC		GGTAGAGTTCGCCAAGTTGC		162
AP2-like ethylene-responsive transcription factor ALL5 isoform X2 +	<i>LOC105050379</i>	XP_010928670.1	ACAAGAGGAAGCTGCAGAGG	57.1	GCATTGGAGTTGGAGGATGT	55.1	-
WUSCHEL-related homeobox 3B-like +	<i>WUS1</i>	XP_008776170.1	TGCCCTCAATCTCCCATAG	54.2	AAAGATGCCCCAGACTCCTT	56.2	155
Predict 40S ribosomal protein S27-2 *	<i>PD00380</i>	EY397675	GATGGTTCTTCCGAACGATAT TGA	63.0	TCACATCCATGAAGAATGAGTTTCG	63.0	113
Eukaryotic initiation factor 4A *	<i>EIF2</i>	GAJH01015579.1	ATTAGGATGTTTGTGCTGGAT	81.72	CTCAGGAGGCATTGTGGC	81.72	132
Manganese superoxide dismutase *	<i>PD00569</i>	EL682210	CACCACCAGACGTACATCACA AA	60.0	GATATGACCTCCGCCATTGAACT	60.0	129

Nome do gene	Símbolo Gene	Acesso sequência NCBI	ForwardPrimer (5' to 3')	Tm °C	Reverse Primer (5' to 3')	Tm °C	Amplicon
Actina *	<i>ACT1</i>	GAJH01027510.1	GTTGTCGCTCCACCCG	82.04	GCAGGACCACATTCATCATA	82.04	119
Actin/mreB/sugarKinase/HSP70 superfamily *	<i>ACT2</i>	GAJH01031170.1	CTCAACCCCAAGGCGAAC	80.93	GTAACACCATCTCCCGAGTCAA	80.93	152
Eukaryotic initiation factor 4A *	<i>EIF1</i>	GAJH01031684.1	CCTCACCTATACTCTTCCCACC A	85.3	GTCATGCCAGGCACAG	85.3	214
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase *	<i>GAPDH</i>	XP_010910405.1	GTGCCAAGAAGGTCATCAT	55.1	TGTGGTCATCAAACCCTCAA	54.1	80

+ Genes selecionados a partir da literatura

* Genes referência

• Genes utilizados nas análises de expressão relativa

4.4 Extração e purificação de RNA total

A extração de RNA foi realizada utilizando o método Trizol (*Invitrogen*) de acordo com Simms et al. (1993), com modificações. Aproximadamente 0,1 g do material vegetal foi utilizado e foi adicionado 1 mL do reagente Trizol, acrescido de 1% de β -mercaptoetanol (mantido a 4°C). As amostras foram homogeneizadas durante 1 min com o auxílio de um agitador de tubos do tipo vortex. Em seguida, os tubos foram mantidos durante 5 min em gelo e centrifugados ($16128 \times g$ por 10 min a 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 2 mL e foram adicionados 300 μ L de clorofórmio para a separação de fases.

As amostras foram incubadas novamente durante 3 min no gelo e homogeneizadas por 1 min em vortex. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 15 min a $16128 \times g$ a 4°C. Posteriormente, foi coletada a fase aquosa e adicionado o mesmo volume de isopropanol (mantido a 4°C) para a precipitação dos ácidos nucléicos. As amostras foram incubadas durante 2 horas à -20°C e centrifugadas a $16128 \times g$, por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% foi adicionado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min, a 4°C e a $16128 \times g$ e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi seco por aproximadamente 10 min à temperatura ambiente e depois, eluído em 20 μ L de H₂O tratada com DEPC (pirocarbonato de dietila).

4.5 Quantificação e avaliação de ácidos nucléicos

A quantificação do RNA isolado foi feita utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis -Termo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a integridade do RNA isolado, as amostras foram analisadas em gel de agarose desnaturante (agarose 1%; Tampão TAE 1X), pré-corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK, FRITSCH; MANIATIS, 1989). Foram aplicados no gel 1 μ L de RNA acrescido de 2 μ L de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) (*Invitrogen*). Foi utilizado como marcador molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™/Life Technologies™). Após adição do tampão de corrida (Tris Base, ácido acético e EDTA 0,5 M) na cuba, a eletroforese foi conduzida a 100 V por cerca de 45 min. Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

4.6 Tratamento de RNA total e síntese de cDNA para RT-qPCR

Para o tratamento de RNA com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, foi utilizado 4 µg de RNA total em um volume de 20 µL. Foi adicionado 4 µg de RNA total, 2 µL de tampão 10× reaction buffer, 1 µL da enzima Turbo™ DNase (Applied Biosystems/Ambion) e completado o volume final com água estéril para 20 µL. As amostras foram mantidas durante 30 min a 37°C. Posteriormente, foi adicionado 4 µL de EDTA 25 mM (ácido etilenodiamino tetra-acético) para a inativação da enzima Turbo DNase, e as amostras foram mantidas por 10 min a 65°C e em seguida no gelo por 5 min.

A síntese de cDNA foi feita utilizando 2 µg de RNA tratado. O cDNA foi sintetizado usando o kit Next Generation MMLV RNase H Minus First-Strand cDNA Synthesis (DNA Express Biotecnologia LTDA). Para cada reação foi utilizado 10 µL do RNA tratado (2 µg), 1 µL de oligo (DT), 1 µL de DNTP's, seguida de incubação à 65°C por 5 min e no gelo por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de Tampão de Reação 5X First-Strand cDNA, 2 µL de DTT (Ditiotreitol) e 1 µL da enzima NextGeneration Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus, com incubação à 50°C por 60 min para a reação de transcrição reversa (RT) e 70°C por 15 min para inativação da enzima. O cDNA fita simples foi armazenado a -20°C e utilizado para RT-qPCR.

4.7 Validação de cDNAs por RT-PCR convencional

O RT-PCR semi-quantitativo 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 e 20x em água ultrapura, 2,5 µL de tampão de reação 5× (GE Healthcare Life Sciences) 1 µL de cada primer a 10 µM (forward e reverse), 0,5 µL de dNTPs, 0,75 µL de MgCl₂ 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.

4.8 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

aquisição de competência embriogênica, selecionados a partir de estudos prévios de proteômica e a partir da literatura, em um conjunto de 5 tempos distintos de coleta. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados no termociclador 7300 96-well Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) (Figura 5). Todas as reações foram compostas por 5 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µL de cada primer numa concentração inicial de 10 mM (forward e reverse) e 2 µL de cDNA fita simples referente a cada amostra a ser analisada (diluído 20x). 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. O programa foi 95°C por 15 s, 60°C por 60 s, aumentando 0,3°C a cada ciclo até atingir 95°C. Todos os experimentos foram feitos utilizando três réplicas biológicas e para cada réplica biológica, três réplicas técnica 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.

4.9 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; FERNALD, 2005). O *software Real-time PCR Miner* baseia-se na cinética individual das reações de PCR e determina a eficiência de reação, sem a necessidade de uma curva padrão, utilizando os pontos iniciais e finais da fase exponencial da PCR, para estimar a eficiência da reação para cada amostra/gene. Em seguida, foi calculada a média e o coeficiente da variação da eficiência para cada gene, e a expressão gênica foi analisada pelo *software Rest* (PFAFFL, MICHAEL W.; HORGAN, GRAHAM W.; DEMPFLER, LEO, 2002). 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. A normalização foi realizada com a utilização de genes de referências. Os valores de Cq, obtidos pelo *software Real time PCR Miner*, foram convertidos em quantidade relativa não normalizada pelo *software REST*, as quais foram importadas para o *software geNorm* para classificar os melhores genes referência.

Após a determinação dos genes normalizadores pelo *software geNorm* foi feita a análise da expressão relativa de cada gene candidato comparando as amostras de R e NR do híbrido F1

interespecífico de palma de óleo em cada tempo de coleta (0, 14, 30, 90 e 150). 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. Os valores de Cq foram submetidos ao *software Rest*, onde foi informada a eficiência dos *primers*, os genes normalizadores (*ACT2* e *PD00380*) e as amostras controle. Na análise da expressão relativa de cada gene, o controle utilizado foi o genótipo NR sob as mesmas condições do genótipo R. 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 $\geq 1,5$.

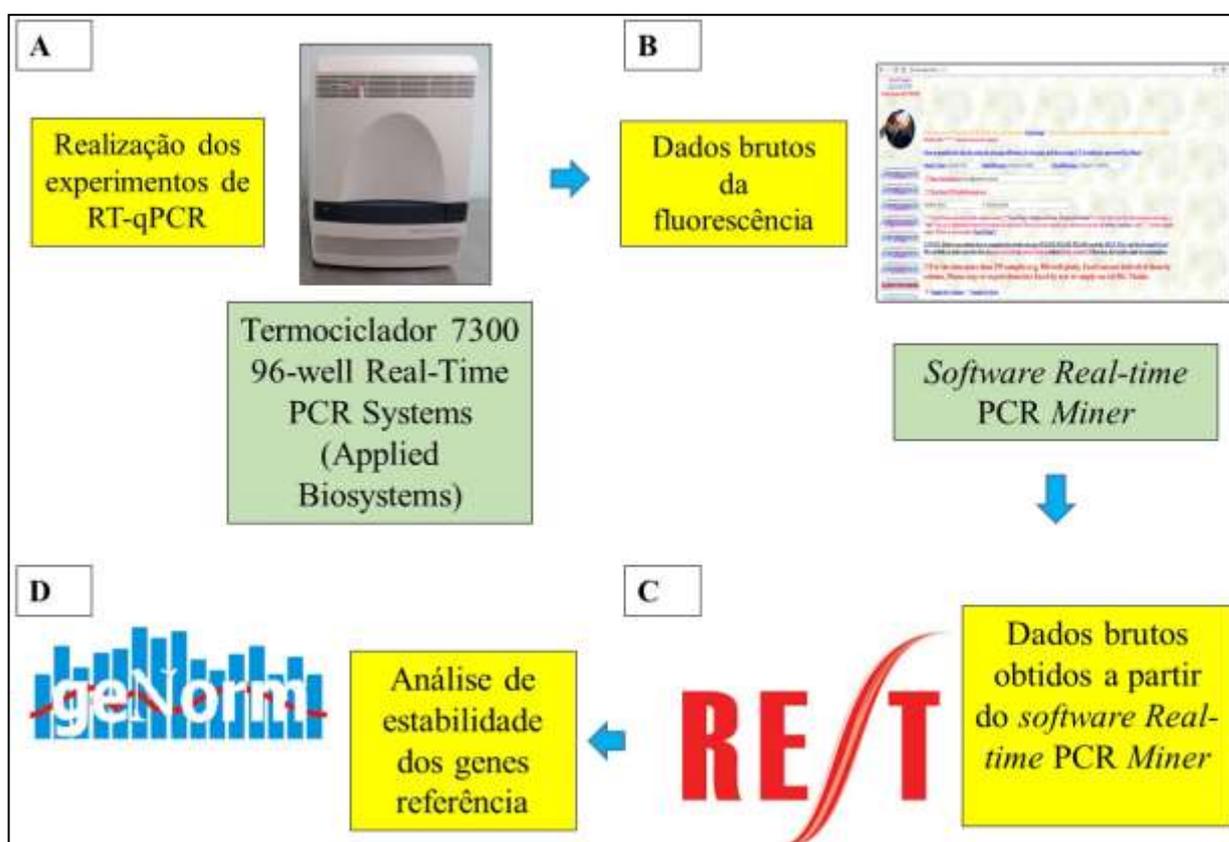


Figura 5. Equipamento e *softwares* utilizados para análise de expressão gênica. Realização dos experimentos de RT-qPCR no termociclador 730 96-well Real-Time PCR Systems (A); Importação dos dados brutos da fluorescência para o *software* Real-time PCR Miner (B);

Importação dos dados brutos da fluorescência do *software Real-time PCR Miner* para o *software REST (C)*; e análise de estabilidade dos genes referência no software geNorm (D).

5. RESULTADOS

Buscando compreender melhor os processos moleculares e os padrões de expressão de genes envolvidos na aquisição da competência embriogênica em dois genótipos F1 do híbrido interespecífico *Elaeis oleifera* x *E. guineensis* contrastantes quanto á aquisição da competência embriogênica, uma análise de expressão gênica detalhada foi realizada por RT-qPCR em cinco estádios (0 antes da indução, 14, 30 ,90 e 150 DAI). O RNA total extraído apresentou rendimento médio de 600 ng/μL e, após a síntese de cDNA, foi realizada RT-PCR para uma avaliação preliminar dos cDNAs utilizando um par de *primers* para actina. Os resultados obtidos mostraram que as diluições 1:10 e 1:20 não apresentaram diferenças na amplificação do produto esperado (Figura 6). Portanto, como não houve diferença na amplificação, foi utilizada a diluição 1:20. Como esperado, os controles negativos (com água e sem cDNA) não produziram produto de amplificação, confirmando a ausência de contaminantes.

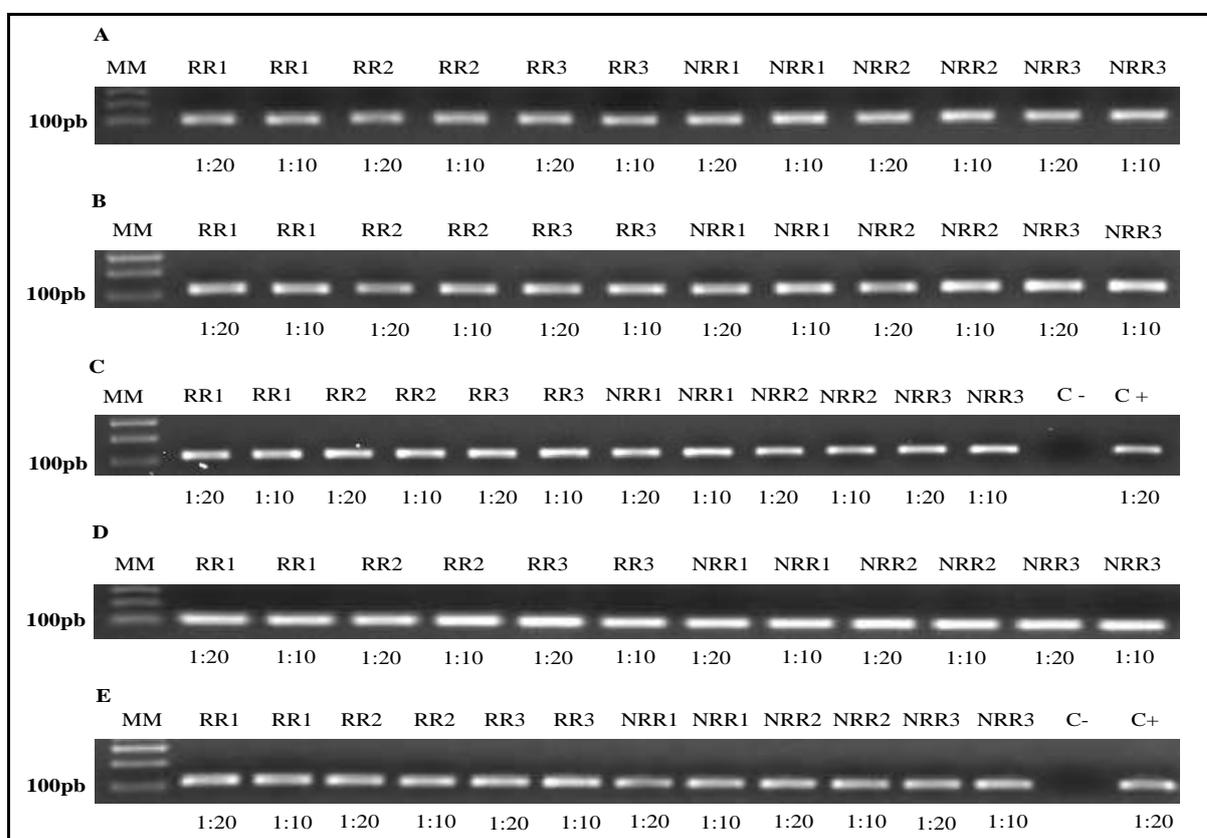


Figura 6. Avaliação dos cDNAs por RT-PCR, diluídos 1:10 e 1:20. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Gel **A** - tempo 0 antes da indução de calos embriogênicos. Gel **B** - 14 DAI (dias após a indução). Gel **C** - 30 DAI. Gel **D** - 90 DAI. Gel **E** - 150 DAI. As replicas do genótipo responsivo estão indicadas por RR1, RR2, RR3, e do genótipo não responsivo por NRR1, NRR2, NRR3.

Todos os 7 *primers* dos genes de referência, incluindo Predicted 40S ribosomal protein S27-2 (*PD00380*), Eukaryotic initiation factor 4A (*EIF2*), Manganese superoxide dismutase (*PD00569*), Actina (*ACT1*), Actin/mreB/sugarKinase/HSP70 superfamily (*ACT2*), Eukaryotic initiation factor 4 (*EIF1*) e Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (Tabela 1), foram avaliados para verificar a ausência de formação de dímeros e produtos inespecíficos. Os *primers GAPDH* resultaram na formação de dímeros de *primer*, enquanto que os *primers EIF1* resultaram em um produto de amplificação de aproximadamente 214 pares de base, maior que os amplicons dos demais genes avaliados, e os *primers ACT1* revelaram amplificação de produto inespecífico. Assim, estes *primers* foram excluídos das análises. Os *primers EIF2*, *PD00380*, *PD00569* e *ACT2* apresentaram apenas uma banda com tamanho esperado (Figura 7) e seguiram para as análises de RT-qPCR.

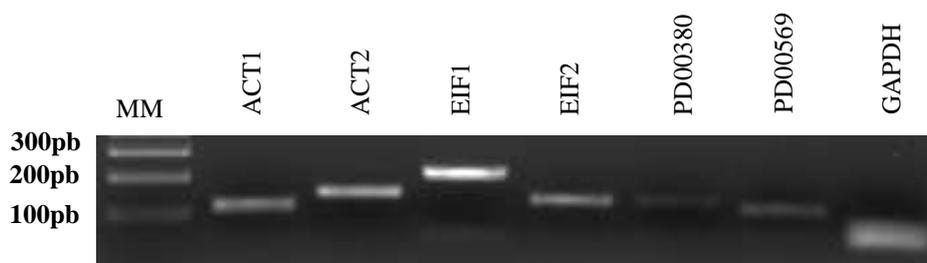


Figura 7. Avaliação dos *primers* de referência por RT-PCR. Eletroforese em gel de agarose 1%.

Após padronizar a amplificação por RT-PCR, obtendo-se um fragmento único, de tamanho esperado para os genes de referência, foi realizada uma avaliação destes *primers* por RT-qPCR (Figura 8).

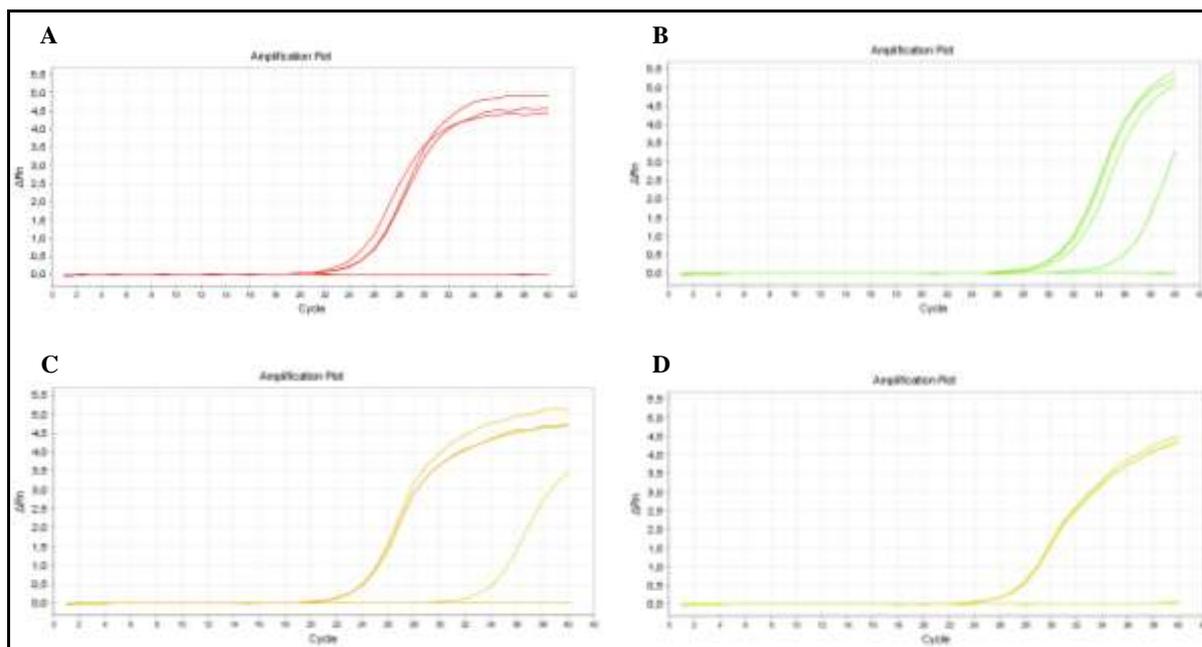


Figura 8. Gráficos de amplificação dos genes de referência *ACT2* (A), *PD00569* (B), *EIF2* (C), *PD00380* (D).

Com a finalidade de selecionar os genes de referência mais estáveis, os primers para os genes *EIF2*, *PD00380*, *PD00569* e *ACT2* tiveram a estabilidade avaliada com o auxílio do *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 *PD00380* e *ACT2* (Figura 9). Portanto, estes foram utilizados para a normalização das expressões relativas.

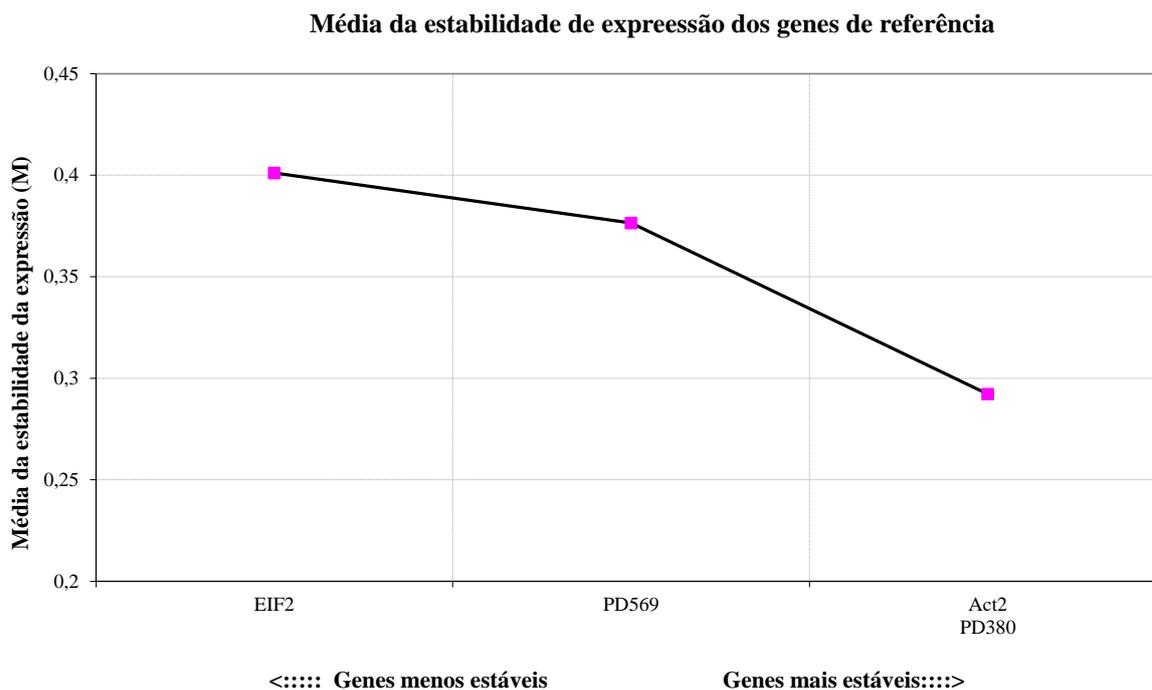


Figura 9. Média da estabilidade da expressão dos genes de referência.

Posteriormente, para verificar contaminações com DNA genômico por RT-qPCR, foi feito um *pool* com todos os RNAs tratados com DNase. Os *primers* referência para *ACT2* e *EIF2* foram utilizados para esta avaliação e os resultados mostraram que não houve amplificação para ambos os *primers*, confirmando a ausência de contaminação por DNA genômico (Figura 10).

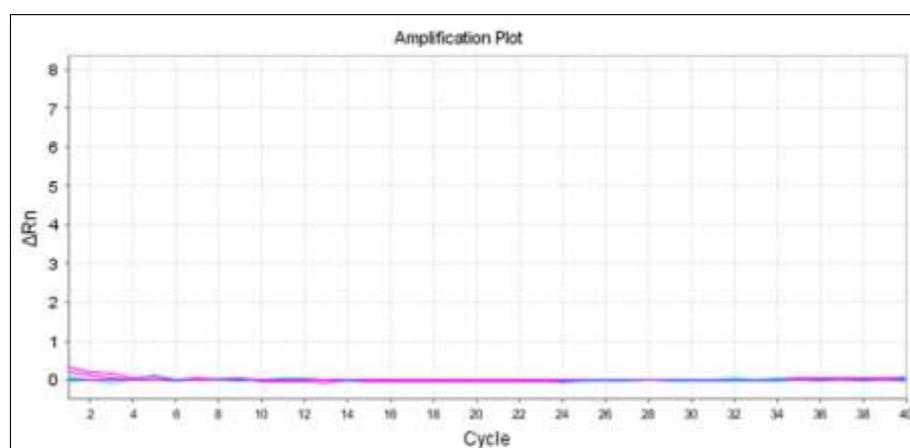
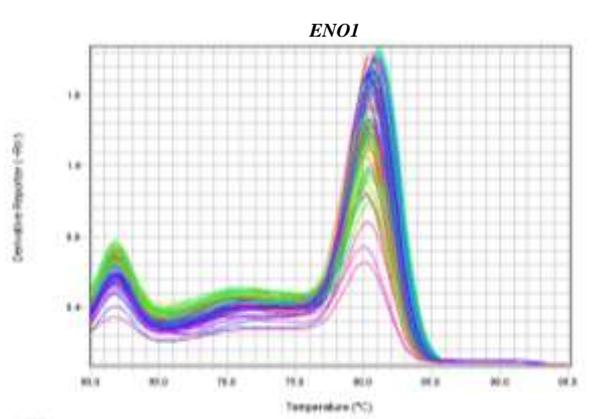
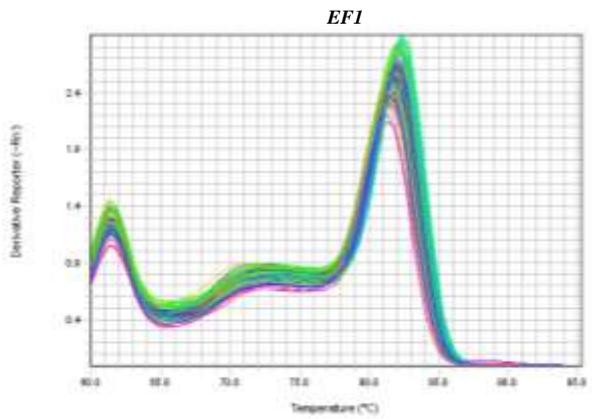
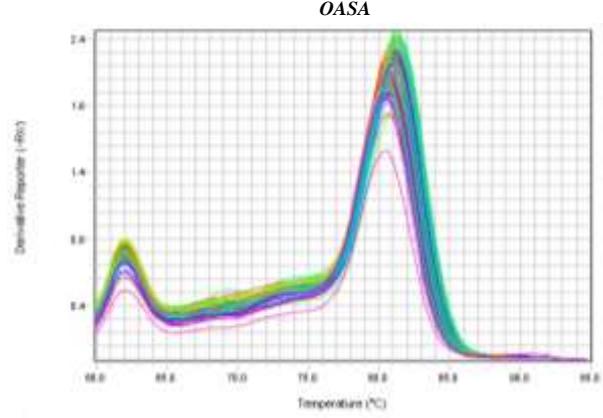
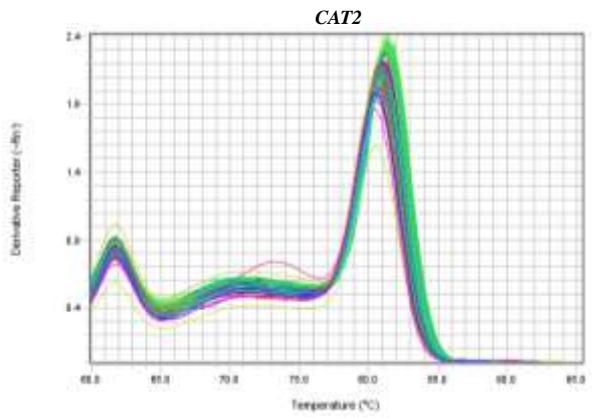
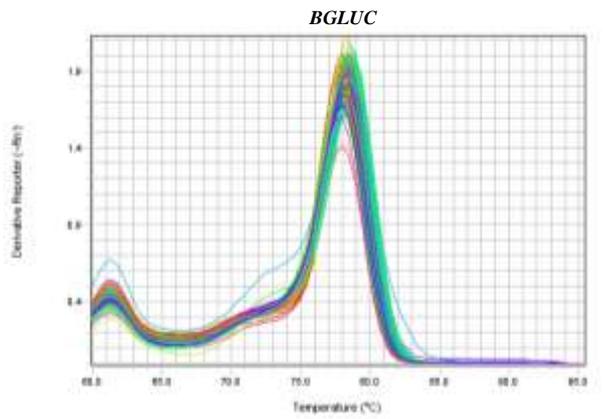
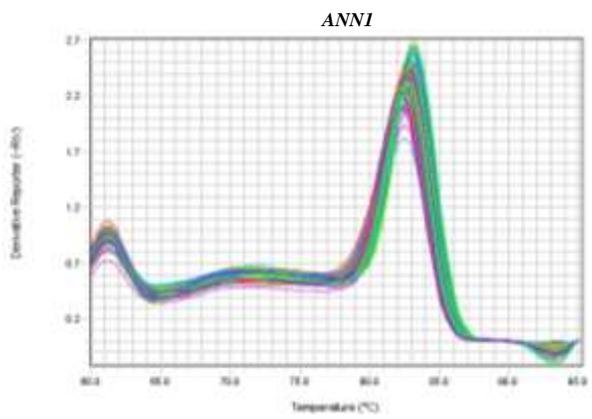
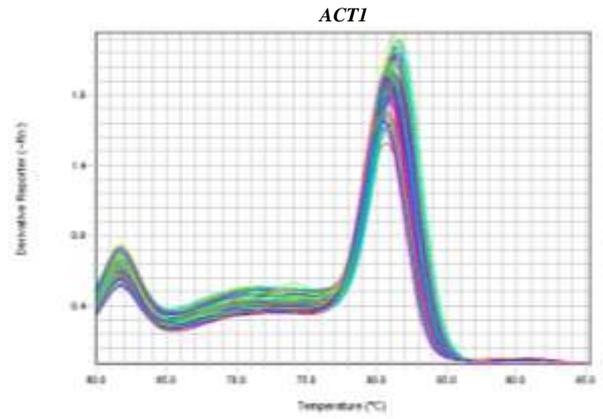
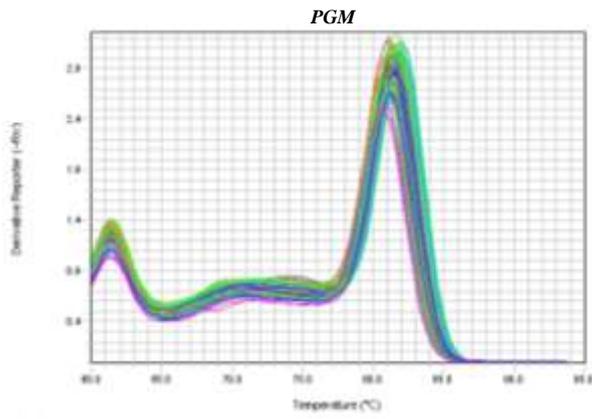
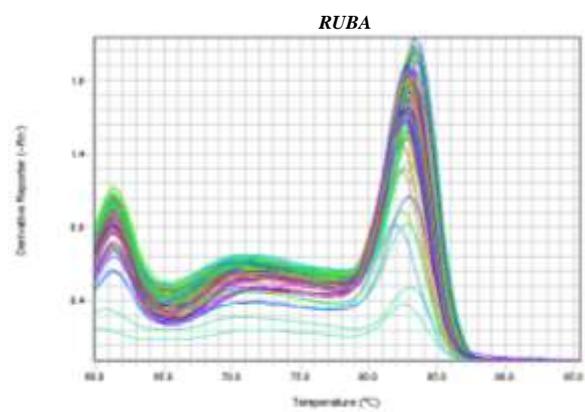
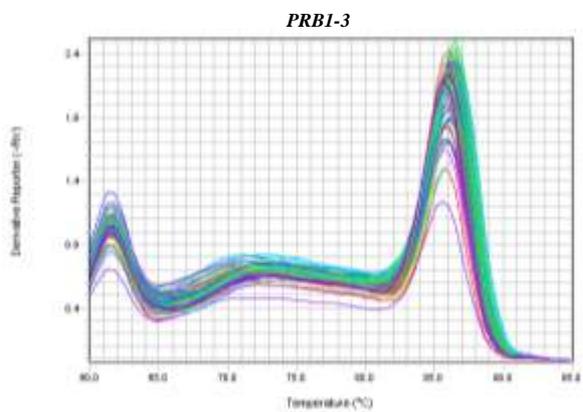
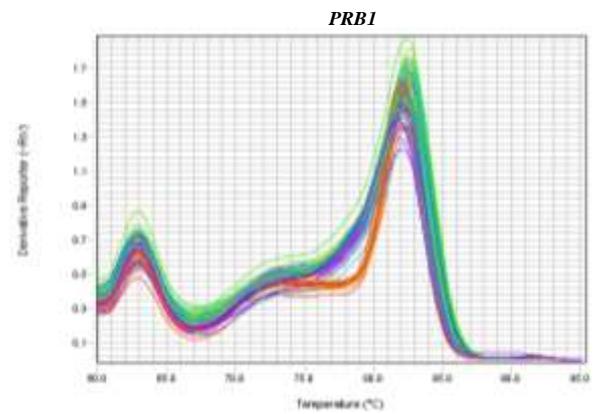
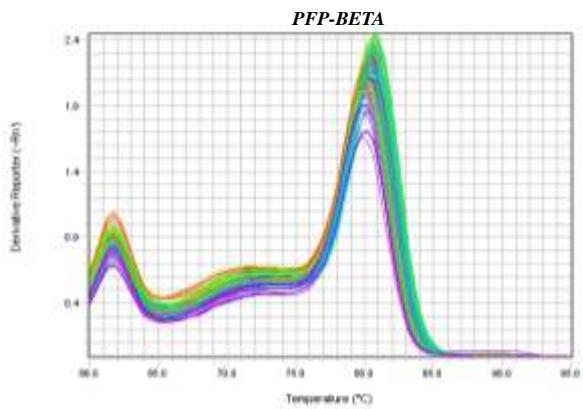
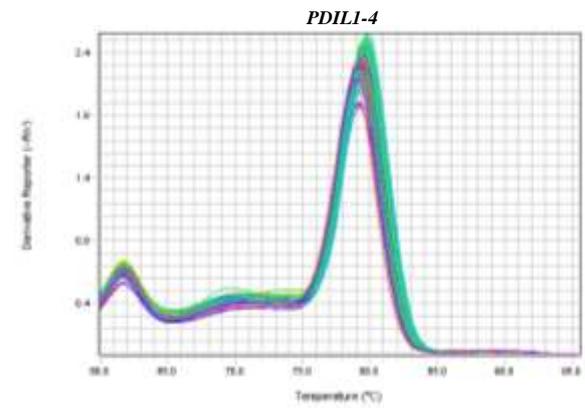
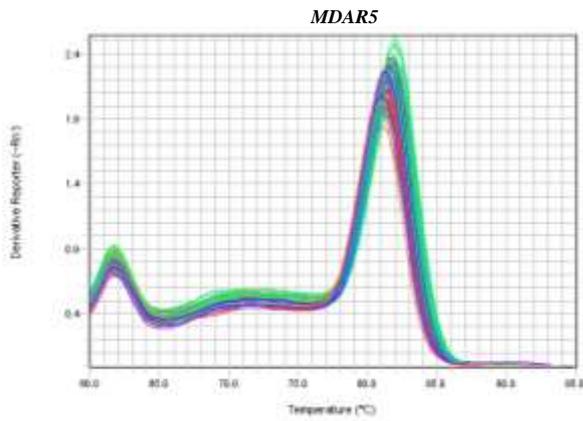
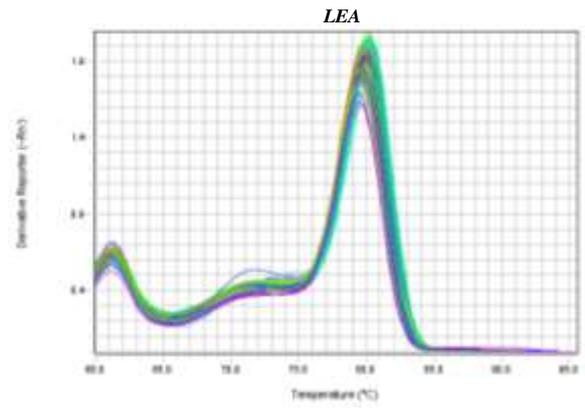
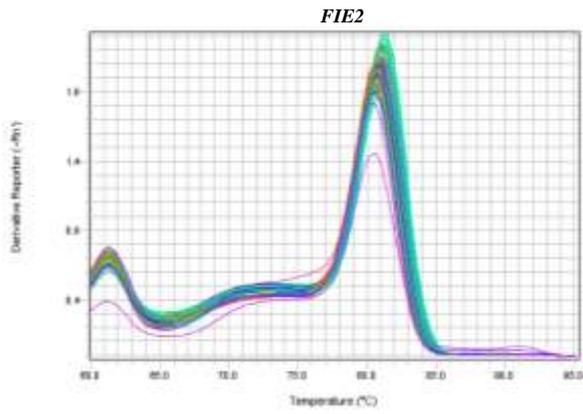


Figura 10. Ausência de contaminação com DNA genômico, utilizando os *primers* de referência *ACT2* e *EIF2*.

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, 19 foram específicos na amplificação, gerando um único produto de PCR, com tamanho desejado de amplicon, indicando especificidade dos primers em todos os tempos de coleta (Figura 11). Portanto, esses 19 genes seguiram para as análises de expressão relativa por RT-qPCR. Os demais 10 pares primers apresentaram amplificação de produtos inespecíficos e, portanto, foram excluídos das análises.





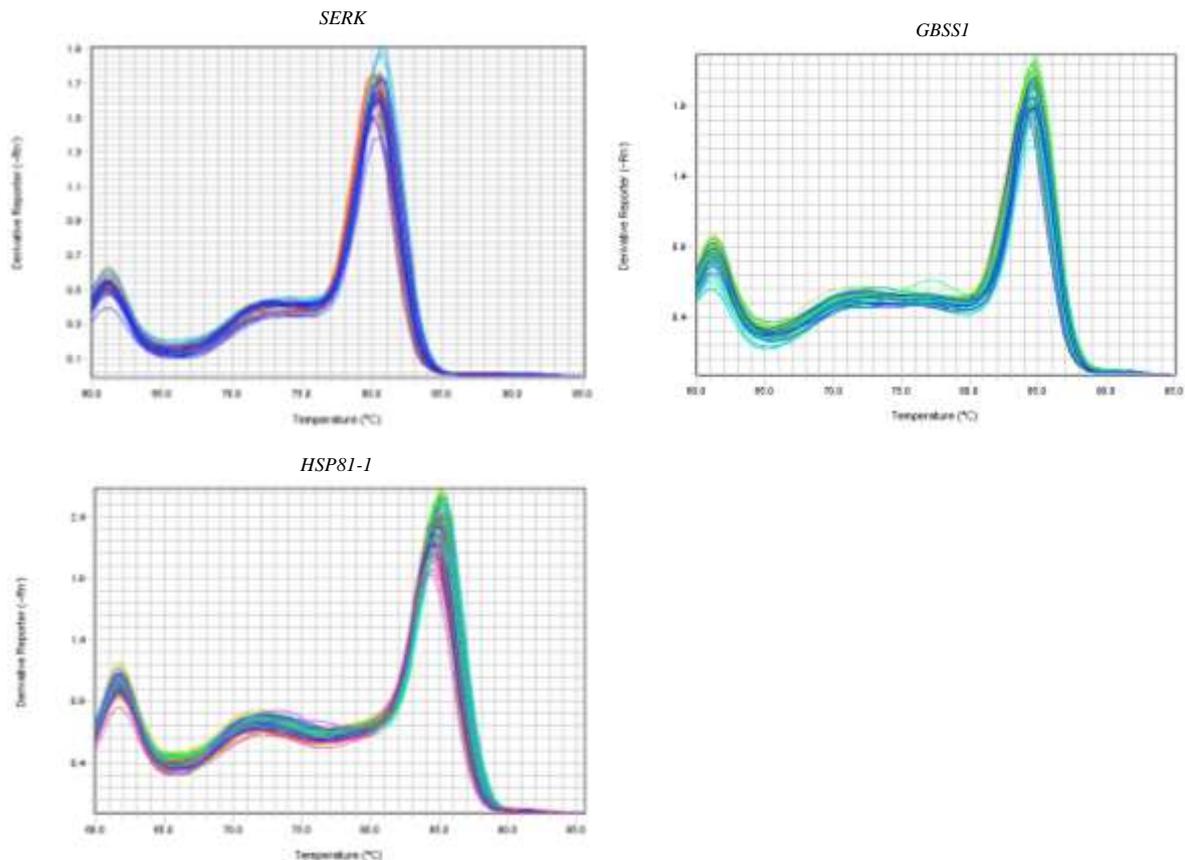


Figura 11. Curva de dissociação da amplificação dos 19 genes candidatos que apresentaram amplificação em todos os tempos de coleta.

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

5.1.1 Comparação da expressão relativa no genótipo responsivo (R) e não responsivo (NR)

Visando avaliar a expressão diferencial de genes potencialmente envolvidos na aquisição da competência embriogênica e compreender os processos moleculares envolvidos, a expressão relativa de 19 genes foi analisada em dois genótipos contrastante para a aquisição de competência embriogênica. Os genes avaliados foram: *PGM*, *ACT1*, *ANN1*, *CAT2*, *OASA*, *ENO1*, *MDAR5*, *PFP-BETA*, *RUBA*, *PDIL1-4*, *PRB1*, *PRB1-3*, *EF1*, *HSP81-1*, *GBSS1*, *LEA*, *FIE2*, *SERK* e *BGLUC* (Tabela 1). Para a análise da expressão relativa foram utilizados os genes de referência *ACT2* (XIA et al., 2014) e *PD00380* (CHAN et al., 2014) como genes normalizadores.

Os resultados obtidos mostraram que a maioria dos genes analisados neste estudo tiveram suas expressões negativamente regulados em 14 DAI quando o genótipo R foi comparado com o genótipo NR (Figuras 12 e 14). Foi interessante observar que a expressão relativa da maioria dos genes analisados nesta comparação foi positivamente regulada somente a partir de 30 DAI no genótipo R quando comparado com o genótipo NR. Esse aumento em 30 DAI indica que os mecanismos de resposta à aquisição de competência embriogênica foram possivelmente ativados no genótipo R, apresentando maiores níveis de expressão dos genes candidatos avaliados do que no genótipo NR. Este aumento pode ser explicado pela intensa divisão e alongamento celular que ocorre no início da indução de calos, havendo a necessidade de síntese de proteínas específicas que são responsáveis por alterações morfológicas e bioquímicas (DEWITTE e MURRAY, 2003).

Gene	Genótipo R x NR				
	0 DAI	14 DAI	30 DAI	90 DAI	150 DAI
<i>PGM</i>					
<i>ACT1</i>					
<i>ANN1</i>					
<i>Bgluc</i>					
<i>CAT2</i>					
<i>OASA</i>					
<i>EF1</i>					
<i>ENO1</i>					
<i>FIE2</i>					
<i>LEA</i>					
<i>MDAR5</i>					
<i>PDIL1-4</i>					
<i>PFP-BETA</i>					
<i>PRB1</i>					
<i>PRB1-3</i>					
<i>RUBA</i>					
<i>SERK</i>					
<i>GBSS1</i>					
<i>HSP81-1</i>					

Figura 12. Análise da expressão relativa dos genes candidatos comparando o genótipo R x NR em cada estágio de coleta. Branco: não houve expressão significativa, vermelho: diminuição da expressão relativa, azul: aumento da expressão relativa.

Foi interessante observar também que a maioria dos genes avaliados se apresentaram regulados positivamente em 90 e 150 DAI no genótipo R quando comparado ao NR, indicando, que possivelmente nesses estádios, muitos processos ainda podem estar ativados. Esse perfil também foi observado na maioria das proteínas codificadas por estes genes nas análises proteômicas realizada em 14 e 150 DAI por Almeida et al. (2017), mostrando uma tendência similar entre a expressão gênica e abundância de proteínas.

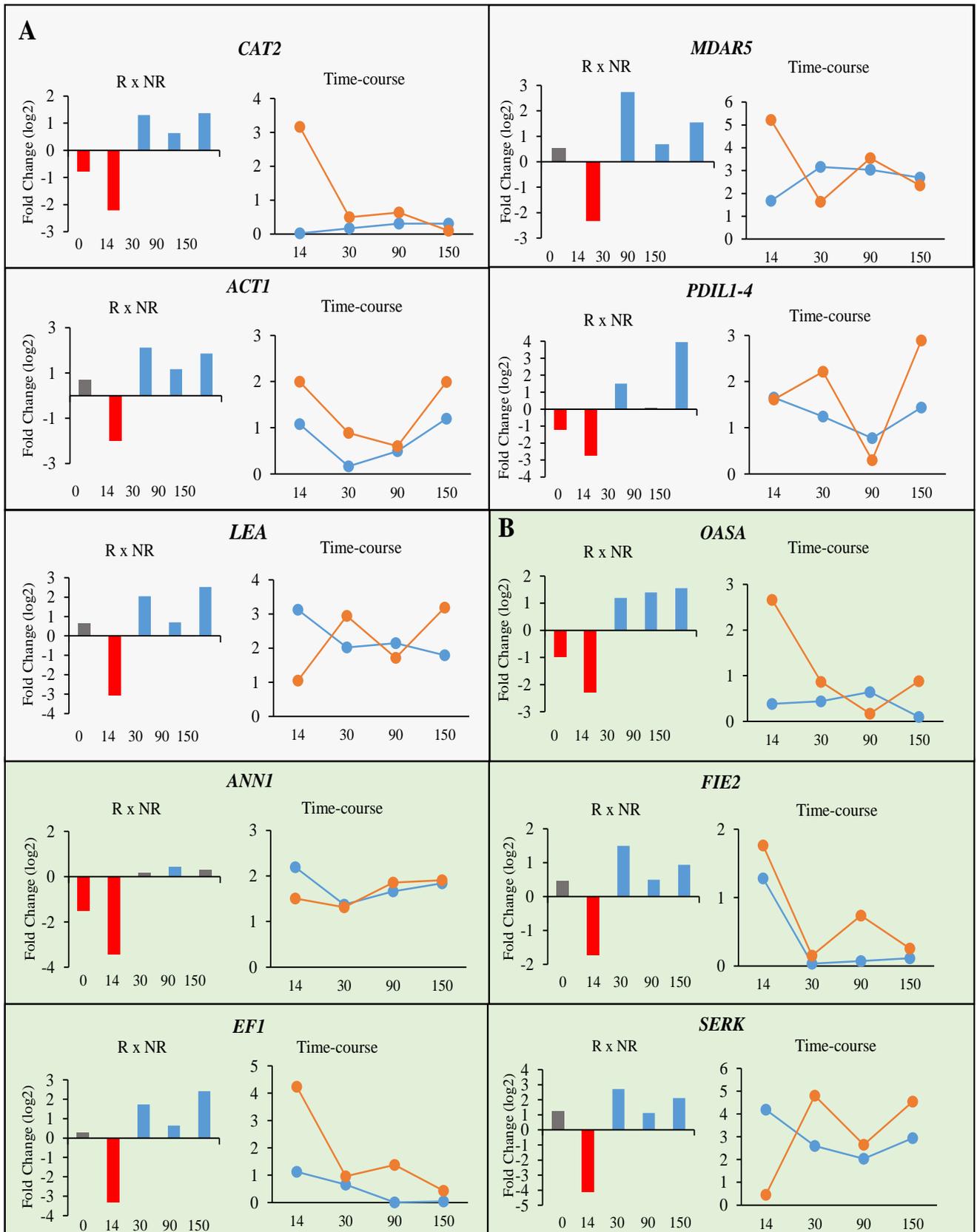
5.1.2 “Time-course” da expressão relativa do genótipo R e do genótipo NR

Visando observar a expressão dos 19 genes potencialmente envolvidos na aquisição de competência embriogênica ao longo dos estádios, uma análise da expressão relativa para os dois genótipos foi realizada utilizando o tempo 0 (antes da indução) de cada genótipo como controle. Os resultados da análise da expressão relativa dos genes ao longo dos estádios para cada genótipo revelaram que no genótipo NR, a maioria dos genes foram induzidos em 14 DAI quando comparado com o tempo 0 DAI (Figura 13). Já no genótipo R a maioria dos genes foram reprimidos em 14 DAI quando comparados com o tempo 0 (Figura 13). Também foi possível observar que alguns dos genes avaliados como *EF1*, *PRB1-3*, *OASA*, *MDAR5* e *RUBA* tiveram seus níveis de expressão aumentados no decorrer dos estádios, enquanto que os genes *ANN1*, *PRB1*, *ACT1*, *PDIL1-4*, *LEA*, *ENO1*, *SERK*, *HSP801-1*, *GBSS1* e *PFP-BETA* mostraram-se diminuídos. Os genes *FIE2*, *CAT2*, *Bgluc* e *PGM* não mostraram diferenças de expressão significativas no genótipo R.

Estes resultados sugerem que os níveis de estresses no tempo 0 DAI no genótipo NR são altos possivelmente devido a retirada da planta do campo, indicando que a modulação do estresse pode ser crucial para a adaptação dos genótipos quando submetidos ao meio de indução. Uma das hipóteses sobre o mecanismo envolvido na indução da ES pelo estresse destaca a importância da interação entre auxinas e a sinalização do estresse, que resulta na aquisição da competência embriogênica da célula somática por meio da reprogramação celular manifestada em diferentes níveis (FEHÉR et al., 2003).

Gene	Genótipo R (B351733)				Genótipo NR (B352933)			
	14 DAI	30 DAI	90 DAI	150 DAI	14 DAI	30 DAI	90 DAI	150 DAI
<i>PGM</i>	Red	White	White	White	Blue	Red	Blue	White
<i>ACT1</i>	Red	White	White	Red	Blue	Red	Red	Red
<i>ANN1</i>	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
<i>Bgluc</i>	White	White	Red	Red	Red	White	White	White
<i>CAT2</i>	White	White	White	White	Blue	White	Blue	White
<i>OASA</i>	White	White	Blue	White	Blue	Red	White	Red
<i>EF1</i>	Red	White	White	White	Blue	Blue	Blue	White
<i>ENO1</i>	Red	Red	Red	Red	White	White	White	White
<i>FIE2</i>	White	White	White	White	White	White	White	White
<i>LEA</i>	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
<i>MDAR5</i>	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
<i>PDIL1-4</i>	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
<i>PFP-BETA</i>	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	White	Red
<i>PRB1</i>	Red	White	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Blue
<i>PRB1-3</i>	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
<i>RUBA</i>	Blue	White	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	White
<i>SERK</i>	Red	Red	Red	Red	White	Red	Red	Red
<i>GBSS1</i>	Red	Red	White	White	Blue	Red	White	Red
<i>HSP81-1</i>	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red

Figura 13. Análise da expressão relativa dos genes candidatos ao longo dos estádios, utilizando o tempo 0 como controle. Branco: não houve expressão relativa, vermelho: diminuição da expressão relativa, azul: aumento da expressão relativa.



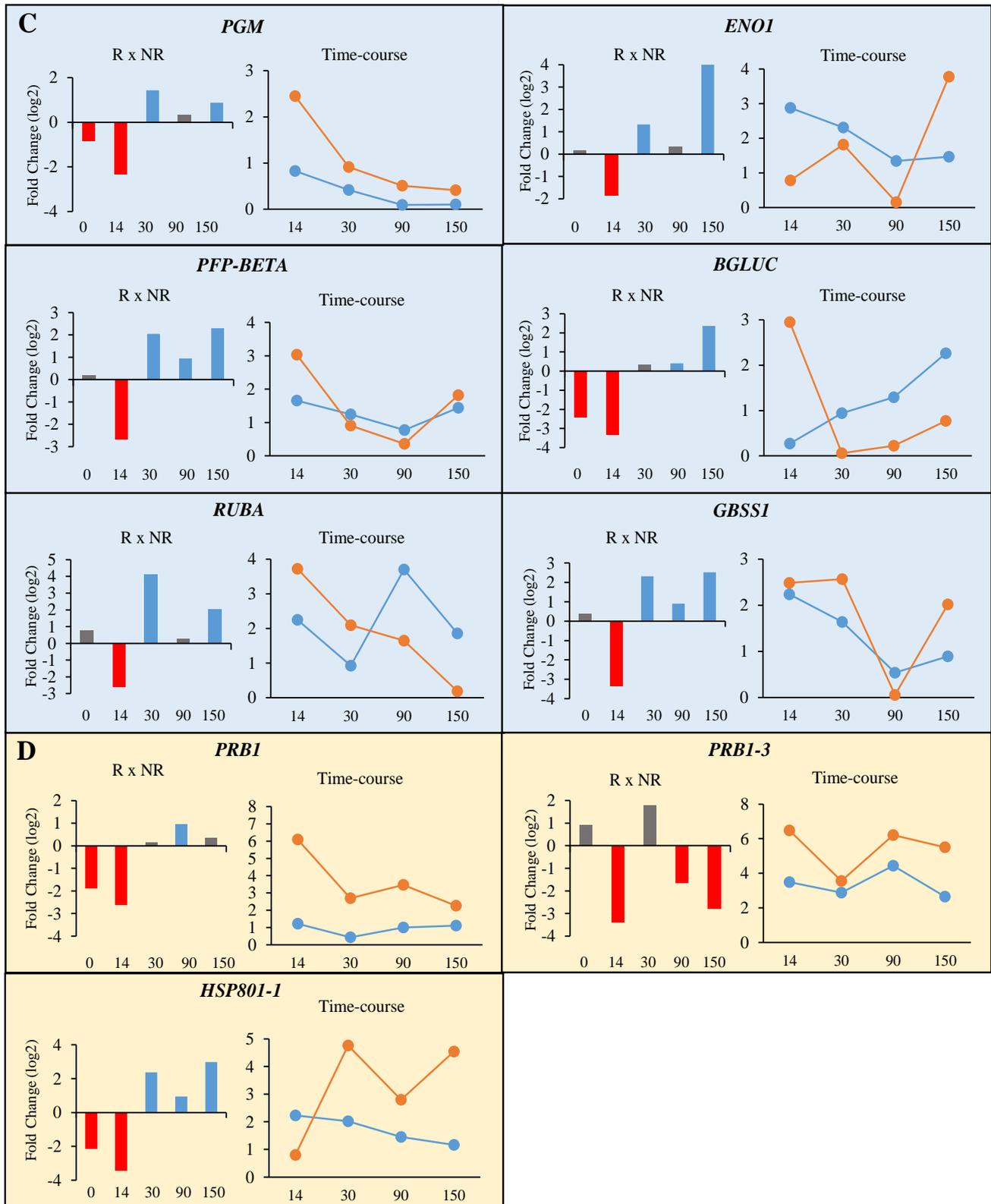


Figura 14. Gráfico 1- análise da expressão relativa comparando o genótipo “R x NR” em cada estágio de coleta. **A-** Resposta ao estresse; **B-** Desenvolvimento; **C-** Metabolismo energético e **D-** Resposta de defesa. As barras vermelhas indicam os genes negativamente regulados, as barras azuis os genes positivamente regulados e as barras cinzas expressão relativa não significativa. **Gráfico 2-** análise da

expressão relativa dos genes ao longo dos estádios (“Time- course”) para o genótipo R (azul) e NR (laranja), utilizando o tempo 0 como controle $p \leq 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Para compreender os processos biológicos em que esses 19 genes estão envolvidos foi realizada a análise de ontologia gênica (GO) para se obter a classificação funcional desses genes. Os genes avaliados neste estudo apresentam importantes papéis relacionados especialmente com respostas ao estresse, respostas de defesa, metabolismo energético e desenvolvimento (Tabela 2). Estes genes parecem participar no controle do estresse e adaptação dos genótipos à condição *in vitro* impostas durante a indução da embriogênese somática.

Este estudo indica que, possivelmente, as respostas contrastantes de aquisição de competência embriogênica entre o genótipo R e o genótipo NR possam estar relacionadas ao aumento da expressão de genes envolvidos em resposta ao estresse, resposta de defesa, metabolismo energético e desenvolvimento, uma vez que, em 30, 90 e 150 DAI, a expressão dos genes envolvidos nesses processos tiveram um aumento significativo no genótipo R nesses três estádios quando comparado com o genótipo NR. Esses resultados indicam que estes genes podem ter um importante papel na maior adaptação do genótipo R ao cultivo *in vitro* em relação ao NR.

6.1 Genes diferencialmente regulados no genótipo responsivo associados ao estresse durante a ES

As fases iniciais da ES são caracterizadas pela indução de muitos genes relacionados ao estresse, o que leva à suposição de que esta via morfogênica é uma resposta extrema ao estresse de células cultivadas *in vitro* (FEHÉR et al., 2003). O controle do estresse oxidativo em níveis adequados tem sido relatado como um dos principais eventos para o desenvolvimento da ES (SHARIFI et al., 2012). A capacidade de controlar o estresse oxidativo e preservar a estrutura proteica parece ser uma peça chave para o sucesso do processo de aquisição de competência embriogênica (De Carvalho et al., 2014). Incluída na resposta ao estresse oxidativo celular está a regulação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, as quais amenizam os danos causados pelas espécies reativas de

oxigênio (EROs) (CYRNE et al., 2003). Estas enzimas são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico, servindo como sinalizadores (FEHÉR et al., 2003). De acordo com Libik e colaboradores (2005) e Konieczny e colaboradores (2008), o aumento da atividade de enzimas antioxidantes está relacionado ao estresse oxidativo e que esse estresse contribui para acelerar o processo de resposta embriogênica nos tecidos somáticos.

Neste estudo, 6 dos 19 genes avaliados estão associados com a resposta ao estresse oxidativo, são eles: *CAT2* (GO:0098869, GO:0055114 e GO:0042542), *MDAR5* (GO:0055114), *ACT1*, *PDIL1-4* (GO:0045454 e GO:0034976), *LEA* (GO:0009269 e GO:0009735) E *HSP801-1* (Tabela 2). Estes genes tiveram suas expressões reguladas negativamente em 14 DAI e reguladas positivamente em 30, 90 e 150 DAI no genótipo R quando comparado com o genótipo NR (Figura 14). Isso indica que o controle do estresse a partir de 30 DAI no genótipo R pode ser um fator determinante para a aquisição de competência embriogênica em palma de óleo. Portanto 30 DAI parece ser o momento chave em que o genótipo R consegue se adaptar as condições de estresse a ele imposto. Por outro lado, a expressão diminuída dos genes *CAT1*, *MDAR5*, *ACT1*, *LEA* e *PDIL1-4* no genótipo NR em 30, 90 e 150 DAI pode ter contribuído para os altos níveis de oxidação que pode ser uma das causas para a não formação de calos neste genótipo.

Os genes *CAT2*, *MDAR5* e *ACT1* apresentaram uma tendência similar com os dados proteômicos obtidos por Almeida e colaboradores (2017), em 14 e 150 DAI confirmando assim a hipótese de que genes diferencialmente expressos no genótipo R estão envolvidos com a competência embriogênica. De acordo com Araldi e colaboradores (2016) e Zhou e colaboradores (2016), a catalase é uma proteína antioxidante que age na regulação de EROs, 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 (MHAMDI et al., 2010), resultando em água e oxigênio estável. Esta enzima degradante de H_2O_2 não consome equivalentes redutores da célula e possui mecanismo muito eficiente para a remoção do H_2O_2 formado sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000).

A atividade da catalase está relacionada à concentração de H_2O_2 e foi associada ao potencial embriogênico dos calos de *Mesembryanthemum crystallinum* (LIBIK et al., 2005) e *Larix leptolepis* (ZHANG et al., 2010) durante a ES. Foi reportado na cultura de *Lycium barbarum* que nos primeiros dias de diferenciação celular a atividade da catalase é diminuída e que sua atividade é aumentada com a divisão de células embriogênicas (KAIRONG et al.,

1999), corroborando os resultados obtidos neste estudo. Assim como *CATI*, *MDAR5* também possui atividade antioxidante (ZHANG et al. 2010; DÍAZ-VIVANCOS et al. 2011; ZHANG et al. 2015). Em *Crocus sativus* *MDAR5* teve uma alta atividade desde o embrião nodular até o embrião maduro (BLAZQUEZ et al., 2009), mostrando-se de suma importância no processo da ES. Já a actina tem sido associada ao processo de morte celular programada da célula vegetal (SMERTENKO e FRANKLIN-TONG 2011) e, devido a isso, é considerada um efetivo marcador de sinalização durante este processo (GOURLAY e AYSCOUGH 2005).

O gene *LEA* também está relacionado com a resposta ao estresse (GODOY et al., 1994), apresentando-se regulado positivamente em 30, 90 e 150 DAI no genótipo R quando comparado com o genótipo NR. Essa alta expressão do gene *LEA* nesses estádios é possivelmente devido ao estresse osmótico que ocorre durante o processo de indução da ES. Os produtos desta família de genes podem estar relacionados com uma função de osmoproteção, como defesa de estruturas celulares nos embriões maduros de sementes durante a dessecação e prevenção da germinação precoce dos embriões zigóticos durante o desenvolvimento da semente (WILDE et al., 1995; DONG & DUNSTAN, 2000; SHIH et al., 2008).

Além da regulação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, outros genes também estão relacionados a condição de estresse na ES, como os genes de resposta de defesa. As plantas ativam uma diversidade de respostas de defesa durante estresses bióticos e abióticos, e esse processo permite a ativação de genes de defesa nas plantas (DATTA et al., 1999). O presente estudo também avaliou genes que estão relacionados com resposta de defesa durante a ES como o *PRB1* (GO:0009607 e GO:0006952) e *PRB1-3* (GO:0009607 e GO:0006952) (Tabela 2). Estes genes foram regulados negativamente em 14 DAI quando o genótipo R foi comparado com o NR (Figura 14). Já na expressão relativa dos genes ao longo dos estádios usando o tempo 0 DAI como controle no genótipo NR, ambos os genes envolvidos com a resposta de defesa tiveram uma alta expressão em 14 DAI. Já no genótipo R o gene *PRB1* teve sua expressão regulada negativamente ao longo dos estádios (Figura 13). A ativação desses genes em 90 DAI reforça a necessidade do controle do estresse para o desenvolvimento da ES, enquanto que a diminuição dos mesmos em 90 e 150 DAI pode estar relacionada ao controle do estresse. Portanto, é possível que a ativação das PRs esteja relacionada a adaptação do estresse na fase de indução da ES em palma de óleo e não somente

ao estresse biótico, como já relatado em outras espécies (ACHARYA et al., 2013; SINGH, NAVEEN KUMAR et al., 2013).

6.2 Metabolismo energético

Proteínas de metabolismo energético já foram relatadas em outros estudos de ES em *E. guineensis* mostrando que algumas atividades celulares em condições *in vitro* exigem altos níveis de energia, o que explica a abundância relativa dessas proteínas durante alguns estádios de desenvolvimento da ES (NOAH et al., 2013; DE CARVALHO, et al., 2014). Muitos estudos têm sido realizados mostrando a comparação entre embriões somáticos e embriões zigóticos e já foi descrito que o metabolismo energético é mais ativo em embriões somáticos (SGHAIER-HAMMAMI et al., 2009; MOREL et al., 2014). De acordo com Rolland e colaboradores (2002), o metabolismo energético envolve a biossíntese de carboidratos e lipídios, os quais armazenam energia e são então quebrados e consumidos na forma de ATP, fornecendo energia para a maioria das atividades celulares.

No presente estudo, alguns genes foram relacionados ao metabolismo energético como os genes *ENO1*, *PGM*, *PPF-BETA*, *BGLUC*, *RUBA* e *GBSSI* (Tabela 2). Estes genes tiveram suas expressões reguladas negativamente em 14 DAI e reguladas positivamente em 30, 90 e 150 DAI no genótipo R quando comparado com o genótipo NR. Estes dados também são similares aos dados proteômicos obtidos por Almeida e colaboradores (2017) para os genes *ENO1*, *PGM*, *PPF- BETA* e *RUBA*. O comportamento destes genes pode indicar um alto gasto energético na indução dos calos. Assim, para haver um alto consumo energético é necessário que haja uma alta produção de ATP, e isto pode explicar a expressão aumentada desses genes em 30, 90 e 150 DAI no genótipo R indicando uma forte ligação ao processo de aquisição de competência embriogênica.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboramos resultados de Lippert e colaboradores (2005) e Silva e colaboradores (2014) também descreveram a enolase como envolvida no processo da ES, apresentando expressão aumentada. De acordo com Barkla e colaboradores (2009), a enolase tem como papel principal a conversão de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (PEP) na via glicolítica, convertendo glicose em piruvato, tendo como produto final NADH e ATP. Portanto, uma alta abundância de enolase é esperada (RODE et al. 2011). É importante ressaltar a participação do gene *RUBA* na ES. Esse gene foi regulado positivamente em 30, 90 e 150 DAI no genótipo R quando comparado com o genótipo NR,

indicando que a sua presença parece ser de suma importância no processo de aquisição de competência embriogênica. Esse gene já foi relatado por Tan e colaboradores (2016), mostrando também alta abundância em folhas jovens. É possível que esse gene esteja relacionado à fotorrespiração do tecido, que evita o acúmulo de produtos tóxicos como o 2-fosfoglicerato (BAUWE et al. 2012). Assim, estes resultados também podem explicar o baixo nível oxidativo dos tecidos no genótipo R quando comparado ao genótipo NR, uma vez que o *RUBA* poderia estar agindo no controle deste estresse.

Com relação aos genes *PPF-BETA* e *PGM*, estes já foram associadas com o fornecimento de energia durante a indução de calos em *Nelumbo nucifera* Gaertn. spp. *baijianlian*, na formação e desenvolvimento de embriões torpedo de *Coffea arabica* e também em suspensões celulares de *E. guineensis* em resposta a diferentes concentrações de auxina (ROOWI et al. 2010; TONIETTO et al. 2012; LIU et al. 2016). O gene *GBSSI* está envolvido na síntese de amido no amiloplasto (DENYER et al., 1999; MIYAZAWA et al. 1999). Estudos histológicos realizados por Kanchanapoom e Domyoas (1999) e Almeida e colaboradores (2017) mostraram a acumulação de grãos de amido durante a indução da ES em palma de óleo. Estes resultados podem explicar o aumento da transcrição do *GBSSI* em 30, 90 e 150 DAI no genótipo R quando comparado ao genótipo NR.

6.3 Genes associados com desenvolvimento

Durante a ES, ocorrem alterações bioquímicas e morfológicas ao longo do desenvolvimento dos tecidos induzidos, o que está intimamente relacionado a alterações na expressão gênica. Vários genes são diferencialmente expressos durante a indução da embriogênese somática, enquanto outros são expressos durante a diferenciação da maturação do embrião até o desenvolvimento da planta (SANTOS et al., 2009). Entre os genes associados ao desenvolvimento estão *ANNI*, *EF1*, *SERK* OASA e *FIE2* (Tabela 2). Os genes *ANNI*, *EF1*, *SERK* e *FIE2* apresentaram-se regulados negativamente em 14 DAI e regulados positivamente em 30, 90 e 150 DAI quando o genótipo R foi comparado ao genótipo NR (Figura 14). Já foi descrito que as anexinas estão relacionadas com processos de desenvolvimento vegetal, como germinação do pólen e alongamento das fibras de algodão (SHAO et al. 2007; ZHAO et al. 2010; LAOHAVISIT e DAVIES 2011), além de atuarem nos estádios iniciais da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de dendezeiro; durante a embriogênese somática de *Coffea arabica* L. e como marcador molecular dos

estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *Manihot esculenta* Crantz (BABA et al. 2008; TONIETTO et al. 2012; DE CARVALHO SILVA et al. 2014).

Entre os genes envolvidos na indução da embriogênese somática, o gene *SERK* tem um papel importante. Este gene foi isolado primeiramente de células embriogênicas de cenoura e é considerado como um marcador molecular para embriogênese somática (SCHMIDT et al., 1997 e SOMLEVA et al., 2000). *SERK* é uma proteína quinase transmembrana de repetição rica em leucina (LRR) que aumentou a capacidade do meristema apical em *Arabidopsis* de formar embriões somáticos (HECHT et al., 2001). A expressão do gene *SERK* é observada em células competentes até o estágio globular do embrião somático, entretanto, ele não é detectado em estádios não embriogênicos. A expressão deste gene foi associada a ES em várias espécies, incluindo *Dactylis glomerata* (SOMLEVA et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (HECHT et al., 2001), *Medicago truncatula* (NOLAN et al., 2003), *Helianthus annuus* (THOMAS et al., 2004) e *Theobroma cacao* (SANTOS et al. 2005). A expressão do gene *SERK* foi observada em cenoura (*Daucus carota*) e *Arabidopsis* em meio de cultivo adicionado de auxinas (SCHMIDT et al. 1997; HECHT et al. 2001). Em *Theobroma cacao* e *Medicago truncatula* tal indução e a presença de transcritos de *SERK* foram observadas em meio mediante a combinação de auxinas e citocininas (NOLAN et al. 2003). Segundo Schimdt e colaboradores (1997), o *screening* diferencial entre células embriogênicas e não embriogênicas apontou a expressão do *SERK* somente em células embriogênicas. Diversos trabalhos também já relataram que sua expressão ocorre tanto na embriogênese somática quanto na embriogênese zigótica (SANTOS et al., 2005; STEINER et al., 2011; MATOS, 2013). O fato de ocorrer um aumento na regulação do gene *SERK* nas fases iniciais e o decréscimo no decorrer do desenvolvimento dos embriões somáticos reforça a associação do *SERK* à competência embriogênica das células somáticas. Estes fatos, refletem a multifuncionalidade desse gene em diferentes espécies, estando associado não apenas com a embriogênese somática, mas também em outros eventos do desenvolvimento vegetal (NOLAN et al., 2009).

Interessantemente, em nosso estudo o gene *SERK* apresentou expressão em todos os tempos. Isso indica que este gene tem um papel fundamental na aquisição da competência embriogênica, desde o tecido vegetal até a formação do embrião, sendo assim, um notável marcador deste processo, como já descrito na literatura.

Outro gene avaliado em nosso estudo e relacionado ao processamento de proteínas foi o gene *OASA* (*GO:0006535*) (Tabela 2). Este gene teve sua expressão regulada negativamente

no tempo 0 DAI e em 14 DAI e regulada positivamente em 30, 90 e 150 DAI no genótipo R quando comparado com o genótipo NR. Em 150 DAI Almeida e colaboradores (2017) também obtiveram o mesmo resultado em suas análises proteômicas. Isso indica que os níveis de transcritos parecem ser similares aos níveis de proteínas. Já foi descrito em alguns estudos que em presença de auxina, *OASA* atua também na regulação do estresse oxidativo, podendo estimular a diferenciação celular e promover a formação de embriões somáticos (YOUSSEFIAN et al., 2001; PAN et al., 2010). Assim, isto pode explicar o aumento deste gene no genótipo R em relação ao genótipo NR em 30, 90 e aos 150 DAI, sugerindo que este gene é um potencial marcador da aquisição de competência embriogênica.

Tabela 2. Processos Biológicos nos quais estão inseridos os genes potencialmente envolvidos na aquisição da competência embriogênica em palma de óleo.

Processo biológico	Acesso NCBI	Descrição	Gene	GOs (Blast2GO)
Resposta ao estresse	NM_001319913.1	Catalase isozyme 2	<i>CAT2</i>	GO:0098869 GO:0055114 GO:0042542
	XM_010942780.2	Monodehydroascorbate reductase mitochondrial isoform X1	<i>MDAR5</i>	GO:0055114
	NM_001319906.1	Actin-101-like isoform X1	<i>ACT1</i>	-
	XM_010932368.2	Disulfide-isomerase-like	<i>PDIL1-4</i>	GO:0045454 GO:0034976
	XM_010914921.2	Heat shock protein 81-1	<i>HSP801-1</i>	
	DW248206.1	Desiccation-related At2g46140	<i>LEA</i>	GO:0009269 GO:0009735
Metabolismo energético	XM_010924524.2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	<i>PGM</i>	GO:0006007
	XM_010909626.2	Enolase 2	<i>ENO1</i>	GO:0006096
	XM_010915114.2	Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta	<i>PFP-BETA</i>	GO:0006002 GO:0061615 GO:0015979 GO:0046835
	EY413718.1	Beta-glucosidase 22-like	<i>BGLUC</i>	GO:0005975
	XM_010920378.1	Ru large subunit-binding subunit alpha	<i>RUBA</i>	GO:0042026 GO:0009658
	DW248696.1	Granule-bound starch synthase chloroplastic amyloplastic	<i>GBSS1</i>	GO:0019252
	XM_010941329.2	Annexin D1-like	<i>ANN1</i>	-
Desenvolvimento	JN003517.1	Elongation factor 1-alpha-like	<i>EF1</i>	GO:0006414
	XM_010918641.1	Somatic embryogenesis receptor kinase 2-like	<i>SERK</i>	GO:0007165 GO:0006468
	XM_010919421.2	Cysteine synthase	<i>OASA</i>	GO:0006535
	DW247791.1	Polycomb group FIE2	<i>FIE2</i>	GO:0006349 GO:2000014
	Resposta de defesa	XM_010940037.2	Pathogenesis-related 1-like	<i>PRB1</i>
XM_010943665.2		Pathogenesis-related PRB1-3-like	<i>PRB1-3</i>	GO:0009607 GO:0006952

7. CONCLUSÃO

A análise da expressão gênica constitui uma importante abordagem para compreender os padrões de expressão de genes em processos biológicos. Assim, a avaliação da expressão de genes potencialmente envolvidos na aquisição da ES por meio da técnica de RT-qPCR é de suma importância para o melhor entendimento da ES, não somente para palma de óleo, mas para as palmeiras em geral.

Os genes avaliados neste estudo apresentam importantes papéis relacionados principalmente com resposta ao estresse, resposta de defesa, processamento de proteínas, metabolismo energético e desenvolvimento, participando no controle da oxidação e adaptação dos genótipos à condição *in vitro* impostas durante a indução da ES. Os resultados mostraram que os genes avaliados se apresentaram regulados negativamente em 14 DAI e regulados positivamente em 30 DAI, sendo que a maioria foi regulada positivamente em 150 DAI quando o genótipo R foi comparado com o genótipo NR. Esse perfil foi também observado para a maioria das proteínas codificadas por estes genes nas análises proteômicas realizadas por Almeida et al. (2017), em 14 e 150 DAI, mostrando que há uma tendência similar entre a expressão gênica e abundância de proteínas, indicando que estes genes apresentam grande potencial como marcadores da ES em palma de óleo.

A literatura ainda carece de trabalhos que avaliem a expressão de genes durante a aquisição de competência embriogênica em palma de óleo, principalmente quando genótipos responsivos e não-responsivos são avaliados. Os resultados aqui apresentados sugerem que 30 DAI é o momento chave em que o genótipo R muda o padrão de expressão de genes que levam ao desenvolvimento da embriogênese somática. Além disso, os genes *EF1*, *PRB1-3*, *OASA*, *MDAR5*, *CAT2* e *RUBA* parecem ser cruciais para a aquisição da competência embriogênica e podem ser explorados como potenciais marcadores da ES em palma de óleo.

Os níveis diferenciais de expressão entre os genótipos sugerem também que os genes testados estariam atuando em resposta à aquisição de competência embriogênica. Essas informações são relevantes, uma vez que podem subsidiar o aprimoramento dos protocolos de clonagem por meio da ES, contribuindo para o melhoramento e desenvolvimento de novas cultivares de palma de óleo mais produtivas e tolerantes a doenças.

8. REFERÊNCIAS

- Abdullah, R. (2005). A decade of oil palm gene manipulation: where are we now. In **Presented at the 9th International Conference on Agricultural Biotechnology**.
- Acharya, K., Pal, A. K., Gulati, A., Kumar, S., Singh, A. K., & Ahuja, P. S. (2013). Overexpression of *Camellia sinensis* thaumatin-like protein, CsTLP in potato confers enhanced resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* infection. **Molecular Biotechnology**, 54(2), 609-622.
- Ângelo, P. D. S., Moraes, L. A. C., Sousa, N. R., Lopes, R., & da CUNHA, R. N. V. (2007). Resgate de embriões híbridos de dendezeiro x caiaué. **Embrapa Amazônia Ocidental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**.
- ANUÁRIO, D. (2008). AGRICULTURA BRASILEIRA-AGRIANUAL. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio.
- Apichatmeta, K., Sudsiri, C. J., & Ritchie, R. J. (2017). Photosynthesis of oil palm (*Elaeis guineensis*). **Scientia Horticulturae**, 214, 34-40.
- Araldi, C. G., Coelho, C. M. M., Gaziola, S. A., & Azevedo, R. A. (2016). Storage elicits a fast antioxidant enzyme activity in *Araucaria angustifolia* embryos. **Acta Physiologiae Plantarum**, 38(8), 201.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, 63(10), 3523-3543.
- Baba, A. I., Nogueira, F. C., Pinheiro, C. B., Brasil, J. N., Jereissati, E. S., Juca, T. L., ... & Campos, F. A. (2008). Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Science**, 175(5), 717-723.
- Bakoumé, C., & Louise, C. (2007). Breeding for oil yield and short oil palms in the second cycle of selection at La Dibamba (Cameroon). **Euphytica**, 156(1-2), 195-202.
- Balslev, H., & Henderson, A. (1986). *Elaeis oleifera* (*Palmae*) encontrada en el Ecuador (No. A-0345).
- Balzon, T. A., Luis, Z. G., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2013). New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 49(1), 41-50.
- Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Hernández-Coronado, M., & Pantoja, O. (2009). Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance. **The Plant Cell**, 21(12), 4044-4058.
- Bartos, P. M. C. (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**. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade de Brasília, 151p.
- Bauwe, H., Hagemann, M., Kern, R., & Timm, S. (2012). Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, 15(3), 269-275.
- Benjumea, P., Agudelo, J., & Agudelo, A. (2008). Basic properties of palm oil biodiesel-diesel blends. **Fuel**, 87(10-11), 2069-2075.
- Bell, L. M., Trigiano, R. N., & Conger, B. V. (1993). Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. **Environmental and Experimental Botany**, 33(4), 495-499.
- Blazquez, S., Olmos, E., Hernández, J. A., Fernández-García, N., Fernández, J. A., & Piqueras, A. (2009). Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.).

- Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 97(1), 49-57.
- Braybrook, S. A., Stone, S. L., Park, S., Bui, A. Q., Le, B. H., Fischer, R. L., ... & Harada, J. J. (2006). Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103(9), 3468-3473.
- Chan, P. L., Ma, L. S., Low, E. T. L., Shariff, E. M., Ooi, L. C. L., Cheah, S. C., & Singh, R. (2010). Normalized embryoid cDNA library of oil palm (*Elaeis guineensis*). **Electronic Journal of Biotechnology**, 13(1), 10-11.
- Chan, P. L., Rose, R. J., Murad, A. M. A., Zainal, Z., Low, E. T. L., Ooi, L. C. L., ... & Singh, R. (2014). Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in oil palm elite planting materials propagated by tissue culture. **PLoS One**, 9(6), e99774.
- Che, P., Love, T. M., Frame, B. R., Wang, K., Carriquiry, A. L., & Howell, S. H. (2006). Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. **Plant Molecular Biology**, 62(1-2), 1-14.
- Chen, S., & Harmon, A. C. (2006). Advances in plant proteomics. **Proteomics**, 6(20), 5504-5516.
- Chia, G. S., Lopes, R., da CUNHA, R. N. V., da Rocha, R. N. C., & Lopes, M. T. G. (2009). Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. **Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**.
- Chugh, A., & Khurana, P. (2002). Gene expression during somatic embryogenesis-. **Current Science**, 83(6).
- Conceicao, H. D., & Muller, A. A. (2000). Botânica e morfologia do dendezeiro. **A cultura do dendezeiro na amazônia brasileira, 1**.
- Corley, R. H. V., Barrett, J. N., & Jones, L. H. (1977). Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. **Oil Palm News**, (22), 2-7.
- Cyrne, L., us Martins, L., Fernandes, L., & Marinho, H. S. (2003). Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology and Medicine**, 34(3), 385-393.
- Da Cunha, R. N. V., & Lopes, R. (2010). BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal. **Embrapa Amazônia Ocidental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**.
- Da Silva Angelo, P. C., Lopes, R., Moraes, L. A. C., & da Cunha, R. N. V. (2009). Embryogenic calli induced in interspecific (*Elaeis guineensis* x *E. oleifera*) hybrid zygotic embryos. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 9(3).
- Datta, K., Velazhahan, R., Oliva, N., Ona, I., Mew, T., Khush, G. S., ... & Datta, S. K. (1999). Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. **Theoretical and Applied Genetics**, 98(6-7), 1138-1145.
- de Carvalho Silva, R., Carmo, L. S. T., Luis, Z. G., Silva, L. P., Scherwinski-Pereira, J. E., & Mehta, A. (2014). Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Proteomics**, 104, 112-127.
- De Touchet, B., Duval, Y., & Pannetier, C. (1991). Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Reports**, 10(10), 529-532.

- Denyer, K., Waite, D., Motawia, S., Møller, B. L., & Smith, A. M. (1999). Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. **Biochemical Journal**, 340(Pt 1), 183.
- Dewitte, W., & Murray, J. A. (2003). The plant cell cycle. **Annual Review of Plant Biology**, 54(1), 235-264.
- Díaz-Vivancos, P., Majourhat, K., Fernández, J. A., Hernández, J. A., & Piqueras, A. (2011). Study of the antioxidant enzymatic system during shoot development from cultured intercalary meristems of saffron. **Plant Growth Regulation**, 65(1), 119-126.
- Dong, J. Z., & Dunstan, D. I. (2000). Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In **Molecular Biology of Woody Plants** (pp. 51-87). Springer, Dordrecht.
- Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L., & Bakó, L. (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. **In Vitro Embryogenesis in Plants** (pp. 267-308). Springer, Dordrecht.
- Dumas, E., & Monteuis, O. (1995). In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 40(3), 231-235.
- Dussert, S., Guerin, C., Andersson, M., Joët, T., Tranbarger, T. J., Pizot, M., ... & Morcillo, F. (2013). Comparative transcriptome analysis of three oil palm fruit and seed tissues that differ in oil content and fatty acid composition. **Plant Physiology**, 162(3), 1337-1358.
- Escobar, R. (1982). Preliminary results of the collection and evaluation of the American oil palm *Elaeis oleifera* (HBK,[Humboldt Bonpland, Kunth] Cortes) in Costa Rica [Panama and Colombia]. In **International Conference on Oil Palm in Agriculture in the Eighties. Session-Breeding, genetics and selection II, Kuala Lumpur (Malaysia), 17-20 Jun 1981**. PPP (ISP).
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A., & Pérez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, 8(1), 131.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, 1849(4), 385-402.
- Feher, A., Pasternak, T. P., & Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 74(3), 201-228.
- Floh, E. I. S., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2007). Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, 13, 1992-2001.
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, 43(1), 27-47.
- Ganesan, M., & Jayabalan, N. (2004). Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Reports**, 23(4), 181-187.
- Giorgetti, L., & Castiglione, M. R. (2016). Oil palm in vitro regeneration: microdensitometric analysis during reproduction and development. **Caryologia**, 69(1), 5-11.
- Godoy, J. A., Lunar, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R. M., & Pintor-Toro, J. A. (1994). Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. **Plant Molecular Biology**, 26(6), 1921-1934.
- Gomes, H. T., Bartos, P. M. C., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2015). Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 51(1), 111-117.

- Gomes, H. T., Bartos, P. M. C., & Scherwinski-Pereira, J. E. (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 and Organ Culture (PCTOC)**, 131(2), 269-282.
- Gomes, H. T., Bartos, P. M. C., Silva, C. O., do Amaral, L. I. V., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2014). Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, 74(2), 199-208.
- Gourlay, C. W., & Ayscough, K. R. (2005). The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing?. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 6(7), 583.
- Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., & Gutierrez, L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**, 60(2), 487-493.
- Guerra, M. P., Torres, A. C., Teixeira, J. B., Torres, A., Caldas, L., & Buso, J. (1999). Embriogênese somática e sementes sintéticas. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**.
- Hartley, C.W.S. (1988). The oil palm (*Elaeis guineensis*). **London: Longman**, 806p.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U., & de Vries, S. C. (2001). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, 127(3), 803-816.
- Henry, Y., Vain, P., & De Buyser, J. (1994). Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica**, 79(1-2), 45-58.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, 11(9), 1026.
- Kairong, C., Gengsheng, X., Xinmin, L., Gengmei, X., & Yafu, W. (1999). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science**, 146(1), 9-16.
- Kairong, C., Gengsheng, X., Xinmin, L., Gengmei, X., & Yafu, W. (1999). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science**, 146(1), 9-16.
- Kanchanapoom, K., & Domyoas, P. (1999). The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) embryo culture. **Sci Asia**, 25, 195-202.
- Kawahara, R., & Komamine, A. (1995). Molecular basis of somatic embryogenesis. In **Somatic embryogenesis and synthetic seed I** (pp. 30-40). **Springer**, Berlin, Heidelberg.
- Kiselev, K. V., Turlenko, A. V., & Zhuravlev, Y. N. (2009). CDPK gene expression in somatic embryos of *Panax ginseng* expressing rolC. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 99(2), 141-149.
- Klimaszewska, K., Overton, C., Stewart, D., & Rutledge, R. G. (2011). Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. **Planta**, 233(3), 635-647.
- Konan, K. E., Durand-Gasselin, T., Kouadio, Y. J., Flori, A., Rival, A., Duval, Y., & Pannetier, C. (2010). In vitro conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, 29(1), 1.

- Konieczny, R., Libik, M., Tuleja, M., Niewiadomska, E., & Miszalski, Z. (2008). Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. **Acta Physiologiae Plantarum**, 30(1), 71-79.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, 27(2-3), 95-125.
- Laohavisit A, Davies J (2011) Annexins. **New Phytol** 189:40–53.
- Leitman, P., Henderson, A., Noblick, L., Martins, R. C., & SOARES, K. (2014). ARECACEAE in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Available in: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15662>>. Access at, 5.
- Lenis-Manzano, S. J., de Araujo, A. C. G., do Valle, C. B., de Fátima Santana, E., & de Campos Carneiro, V. T. (2011). Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha apomítica*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45(5), 435-441.
- Libik, M., Konieczny, R., Pater, B., Ślesak, I., & Miszalski, Z. (2005). Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant Cell Reports**, 23(12), 834-841.
- Lippert, D., Zhuang, J., Ralph, S., Ellis, D. E., Gilbert, M., Olafson, R., ... & Bohlmann, J. (2005). Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Proteomics**, 5(2), 461-473.
- Liu, Y., Chaturvedi, P., Fu, J., Cai, Q., Weckwerth, W., & Yang, P. (2016). Induction and quantitative proteomic analysis of cell dedifferentiation during callus formation of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. spp. *baijiantian*). **Journal of Proteomics**, 131, 61-70.
- Lorenzi, H. J. (2010). Flora brasileira: 'Arecaceae' (palmeiras). **Instituto Plantarum**.
- Lorenzi, H. Souza HM de, Medeiros Costa JT de, Cerqueira LSC de, Behr N von. 1996 Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa, Brazil: Editora Plantarum Ltda** 320p.-col. illus.. Por Icones. Geog, 4.
- Low, E. T. L., Alias, H., Boon, S. H., Shariff, E. M., Tan, C. Y. A., Ooi, L. C., ... & Singh, R. (2008). Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology**, 8(1), 62.
- Martine, B. M., Laurent, K. K., Pierre, B. J., kouakou Eugegrave, K., Hilaire, K. T., & Justin, K. Y. (2009). Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, 4(10), 931-937.
- Meinke, D. W. (1995). Molecular genetics of plant embryogenesis. **Annual Review of Plant Biology**, 46(1), 369-394.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, 61(15), 4197-4220.
- Miyazawa, Y., Sakai, A., Miyagishima, S. Y., Takano, H., Kawano, S., & Kuroiwa, T. (1999). Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. **Plant Physiology**, 121(2), 461-470.
- Morcillo, F., Gallard, A., Pillot, M., Jouannic, S., Aberlenc-Bertossi, F., Collin, M., ... & Tregear, J. W. (2007). EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. **Planta**, 226(6), 1353-1362.

- Morel, A., Teyssier, C., Trontin, J. F., Eliášová, K., Pešek, B., Beaufour, M., ... & Reymond, I. (2014). Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. **Physiologia Plantarum**, 152(1), 184-201.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3), 473-497.
- Ngalle, H. B., Bell, J. M., Ngando-Ebongue, G. F., Eman-Evina, H., Ntsomboh, G. N., & Nsimi-Mva, A. (2014). Morphogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fruit in seed development. **J. Life Sci**, 8, 946-954.
- Noah, A. M., Niemenak, N., Sunderhaus, S., Haase, C., Omokolo, D. N., Winkelmann, T., & Braun, H. P. (2013). Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of Proteomics**, 78, 123-133.
- Nolan, K. E., Irwanto, R. R., & Rose, R. J. (2003). Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, 133(1), 218-230.
- Ooi, S. E., Choo, C. N., Ishak, Z., & Ong-Abdullah, M. (2012). A candidate auxin-responsive expression marker gene, EgIAA9, for somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 110(2), 201-212.
- Or, K. H., Putra, A., & Selamat, M. Z. (2017). Oil palm empty fruit bunch fibres as sustainable acoustic absorber. **Applied Acoustics**, 119, 9-16.
- Osorio, M., Gámez, E., Molina, S., & Infante, D. (2012). Evaluation of cassava plants generated by somatic embryogenesis at different stages of development using molecular markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, 15(4), 3-3.
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., ... & Sailor, C. A. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Research**, 36(suppl_2), W163-W169.
- Owen, H. R., Wengerd, D., & Miller, A. R. (1991). Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. **Plant Cell Reports**, 10(11), 583-586.
- Pan, M. J., & Van Staden, J. (1998). The use of charcoal in in vitro culture—A review. **Plant Growth Regulation**, 26(3), 155-163.
- 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 and Organ Culture (PCTOC)**, 103(2), 145-153.
- Pannetier, C., Arthuis, P., & Lievoux, D. (1981). Néoformation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. **Oléagineux**, 36(3), 119-122.
- Paranjothy, K., Othman, R., Tan, C. C., Wong, G., & Soh, A. H. (1995). **Incidence of Abnormalities in Relation to in Vitro Protocols**. PORIM.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 30(9), e36-e36.
- Rabehault, H., Ahée, J., & Guenin, G. (1970). Colonies cellulaires et formes embryoides obtenues in vitro a partir de cultures d'embryons de Palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). **Acad Sci Compt Rend Ser D**.
- Rajanaidu, N. (1986). *Elaeis oleifera* collection in Central and South America. **International Workshop on Oil Palm Germplasm and Utilisation, Bangi, Selangor (Malaysia), 26-27 Mar 1985**. IPMKSM.

- Rajesh, M. K., Radha, E., Karun, A., & Parthasarathy, V. A. (2003). Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm—the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75(1), 41-47.
- Ree, J. F., & Guerra, M. P. (2015). Palm (*Arecaceae*) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 51(6), 589-602.
- Rival, A., Aberlenc, F., Morcillo, F., Tregear, J., Verdeil, J. L., & Duval, Y. (1997). Scaling-up# in vitro# clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of oil palm (# *Elaeis guineensis*# Jacq.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 3(2), 74-82.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell**, 14(suppl 1), S185-S205.
- Roowi, S. H., Ho, C. L., Alwee, S. S. R. S., Abdullah, M. O., & Napis, S. (2010). Isolation and characterization of differentially expressed transcripts from the suspension cells of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxins. **Molecular Biotechnology**, 46(1), 1-19.
- Ruttajorn, K., Nakkaew, A., Panrat, T., Vanichanon, A., & Phongdara, A. (2016). Isolation, expression analysis and characterization of EgNDL, a NDR-like protein in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, 38(3).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). **Cold Spring Harbor Laboratory Press**.
- Sané, D., ABERLENC-BERTOSSI, F., Gassama-Dia, Y. K., Sagna, M., Trouslot, M. F., Duval, Y., & Borgel, A. (2006). Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, 98(2), 301-308.
- Sanputawong, S., & Te-Chato, S. (2011). Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of in vitro oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Agricultural Technology**, 7(2), 531-545.
- Santa-Catarina, C., de Oliveira, R. R., Cutri, L., Floh, E. I., & Dornelas, M. C. (2012). WUSCHEL-related genes are expressed during somatic embryogenesis of the basal angiosperm *Ocotea catharinensis* Mez.(Lauraceae). **Trees**, 26(2), 493-501.
- Santos, M. O., & Aragão, F. J. (2009). Role of SERK genes in plant environmental response. **Plant Signaling & Behavior**, 4(12), 1111-1113.
- Sarpan, N., Ky, H., Ooi, S. E., Napis, S., Ho, C. L., Ong-Abdullah, M., ... & Namasivayam, P. (2011). A novel transcript of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), Eg707, is specifically upregulated in tissues related to totipotency. **Molecular Biotechnology**, 48(2), 156-164.
- Scherwinski-Pereira, J. E., da Guedes, R. S., Fermino, P. C. P., Silva, T. L., & Costa, F. H. S. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 46(4), 378-385.
- Schmidt, E. D., Guzzo, F., Toonen, M. A., & De Vries, S. C. (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, 124(10), 2049-2062.
- Sghaier-Hammami, B., Drira, N., & Jorrín-Novo, J. V. (2009). Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. **Journal of Proteomics**, 73(1), 161-177.
- Shao, J. D., Wang, T., & Yan, X. F. (2007). Proteomics of pollen development and germination. **Journal of Proteome Research**, 6(12), 4556-4563.
- Sharifi, G., Ebrahimzadeh, H., Ghareyazie, B., Gharechahi, J., & Vatankhah, E. (2012). Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). **Proteome Science**, 10(1), 3.

- Simms, D., Cizdziel, P. E., & Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. **Focus**, 15(4), 532-535.
- Singh, R., Ong-Abdullah, M., Low, E. T. L., Manaf, M. A. A., Rosli, R., Nookiah, R., ... & Azizi, N. (2013). Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. **Nature**, 500(7462), 335.
- Smertenko, A., & Franklin-Tong, V. E. (2011). Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**, 18(8), 1263.
- Somleva, M. M., Kapchina, V., Alexieva, V., & Golovinsky, E. (1995). Anticytokinin effects on in vitro response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylis glomerata* L. **Plant Growth Regulation**, 16(2), 109-112.
- Somleva, M. N., Schmidt, E. D. L., & De Vries, S. C. (2000). Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L.(Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. **Plant Cell Reports**, 19(7), 718-726.
- Sousa, A. S., Santos, M. G., Pelacani, C. R., & Santos, F. D. A. R. (2016). Testing culture media for pollen germination of *Elaeis guineensis* Jacq.(oil palm, Arecaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 182(2), 536-542.
- Staritsky, G. (1970). Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. **Euphytica**, 19(3), 288-292.
- Steinmacher, D. A., Krohn, N. G., Dantas, A. C. M., Stefenon, V. M., Clement, C. R., & Guerra, M. P. (2007). Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, 100(4), 699-709.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, 705-708.
- Sumathi, S., Chai, S. P., & Mohamed, A. R. (2008). Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 12(9), 2404-2421.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2009). Fisiologia vegetal. Porto Alegre, Artmed. 719p. Tillmann MAA, Piana Z, Cavariani C & Minami K (1994) Efeito da profundidade de semeadura na emergência de plântulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Scientia Agricola**, 51, 260-263.
- Tan, H. S., Liddell, S., Abdullah, M. O., Wong, W. C., & Chin, C. F. (2016). Differential proteomic analysis of embryogenic lines in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). **Journal of Proteomics**, 143, 334-345.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, 50(4), S1-S5.
- Teixeira, J. B., Söndahl, M. R., & Kirby, E. G. (1994). Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, 13(5), 247-250.
- 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 Physiology and Biochemistry**, 42(1), 35-42.
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, 26(6), 618-631.
- Tonietto, Â., Sato, J. H., Teixeira, J. B., de Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Franco, O. L., & Mehta, A. (2012). Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. **Plant Molecular Biology Reporter**, 30(6), 1393-1399.

- Torres, G. A., Sarria, G. A., Varon, F., Coffey, M. D., Elliott, M. L., & Martinez, G. (2010). First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on African oil palm in Colombia. **Plant Disease**, 94(9), 1163-1163.
- Torres, G. A., Sarria, G. A., Martinez, G., Varon, F., Drenth, A., & Guest, D. I. (2016). Bud rot caused by *Phytophthora palmivora*: a destructive emerging disease of oil palm. *Phytopathology*, 106(4), 320-329.
- Tranbarger, T. J., Dussert, S., Joët, T., Argout, X., Summo, M., Champion, A., ... & Morcillo, F. (2011). Regulatory mechanisms underlying oil palm fruit mesocarp maturation, ripening, and functional specialization in lipid and carotenoid metabolism. **Plant Physiology**, 156(2), 564-584.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, 40(15), e115-e115.
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, 29(3), 151-159.
- van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Deoxynucleotide triphosphates and buffer components. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**, 91-101.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3(7), research0034-1.
- Venturieri, A., Fernandes, W. R., BOARI, A. D. J., & Vasconcelos, M. A. (2009, April). Relação entre ocorrência do amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* jacq.) e variáveis ambientais no estado do Pará. In **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 14., 2009, Natal. Anais... São José dos Campos: INPE, 2009.
- Viñas, M., & Jiménez, V. M. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (*Arecaceae*). **Revista Colombiana de Biotecnología**, 13(2), 229.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69(3), 233-249.
- Wilde, H. D., Seffens, W. S., & Thomas, T. L. (1995). Gene expression in somatic embryos. In **Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I** (pp. 41-52). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Williams, E. G., & Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, 57(4), 443-462.
- Xia, W., Mason, A. S., Xiao, Y., Liu, Z., Yang, Y., Lei, X., ... & Peng, M. (2014). Analysis of multiple transcriptomes of the African oil palm (*vElaeis guineensis*) to identify reference genes for RT-qPCR. **Journal of Biotechnology**, 184, 63-73.
- Youssefian, S., Nakamura, M., Orudjev, E., & Kondo, N. (2001). Increased cysteine biosynthesis capacity of transgenic tobacco overexpressing an O-acetylserine (thiol) lyase modifies plant responses to oxidative stress. **Plant Physiology**, 126(3), 1001-1011.
- Zeng, F., Zhang, X., Cheng, L., Hu, L., Zhu, L., Cao, J., & Guo, X. (2007). A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. **Genomics**, 90(5), 620-628.

- Zhang, S. G., Han, S. Y., Yang, W. H., Wei, H. L., Zhang, M., & Qi, L. W. (2010). Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 100(1), 21.
- Zhao, P. M., Wang, L. L., Han, L. B., Wang, J., Yao, Y., Wang, H. Y., ... & Xia, G. X. (2009). Proteomic identification of differentially expressed proteins in the Ligon lintless mutant of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Proteome Research**, 9(2), 1076-1087.
- Zhao, S., & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, 12(8), 1047-1064.
- Zheng, Y., Li, Y., Zhang, Y., Ruan, X., & Zhang, R. (2017). Purification, characterization, synthesis, in vitro ACE inhibition and in vivo antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, 28, 48-58.
- Zhou, T., Yang, X., Guo, K., Deng, J., Xu, J., Gao, W., & Zhang, X. (2016). ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. **Molecular & Cellular Proteomics**, 15(6), 2108-2124.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, 5(10), 1411.

APÊNDICE A. Análise da expressão relativa Genótipo R x Genótipo NR.

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
<i>PGM 0</i> R/NR	TRG	0,84	0,566	0,236 - 1,206	0,215 - 1,631	0,036	DOWN
<i>PGM 14</i> R/NR	TRG	0,84	0,198	0,128 - 0,345	0,105 - 0,470	0,000	DOWN
<i>PGM 30</i> R/NR	TRG	0,84	2,696	1,234 - 5,896	0,679 - 7,467	0,004	UP
<i>PGM 90</i> R/NR	TRG	0,84	1,261	0,815 - 1,948	0,504 - 2,216	0,109	
<i>PGM 150</i> R/NR	TRG	0,84	1,834	1,294 - 2,799	0,881 - 3,776	0,000	UP
<i>ACT2 0</i> R/NR	REF	0,81	0,444				
<i>ACT2 14</i> R/NR	REF	0,81	0,272				
<i>ACT2 30</i> R/NR	REF	0,81	2,482				
<i>ACT2 90</i> R/NR	REF	0,81	1,338				
<i>ACT2 150</i> R/NR	REF	0,81	5,811				
<i>ACT1 0</i> R/NR	TRG	0,84	0,618	0,183 - 1,502	0,123 - 2,466	0,142	
<i>ACT1 14</i> R/NR	TRG	0,84	0,249	0,111 - 0,736	0,083 - 0,858	0,000	DOWN
<i>ACT1 30</i> R/NR	TRG	0,84	4,351	1,676 - 11,254	1,220 - 15,092	0,000	UP
<i>ACT1 90</i> R/NR	TRG	0,84	2,257	1,082 - 3,833	0,885 - 5,922	0,002	UP
<i>ACT1 150</i> R/NR	TRG	0,84	3,631	2,193 - 6,595	1,747 - 9,234	0,000	UP
<i>ANN1 0</i> R/NR	TRG	0,82	0,352	0,209 - 0,615	0,150 - 0,993	0,000	DOWN
<i>ANN1 14</i> R/NR	TRG	0,82	0,092	0,043 - 0,254	0,020 - 0,349	0,000	DOWN
<i>ANN1 30</i> R/NR	TRG	0,82	1,144	0,382 - 2,454	0,312 - 3,275	0,651	
<i>ANN 90</i> R/NR	TRG	0,82	1,362	1,104 - 1,671	0,790 - 1,819	0,001	UP
<i>ANN1 150</i> R/NR	TRG	0,82	1,244	0,844 - 1,823	0,773 - 2,298	0,084	
<i>BGLUC 0</i> R/NR	TRG	0,87	0,185	0,052 - 0,603	0,036 - 0,809	0,000	DOWN
<i>BGLUC 14</i> R/NR	TRG	0,87	0,098	0,046 - 0,225	0,026 - 0,370	0,000	DOWN
<i>BGLUC 30</i> R/NR	TRG	0,87	1,254	0,456 - 5,940	0,101 - 7,039	0,606	
<i>BGLUC 90</i> R/NR	TRG	0,87	1,319	1,004 - 1,712	0,893 - 2,139	0,009	UP
<i>BGLUC 150</i> R/NR	TRG	0,87	5,140	2,381 - 15,805	1,906 - 25,018	0,000	UP
<i>CAT2 0</i> R/NR	TRG	0,85	0,578	0,325 - 1,295	0,251 - 1,635	0,023	DOWN
<i>CAT2 14</i> R/NR	TRG	0,85	0,216	0,088 - 0,675	0,046 - 1,003	0,001	DOWN
<i>CAT2 30</i> R/NR	TRG	0,85	2,455	0,861 - 7,215	0,334 - 9,711	0,021	UP
<i>CAT2</i> R/NR	TRG	0,85	1,556	0,897 - 2,831	0,521 - 3,505	0,034	UP

CAT2 150 R/NR	TRG	0,85	2,581	1,361 - 4,872	1,144 - 8,348	0,000	UP
OASA 0 R/NR	TRG	0,84	0,503	0,203 - 0,909	0,155 - 1,373	0,004	DOWN
OASA 14 R/NR	TRG	0,84	0,206	0,127 - 0,362	0,107 - 0,511	0,000	DOWN
OASA 30 R/NR	TRG	0,84	2,288	0,604 - 6,821	0,309 - 9,165	0,043	UP
OASA 90 R/NR	TRG	0,84	2,633	1,814 - 3,906	1,519 - 4,880	0,000	UP
OASA 150 R/NR	TRG	0,84	2,934	1,964 - 4,621	1,520 - 6,354	0,000	UP
EFI 0 R/NR	TRG	0,85	1,207	0,533 - 3,958	0,335 - 5,727	0,550	
EFI 14 R/NR	TRG	0,85	0,099	0,039 - 0,278	0,024 - 0,580	0,000	DOWN
EFI 0 R/NR	TRG	0,85	3,309	1,398 - 5,995	1,029 - 7,819	0,000	UP
EFI 90 R/NR	TRG	0,85	1,559	0,896 - 2,553	0,580 - 2,926	0,023	UP
EFI 150 R/NR	TRG	0,85	5,357	2,897 - 9,662	2,280 - 16,373	0,000	UP
ENO1 0 R/NR	TRG	0,85	1,041	0,319 - 2,398	0,232 - 3,816	0,899	
ENO1 14 R/NR	TRG	0,85	0,279	0,119 - 0,664	0,070 - 1,375	0,001	DOWN
ENO1 30 R/NR	TRG	0,85	2,512	0,925 - 8,116	0,301 - 10,962	0,034	UP
ENO1 90 R/NR	TRG	0,85	1,247	0,679 - 1,818	0,529 - 2,279	0,175	
ENO1150 R/NR	TRG	0,85	17,427	3,623 - 126,038	2,650 - 423,169	0,000	UP
PD00380 0 R/NR	REF	0,82	0,320				
PD00380 14 R/NR	REF	0,82	0,198				
PD00380 30 R/NR	REF	0,82	2,062				
PD00380 90 R/NR	REF	0,82	1,110				
PD00380 150 R/NR	REF	0,82	2,953				
FIE2 0 R/NR	TRG	0,86	0,731	0,230 - 1,679	0,136 - 2,752	0,321	
FIE2 14 R/NR	TRG	0,86	0,299	0,118 - 0,616	0,083 - 0,921	0,000	DOWN
FIE2 30 R/NR	TRG	0,86	2,813	1,208 - 9,303	0,408 - 12,011	0,012	UP
FIE2 90 R/NR	TRG	0,86	1,409	0,933 - 2,227	0,783 - 3,213	0,026	UP
FIE2 150 R/NR	TRG	0,86	1,913	1,069 - 3,585	0,854 - 4,609	0,003	UP
LEA 0 R/NR	TRG	0,89	0,645	0,172 - 1,815	0,093 - 4,352	0,273	
LEA 14 R/NR	TRG	0,89	0,121	0,071 - 0,249	0,052 - 0,323	0,000	DOWN
LEA 30 R/NR	TRG	0,89	4,144	1,780 - 15,100	0,374 - 22,575	0,008	UP
LEA 90 R/NR	TRG	0,89	1,621	1,052 - 2,304	0,843 - 3,476	0,000	UP
LEA 150 R/NR	TRG	0,89	5,754	3,814 - 8,951	3,075 - 12,663	0,000	UP
MDAR5 0 R/NR	TRG	0,84	0,682	0,288 - 1,245	0,216 - 1,696	0,110	
MDAR5 14 R/NR	TRG	0,84	0,199	0,095 - 0,554	0,069 - 0,769	0,000	DOWN

<i>MDAR5</i> 30 R/NR	TRG	0,84	6,661	2,434 - 28,669	0,611 - 37,936	0,001	UP
<i>MDAR5</i> 90 R/NR	TRG	0,84	1,617	1,100 - 2,548	0,800 - 3,237	0,003	UP
<i>MDAR5</i> 150 R/NR	TRG	0,84	2,919	1,399 - 5,159	1,110 - 8,706	0,000	UP
<i>PDILI-4</i> 0 R/NR	TRG	0,85	0,427	0,168 - 0,854	0,144 - 1,065	0,001	DOWN
<i>PDILI-4</i> 14 R/NR	TRG	0,85	0,150	0,061 - 0,443	0,044 - 0,646	0,000	DOWN
<i>PDILI-4</i> 30 R/NR	TRG	0,85	2,822	0,878 - 10,425	0,338 - 13,600	0,016	UP
<i>PDILI-4</i> 90 R/NR	TRG	0,85	1,037	0,837 - 1,321	0,587 - 1,476	0,673	
<i>PDILI-4</i> 150 R/NR	TRG	0,85	3,954	2,035 - 8,353	1,382 - 12,123	0,000	UP
<i>PFP-BETA</i> 0 R/NR	TRG	0,86	0,882	0,315 - 1,633	0,260 - 1,904	0,668	
<i>PFP-BETA</i> 14 R/NR	TRG	0,86	0,158	0,089 - 0,285	0,076 - 0,432	0,000	DOWN
<i>PFP-BETA</i> 30 R/NR	TRG	0,86	4,131	2,090 - 9,221	1,041 - 12,856	0,000	UP
<i>PFP-BETA</i> 90 R/NR	TRG	0,86	1,922	1,059 - 3,416	0,843 - 6,299	0,002	UP
<i>PFP-BETA</i> 150 R/NR	TRG	0,86	4,907	3,179 - 7,114	2,583 - 11,003	0,000	UP
<i>PRBI</i> 0 R/NR	TRG	0,87	0,272	0,128 - 0,538	0,065 - 0,605	0,000	DOWN
<i>PRBI</i> 14 R/NR	TRG	0,87	0,161	0,055 - 0,382	0,030 - 0,733	0,000	DOWN
<i>PRBI</i> 30 R/NR	TRG	0,87	1,109	0,622 - 2,493	0,377 - 3,317	0,647	
<i>PRBI</i> 90 R/NR	TRG	0,87	1,934	1,100 - 2,923	0,840 - 3,797	0,000	UP
<i>PRBI</i> 150 R/NR	TRG	0,87	1,263	0,675 - 2,562	0,306 - 3,301	0,316	
<i>PRBI-3</i> 0 R/NR	TRG	0,85	0,522	0,165 - 2,918	0,026 - 4,604	0,211	
<i>PRBI-3</i> 14 R/NR	TRG	0,85	0,096	0,041 - 0,285	0,012 - 0,419	0,000	DOWN
<i>PRBI-3</i> 30 R/NR	TRG	0,85	0,287	0,028 - 1,623	0,022 - 7,665	0,064	
<i>PRBI-3</i> 90 R/NR	TRG	0,85	0,321	0,138 - 0,611	0,108 - 1,699	0,001	DOWN
<i>PRBI-3</i> 150 R/NR	TRG	0,85	0,143	0,029 - 0,477	0,017 - 2,007	0,000	DOWN
<i>RUBA</i> 0 R/NR	TRG	0,84	1,735	0,684 - 3,927	0,413 - 8,388	0,070	
<i>RUBA</i> 14 R/NR	TRG	0,84	0,164	0,055 - 0,735	0,035 - 1,160	0,000	DOWN
<i>RUBA</i> 30 R/NR	TRG	0,84	17,218	2,661 - 278,953	0,580 - 632,607	0,001	UP
<i>RUBA</i> 90 R/NR	TRG	0,84	0,827	0,421 - 2,568	0,190 - 3,011	0,507	
<i>RUBA</i> 150 R/NR	TRG	0,84	4,195	1,643 - 13,739	1,259 - 20,376	0,000	UP
<i>HSP81-1</i> 0 R/NR	TRG	0,87	0,226	0,124 - 0,359	0,102 - 0,619	0,000	DOWN
<i>HSP81-1</i> 14 R/NR	TRG	0,87	0,093	0,031 - 0,192	0,026 - 0,330	0,000	DOWN
<i>HSP81-1</i> 30 R/NR	TRG	0,87	5,146	1,391 - 18,749	0,711 - 40,021	0,002	UP
<i>HSP81-1</i> 90 R/NR	TRG	0,87	1,935	1,018 - 3,532	0,598 - 4,067	0,008	UP
<i>HSP81-1</i> 150 R/NR	TRG	0,87	7,838	3,542 - 12,998	2,392 - 28,066	0,000	UP

<i>SERK</i> 0 N/NR	TRG	0,87	0,421	0,109 - 2,470	0,022 - 6,003	0,142	
<i>SERK</i> 14 N/NR	TRG	0,87	0,058	0,012 - 0,217	0,006 - 0,288	0,000	DOWN
<i>SERK</i> 30 N/NR	TRG	0,87	6,538	1,663 - 30,274	0,678 - 115,293	0,001	UP
<i>SERK</i> 90 N/NR	TRG	0,87	2,176	1,379 - 3,480	0,796 - 4,155	0,001	UP
<i>SERK</i> 150 N/NR	TRG	0,87	4,334	2,708 - 7,275	1,688 - 10,612	0,000	UP
<i>GBSSI</i> 0 R/NR	TRG	0,88	0,774	0,169 - 3,717	0,040 - 6,611	0,655	
<i>GBSSI</i> 14 R/NR	TRG	0,88	0,099	0,028 - 0,366	0,010 - 0,507	0,000	DOWN
<i>GBSSI</i> 30 R/NR	TRG	0,88	4,968	1,750 - 13,140	0,800 - 32,982	0,001	UP
<i>GBSSI</i> 90 R/NR	TRG	0,88	1,875	1,003 - 3,760	0,712 - 5,700	0,007	UP
<i>GBSSI</i> 150 R/NR	TRG	0,88	5,720	2,920 - 11,474	1,539 - 17,550	0,000	UP

REF- Gene de referência

TRG- Gene alvo

APÊNDICE B. Análise da expressão relativa Genótipo R utilizando o tempo 0 (antes da indução) como controle.

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
<i>PGM</i> 0/14 R	TRG	0,84	0,564	0,367 - 0,967	0,340 - 1,250	0,005	DOWN
<i>PGM</i> 0/30 R	TRG	0,84	0,748	0,295 - 1,439	0,277 - 1,729	0,218	
<i>PGM</i> 0/90 R	TRG	0,84	0,937	0,662 - 1,232	0,630 - 1,392	0,479	
<i>PGM</i> 0/150 R	TRG	0,84	0,931	0,673 - 1,226	0,583 - 1,421	0,469	
<i>ACT2</i> 0/14 R	REF	0,81	0,737				
<i>ACT2</i> 0/30 R	REF	0,81	0,868				
<i>ACT2</i> 0/90 R	REF	0,81	0,731				
<i>ACT2</i> 0/150 R	REF	0,81	1,161				
<i>ACT1</i> 0/14 R	TRG	0,84	0,474	0,217 - 1,262	0,163 - 1,890	0,016	DOWN
<i>ACT1</i> 0/30 R	TRG	0,84	1,121	0,572 - 2,182	0,342 - 2,680	0,599	
<i>ACT1</i> 0/90 R	TRG	0,84	0,709	0,389 - 1,345	0,234 - 1,759	0,117	
<i>ACT1</i> 0/150 R	TRG	0,84	0,436	0,228 - 0,828	0,182 - 1,237	0,002	DOWN
<i>ANN1</i> 0/14 R	TRG	0,82	0,219	0,099 - 0,598	0,048 - 0,851	0,000	DOWN
<i>ANN1</i> 0/30 R	TRG	0,82	0,386	0,148 - 0,937	0,076 - 1,309	0,003	DOWN
<i>ANN1</i> 0/90 R	TRG	0,82	0,316	0,196 - 0,491	0,136 - 0,555	0,000	DOWN
<i>ANN1</i> 0/150 R	TRG	0,82	0,279	0,176 - 0,462	0,112 - 0,611	0,000	DOWN

<i>BGLUC</i> 0/14 R	TRG	0,87	1,204	0,552 - 3,214	0,278 - 4,713	0,497	
<i>BGLUC</i> 0/30 R	TRG	0,87	1,921	0,734 - 5,357	0,262 - 6,774	0,075	
<i>BGLUC</i> 0/90 R	TRG	0,87	2,453	1,089 - 4,274	0,949 - 6,003	0,002	UP
<i>BGLUC</i> 0/150 R	TRG	0,87	4,796	2,233 - 8,283	1,698 - 11,543	0,000	UP
<i>CAT2</i> 0/14 R	TRG	0,85	0,988	0,454 - 2,670	0,345 - 3,397	0,968	
<i>CAT2</i> 0/30 R	TRG	0,85	0,893	0,305 - 1,886	0,215 - 2,358	0,714	
<i>CAT2</i> 0/90 R	TRG	0,85	1,233	0,693 - 1,894	0,505 - 2,318	0,209	
<i>CAT2</i> 0/150 R	TRG	0,85	1,234	0,896 - 1,802	0,700 - 2,323	0,091	
<i>OASA</i> 0/14 R	TRG	0,84	0,766	0,501 - 1,462	0,398 - 1,790	0,133	
<i>OASA</i> 0/30 R	TRG	0,84	0,736	0,206 - 1,661	0,159 - 1,955	0,316	
<i>OASA</i> 0/90 R	TRG	0,84	1,565	1,091 - 2,404	0,853 - 3,002	0,004	UP
<i>OASA</i> 0/150 R	TRG	0,84	0,934	0,631 - 1,508	0,470 - 1,918	0,622	
<i>EF1</i> 0/14 R	TRG	0,85	0,458	0,202 - 1,159	0,158 - 2,035	0,019	DOWN
<i>EF1</i> 0/30 R	TRG	0,85	1,580	0,616 - 3,032	0,478 - 4,233	0,074	
<i>EF1</i> 0/90 R	TRG	0,85	0,994	0,658 - 1,559	0,538 - 1,991	0,957	
<i>EF1</i> 0/150 R	TRG	0,85	0,969	0,515 - 1,664	0,422 - 2,807	0,878	
<i>ENO1</i> 0/14 R	TRG	0,85	0,136	0,071 - 0,293	0,050 - 0,420	0,000	DOWN
<i>ENO1</i> 0/30 R	TRG	0,85	0,202	0,056 - 0,482	0,041 - 0,645	0,000	DOWN
<i>ENO1</i> 0/90 R	TRG	0,85	0,395	0,232 - 0,619	0,154 - 0,807	0,000	DOWN
<i>ENO1</i> 0/150 R	TRG	0,85	0,362	0,203 - 0,704	0,162 - 0,971	0,000	DOWN
<i>FIE2</i> 0/14 R	TRG	0,86	0,411	0,162 - 0,864	0,107 - 1,269	0,003	DOWN
<i>FIE2</i> 0/30 R	TRG	0,86	1,024	0,418 - 1,956	0,237 - 2,697	0,922	
<i>FIE2</i> 0/90 R	TRG	0,86	0,950	0,607 - 1,554	0,477 - 2,266	0,738	
<i>FIE2</i> 0/150 R	TRG	0,86	0,923	0,675 - 1,332	0,531 - 1,525	0,477	
<i>LEA</i> 0/14 R	TRG	0,89	0,115	0,048 - 0,248	0,032 - 0,452	0,000	DOWN
<i>LEA</i> 0/30 R	TRG	0,89	0,247	0,090 - 0,694	0,041 - 0,927	0,000	DOWN
<i>LEA</i> 0/90 R	TRG	0,89	0,226	0,107 - 0,458	0,070 - 0,837	0,000	DOWN
<i>LEA</i> 0/150 R	TRG	0,89	0,290	0,145 - 0,541	0,110 - 0,766	0,000	DOWN
<i>MDAR5</i> 0/14 R	TRG	0,84	3,197	1,818 - 8,504	1,372 - 10,280	0,000	UP
<i>MDAR5</i> 0/30 R	TRG	0,84	8,952	2,976 - 17,860	2,346 - 21,184	0,000	UP
<i>MDAR5</i> 0/90 R	TRG	0,84	8,198	5,275 - 12,869	4,183 - 15,883	0,000	UP
<i>MDAR5</i> 0/150 R	TRG	0,84	6,468	4,427 - 11,114	3,386 - 13,669	0,000	UP
<i>PD00380</i> 0/14 R	REF	0,82	1,076				

<i>PD00380</i> 0/30 R	REF	0,82	1,062				
<i>PD00380</i> 0/90 R	REF	0,82	1,137				
<i>PD00380</i> 0/150 R	REF	0,82	1,417				
<i>PFP-BETA</i> 0/14 R	TRG	0,86	0,317	0,160 - 0,823	0,123 - 1,090	0,001	DOWN
<i>PFP-BETA</i> 0/30 R	TRG	0,86	0,422	0,233 - 0,711	0,152 - 0,859	0,000	DOWN
<i>PFP-BETA</i> 0/90 R	TRG	0,86	0,585	0,436 - 0,795	0,328 - 0,931	0,000	DOWN
<i>PFP-BETA</i> 0/150 R	TRG	0,86	0,368	0,228 - 0,634	0,163 - 0,842	0,000	DOWN
<i>PRB1</i> 0/14 R	TRG	0,87	0,432	0,292 - 0,763	0,259 - 0,932	0,000	DOWN
<i>PRB1</i> 0/30 R	TRG	0,87	0,740	0,322 - 1,537	0,273 - 1,935	0,214	
<i>PRB1</i> 0/90 R	TRG	0,87	0,501	0,361 - 0,733	0,285 - 0,955	0,000	DOWN
<i>PRB1</i> 0/150 R	TRG	0,87	0,465	0,334 - 0,720	0,277 - 0,834	0,000	DOWN
<i>PRB1-3</i> 0/14 R	TRG	0,85	11,248	5,665 - 19,360	5,115 - 34,227	0,000	UP
<i>PRB1-3</i> 0/30 R	TRG	0,85	7,407	3,697 - 13,548	3,167 - 23,367	0,000	UP
<i>PRB1-3</i> 0/90 R	TRG	0,85	21,591	15,672 - 31,232	14,112 - 41,579	0,000	UP
<i>PRB1-3</i> 0/150 R	TRG	0,85	6,297	3,406 - 10,524	2,262 - 15,634	0,000	UP
<i>RUBA</i> 0/14 R	TRG	0,84	4,743	0,988 - 20,709	0,667 - 54,317	0,004	UP
<i>RUBA</i> 0/30 R	TRG	0,84	1,896	0,158 - 9,227	0,114 - 71,803	0,364	
<i>RUBA</i> 0/90 R	TRG	0,84	13,017	4,827 - 45,558	3,980 - 114,614	0,000	UP
<i>RUBA</i> 0/150 R	TRG	0,84	3,614	0,613 - 13,927	0,443 - 63,933	0,020	UP
<i>PDILI-4</i> 0/14 R	TRG	0,85	0,318	0,161 - 0,816	0,125 - 1,078	0,001	DOWN
<i>PDILI-4</i> 0/30 R	TRG	0,85	0,422	0,233 - 0,708	0,154 - 0,856	0,000	DOWN
<i>PDILI-4</i> 0/90 R	TRG	0,85	0,583	0,437 - 0,791	0,330 - 0,926	0,000	DOWN
<i>PDILI-4</i> 0/150 R	TRG	0,85	0,369	0,231 - 0,632	0,164 - 0,838	0,000	DOWN
<i>HSP81-1</i> 0/14 R	TRG	0,87	0,213	0,095 - 0,592	0,043 - 0,791	0,000	DOWN
<i>HSP81-1</i> 0/30 R	TRG	0,87	0,247	0,107 - 0,698	0,047 - 0,794	0,000	DOWN
<i>HSP81-1</i> 0/90 R	TRG	0,87	0,365	0,214 - 0,757	0,098 - 0,864	0,000	DOWN
<i>HSP81-1</i> 0/150 R	TRG	0,87	0,445	0,211 - 1,008	0,171 - 1,259	0,004	DOWN
<i>SERK</i> 0/14 R	TRG	0,87	0,055	0,013 - 0,218	0,002 - 0,728	0,000	DOWN
<i>SERK</i> 0/30 R	TRG	0,87	0,165	0,049 - 0,563	0,024 - 1,592	0,001	DOWN
<i>SERK</i> 0/90 R	TRG	0,87	0,244	0,108 - 0,882	0,057 - 1,401	0,004	DOWN
<i>SERK</i> 0/150 R	TRG	0,87	0,130	0,054 - 0,417	0,034 - 0,742	0,000	DOWN
<i>GBSSI</i> 0/14 R	TRG	0,88	0,212	0,037 - 0,765	0,019 - 1,881	0,006	DOWN
<i>GBSSI</i> 0/30 R	TRG	0,88	0,321	0,096 - 0,852	0,052 - 2,289	0,007	DOWN

<i>GBSSI</i> 0/90 R	TRG	0,88	0,690	0,240 - 1,750	0,162 - 4,932	0,280	
<i>GBSSI</i> 0/150 R	TRG	0,88	0,539	0,212 - 1,674	0,152 - 2,803	0,066	

REF- Gene de referência

TRG- Gene alvo

APÊNDICE C. Análise da expressão relativa Genótipo NR utilizando o tempo 0 (antes da indução) como controle.

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
<i>PGM</i> 0/14 NR	TRG	0,84	5,457	4,030 - 6,875	3,285 - 8,795	0,000	UP
<i>PGM</i> 0/30 NR	TRG	0,84	0,531	0,375 - 0,723	0,258 - 0,930	0,000	DOWN
<i>PGM</i> 0/90 NR	TRG	0,84	1,422	1,027 - 2,012	0,798 - 2,503	0,008	UP
<i>PGM</i> 0/150 NR	TRG	0,84	0,972	0,755 - 1,314	0,513 - 1,761	0,791	
<i>ACT2</i> 0/14 NR	REF	0,81	4,072				
<i>ACT2</i> 0/30 NR	REF	0,81	0,526				
<i>ACT2</i> 0/90 NR	REF	0,81	0,822				
<i>ACT2</i> 0/150 NR	REF	0,81	0,300				
<i>ACT1</i> 0/14 NR	TRG	0,84	3,994	2,976 - 5,622	2,172 - 6,598	0,000	UP
<i>ACT1</i> 0/30 NR	TRG	0,84	0,539	0,254 - 1,102	0,179 - 1,325	0,008	DOWN
<i>ACT1</i> 0/90 NR	TRG	0,84	0,658	0,497 - 0,856	0,391 - 1,026	0,001	DOWN
<i>ACT1</i> 0/150 NR	TRG	0,84	0,251	0,165 - 0,369	0,123 - 0,410	0,000	DOWN
<i>ANN1</i> 0/14 NR	TRG	0,82	2,843	1,852 - 4,028	1,573 - 6,528	0,000	UP
<i>ANN1</i> 0/30 NR	TRG	0,82	0,402	0,266 - 0,654	0,195 - 1,000	0,000	DOWN
<i>ANN1</i> 0/90 NR	TRG	0,82	0,276	0,173 - 0,478	0,142 - 0,602	0,000	DOWN
<i>ANN1</i> 0/150 NR	TRG	0,82	0,267	0,192 - 0,431	0,169 - 0,486	0,000	DOWN
<i>BGLUC</i> 0/14 NR	TRG	0,87	7,742	5,829 - 10,996	3,931 - 15,169	0,000	UP
<i>BGLUC</i> 0/30 NR	TRG	0,87	0,961	0,332 - 2,759	0,256 - 3,368	0,857	
<i>BGLUC</i> 0/90 NR	TRG	0,87	1,166	0,821 - 1,710	0,644 - 2,067	0,211	
<i>BGLUC</i> 0/150 NR	TRG	0,87	0,585	0,156 - 1,294	0,120 - 1,494	0,199	
<i>CAT2</i> 0/14 NR	TRG	0,85	8,954	5,164 - 17,455	3,126 - 22,890	0,000	UP
<i>CAT2</i> 0/30 NR	TRG	0,85	0,711	0,410 - 1,316	0,315 - 1,785	0,075	

CAT2 0/90 NR	TRG	0,85	1,550	0,907 - 2,264	0,785 - 3,402	0,007	UP
CAT2 0/150 NR	TRG	0,85	0,935	0,417 - 1,884	0,233 - 2,365	0,788	
OASA 0/14 NR	TRG	0,84	6,326	5,540 - 7,285	5,177 - 8,359	0,000	UP
OASA 0/30 NR	TRG	0,84	0,548	0,290 - 0,839	0,235 - 1,059	0,000	DOWN
OASA 0/90 NR	TRG	0,84	1,012	0,689 - 1,526	0,606 - 1,832	0,921	
OASA 0/150 NR	TRG	0,84	0,542	0,386 - 0,671	0,321 - 0,778	0,000	DOWN
EF1 0/14 NR	TRG	0,85	18,836	9,884 - 36,102	4,993 - 51,978	0,000	UP
EF1 0/30 NR	TRG	0,85	1,949	1,223 - 3,036	0,797 - 4,326	0,003	UP
EF1 0/90 NR	TRG	0,85	2,604	1,334 - 4,586	1,066 - 7,641	0,000	UP
EF1 0/150 NR	TRG	0,85	0,739	0,439 - 1,344	0,214 - 1,950	0,157	
ENO1 0/14 NR	TRG	0,85	1,719	0,870 - 3,171	0,506 - 4,133	0,027	UP
ENO1 0/30 NR	TRG	0,85	0,284	0,168 - 0,522	0,116 - 0,712	0,000	DOWN
ENO1 0/90 NR	TRG	0,85	1,115	0,819 - 1,520	0,671 - 1,933	0,280	
ENO1 0/150 NR	TRG	0,85	0,073	0,009 - 0,348	0,004 - 0,455	0,000	DOWN
FIE2 0/14 NR	TRG	0,86	3,401	2,531 - 4,323	1,961 - 5,105	0,000	UP
FIE2 0/30 NR	TRG	0,86	0,900	0,401 - 1,682	0,247 - 2,641	0,695	
FIE2 0/90 NR	TRG	0,86	1,667	1,231 - 2,085	0,929 - 2,534	0,000	UP
FIE2 0/150 NR	TRG	0,86	1,193	0,557 - 2,218	0,343 - 2,672	0,422	
LEA 0/14 NR	TRG	0,89	2,069	1,417 - 3,223	1,046 - 3,980	0,000	UP
LEA 0/30 NR	TRG	0,89	0,130	0,054 - 0,383	0,028 - 0,584	0,000	DOWN
LEA 0/90 NR	TRG	0,89	0,305	0,213 - 0,437	0,193 - 0,529	0,000	DOWN
LEA 0/150 NR	TRG	0,89	0,110	0,056 - 0,209	0,041 - 0,259	0,000	DOWN
MDAR5 0/14 NR	TRG	0,84	37,121	25,331 - 52,990	21,456 - 69,163	0,000	UP
MDAR5 0/30 NR	TRG	0,84	3,099	1,029 - 8,044	0,875 - 12,149	0,006	UP
MDAR5 0/90 NR	TRG	0,84	11,690	9,124 - 15,346	7,943 - 20,065	0,000	UP
MDAR5 0/150 NR	TRG	0,84	5,111	2,503 - 8,123	2,058 - 12,834	0,000	UP
PD00380 0/14 NR	REF	0,82	5,885				
PD00380 0/30 NR	REF	0,82	0,558				
PD00380 0/90 NR	REF	0,82	1,109				
PD00380 0/150 NR	REF	0,82	0,520				
PDIL1-4 0/14 NR	TRG	0,85	3,053	1,987 - 4,970	1,446 - 5,542	0,000	UP
PDIL1-4 0/30 NR	TRG	0,85	0,216	0,074 - 0,659	0,054 - 0,928	0,000	DOWN
PDIL1-4 0/90 NR	TRG	0,85	0,813	0,663 - 1,025	0,538 - 1,252	0,026	DOWN

<i>PDILI-4</i> 0/150 NR	TRG	0,85	0,135	0,074 - 0,231	0,053 - 0,266	0,000	DOWN
<i>PPF-BETA</i> 0/14 NR	TRG	0,86	8,191	6,232 - 10,387	5,250 - 12,512	0,000	UP
<i>PPF-BETA</i> 0/30 NR	TRG	0,86	0,532	0,381 - 0,728	0,320 - 0,955	0,000	DOWN
<i>PPF-BETA</i> 0/90 NR	TRG	0,86	0,778	0,336 - 1,579	0,260 - 2,129	0,292	
<i>PPF-BETA</i> 0/150 NR	TRG	0,86	0,283	0,185 - 0,444	0,148 - 0,583	0,000	DOWN
<i>PRBI</i> 0/14 NR	TRG	0,87	68,169	24,167 - 222,218	19,412 - 309,793	0,000	UP
<i>PRBI</i> 0/30 NR	TRG	0,87	6,453	4,861 - 8,514	3,625 - 10,668	0,000	UP
<i>PRBI</i> 0/90 NR	TRG	0,87	10,993	6,427 - 23,626	5,386 - 33,323	0,000	UP
<i>PRBI</i> 0/150 NR	TRG	0,87	4,805	2,603 - 11,409	2,227 - 14,981	0,000	UP
<i>PRBI-3</i> 0/14 NR	TRG	0,85	89,055	25,294 - 219,389	19,527 - 991,596	0,000	UP
<i>PRBI-3</i> 0/30 NR	TRG	0,85	11,810	4,150 - 42,590	1,637 - 89,771	0,000	UP
<i>PRBI-3</i> 0/90 NR	TRG	0,85	73,745	18,404 - 246,708	14,416 - 619,393	0,000	UP
<i>PRBI-3</i> 0/150 NR	TRG	0,85	45,577	10,314 - 178,095	7,915 - 300,382	0,000	UP
<i>RUBA</i> 0/14 NR	TRG	0,84	13,219	8,931 - 18,997	7,462 - 23,973	0,000	UP
<i>RUBA</i> 0/30 NR	TRG	0,84	0,234	0,025 - 1,673	0,016 - 2,413	0,032	DOWN
<i>RUBA</i> 0/90 NR	TRG	0,84	3,136	2,029 - 5,057	1,508 - 6,308	0,000	UP
<i>RUBA</i> 0/150 NR	TRG	0,84	1,140	0,334 - 2,645	0,226 - 3,162	0,692	
<i>HSP81-1</i> 0/14 NR	TRG	0,87	1,745	0,898 - 3,898	0,674 - 6,075	0,029	UP
<i>HSP81-1</i> 0/30 NR	TRG	0,87	0,037	0,008 - 0,133	0,006 - 0,196	0,000	DOWN
<i>HSP81-1</i> 0/90 NR	TRG	0,87	0,144	0,082 - 0,334	0,061 - 0,430	0,000	DOWN
<i>HSP81-1</i> 0/150 NR	TRG	0,87	0,043	0,014 - 0,102	0,011 - 0,231	0,000	DOWN
<i>SERK</i> 0/14 NR	TRG	0,87	1,369	0,721 - 3,392	0,572 - 4,639	0,202	
<i>SERK</i> 0/30 NR	TRG	0,87	0,036	0,008 - 0,156	0,002 - 0,262	0,000	DOWN
<i>SERK</i> 0/90 NR	TRG	0,87	0,160	0,087 - 0,379	0,070 - 0,523	0,000	DOWN
<i>SERK</i> 0/150 NR	TRG	0,87	0,043	0,018 - 0,119	0,013 - 0,186	0,000	DOWN
<i>GBSSI</i> 0/14 NR	TRG	0,88	5,597	2,201 - 13,001	1,259 - 19,736	0,000	UP
<i>GBSSI</i> 0/30 NR	TRG	0,88	0,169	0,072 - 0,528	0,024 - 0,783	0,000	DOWN
<i>GBSSI</i> 0/90 NR	TRG	0,88	0,963	0,352 - 1,972	0,306 - 2,634	0,882	
<i>GBSSI</i> 0/150 NR	TRG	0,88	0,247	0,073 - 0,886	0,034 - 1,538	0,004	DOWN

REF- Gene de referência

TRG- Gene alvo

APÊNDICE D. TRABALHOS PUBLICADOS, SUBMETIDOS E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS (2º/2016 – 1º/2018)

1. ARTIGO SUBMETIDO PROTEOMICS.

Differential protein profiles in inter specific hybrids between *Elaeis oleifera* and *E. guineensis* with contrasting responses to somatic embryogenesis competence acquisition|

Raphael Ferreira Almeida^{1,2}; Ivonaldo Reis Santos^{1,2}; Filipe Sathler Meira^{1,2}; Priscila Grynberg²; Ricardo Lopes³; Raimundo Nonato Vieira da Cunha³; Octávio L. Franco^{4,5}; Jonny Everson Scherwinski Pereira²; Angela Mehta²

2. 1st IBERO-AMERICAN, 6th BrMASS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY- RIO 2016.



**1st IBERO-AMERICAN
6th BrMASS CONFERENCE
ON MASS SPECTROMETRY - RIO 2016**



CERTIFICATE OF PRESENTATION

We hereby certifies that the Abstract entitled
"PROTEOMIC SCREENING OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEINS IN PHASEOLUS VULGARIS SIMBIONT RHIZOBIUM TROPICI CIAT899 UNDER SALINE STRESS"
 was presented as POSTER by the authors **MARIANA ROCHA MAXIMIANO, ESAÚ MEGIAS, IVONALDO REIS SANTOS, ALDENÍ SILVA DE LIMA, MANUEL MEGIAS, OCTÁVIO LUIZ FRANCO, ANGELA MEHTA** during the 1st IBERO-American, 6th BrMASS Conference on Mass spectrometry and the 13th UppCon, which were held at Windsor Barra Hotel, Rio de Janeiro, Brazil at December 10th – 14th , 2016.


 Prof. Dr. José Manuel Riveros
President


 Prof. Marcos N. Eberlin
Executive-president


 Prof. Dr. Marcelo Valli de Sousa
Educational Director

3. 1st IBERO-AMERICAN, 6th BrMASS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY- RIO 2016.



4. 67° CNBOT- CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA.



5. XXII ENCONTRO TALENTO ESTUDANTIL.



6. XXI ENCONTRO TALENTO ESTUDANTIL.



7. 29º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA.

29º Congresso Brasileiro de Microbiologia
De 22 a 25 de Outubro de 2017 / Foz do Iguaçu-Paraná-Brasil
"60 anos da Sociedade Brasileira de Microbiologia"

29º CBM | 2017

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado **PROTEOME ANALYSIS OF THE SYMBIONT RHIZOBIUM TROPICI CIAT899 IN RESPONSE TO STRESS** com a autoria de: **MAXIMIANO, M. R., MEGIAS, E., SANTOS, I. R., LIMA, A. S., MEGIAS, M., FRANCO, O. L., MEHTA, A.** foi apresentado na forma de pôster durante o **29º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA - CBM** realizado no **Rafain Palace Hotel e Convention Center**, na cidade de **Foz do Iguaçu, PR**, no período de **22 a 25 de outubro de 2017**.

Carlos F. Taborda
Prof. Dr. Carlos Faleiros Taborda
Presidente da SBM

JLM
Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
1º Secretário da SBM

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:
SBM

APOIO:

CNPq **FAPESP** **INSTITUT MERIEUX** **MICROGEO** **BD** **FAPESP** **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL** **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**