



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

THAUAN MARTINS LELIS

Aperfeiçoamento da diferenciação de embriões somáticos em palma de óleo e avaliação anatômica e da expressão de genes envolvidos com a hiperhidricidade durante a regeneração de plantas

Brasília - DF
2023

MESTRADO EM BOTÂNICA

THAUAN MARTINS LELIS

Aperfeiçoamento da diferenciação de embriões somáticos em palma de óleo e avaliação anatômica e da expressão de genes envolvidos com a hiperhidricidade durante a regeneração de plantas

Defesa de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Botânica, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Botânica pela Universidade de Brasília

Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Orientador
Angela Mehta do Reis
Coorientadora

Brasília - DF
2023

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** - Planta de palma de óleo híbrida apresentando frutificação e crescimento vertical do caule reduzido. Fonte: Scherwinski-Pereira, J.E., Manaus, AM, 2012. 14
- Figura 2** - Cachos com frutos da palma de óleo (*Elaeis* spp.) apresentando diferenças morfológicas entre *E. guineensis* var. *dura*; *E. guineensis* var. *tenera* e *E. guineensis* var. *pisifera*..... 15
- Figura 3** - Produção/rendimento de frutos de dendê no mundo + (total). A área plantada (linha azul) vai de 10 a 30 milhões de hectares, enquanto a produção (linha vermelha) vai de 200 a 600 milhões toneladas..... 16
- Figura 4** - Principais passos da via biossintética de giberelinas nas plantas vasculares, mostrando a separação espacial das três etapas que ocorrem nos plastídios, no retículo endoplasmático e no citoplasma. As enzimas que catalisam as conversões ao longo da biossíntese de ácido giberélico (AG) estão indicadas em azul (CPS simboliza a sintase do ent-copalil difosfato) e as giberelinas bioativas estão ressaltadas no interior do quadro verde. A via da hidroxilação 13 inicial está apresentada em verde, e a via da não hidroxilação 13 em preto. Também é mostrado o papel metabólico da enzima 2-oxidase do AG no controle dos teores de giberelinas bioativas e de seus precursores imediatos.....

21

CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Formação de calos em folhas jovens imaturas do híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) após 180 dias em meio de MS suplementado com 450µM de Picloram. A. – Surgimento de calos na região central com aparência globular. B. Surgimento de calos alongados nas extremidades do explante. 41
- Figura 2** - Razões de chance (*odds ratio* – OR) e intervalos de confiança de 95% calculadas para diferenciação de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos de palma de óleo (híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* - B351733) com diferentes concentrações de AG₃ (0, 0,5 e 1,0 mg)..... 43
- Figura 3** - Etapas do processo de embriogênese somática em folhas jovens imaturas do híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) até a aclimatização. A – Surgimento de calos embriogênicos após 180 dias em meio suplementado com Picloram. B – Calo introduzidos em meio de multiplicação de MS suplementado com Picloram e 2iP. C – Calos após 90 dias no meio de multiplicação. D – Embrião somático hiperhídrico meio de MS com AG₃. E – Germinação de embrião somático hiperhídrico em meio de MS com AG₃. F – Agrupamento (cluster) com vários embriões somáticos normais em meio de MS com AG₃. G – Embrião somático normal em meio de MS 45

	com AG ₃ . H – Germinação de embrião somático normal em meio de MS com AG ₃ . I – Planta em meio de MS líquido com AIB para crescimento da parte aérea e radicular. J – Plantas após seis meses em meio líquido com AIB. K – Planta aclimatizada. L – Planta clonada de palma de óleo transplantada para casa de vegetação.....	
Figura 4	- Germinação de embriões somáticos de palma de óleo (híbrido interespecífico de <i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> - B351733) oriundos de calos embriogênicos tratados com diferentes concentrações de AG ₃	49
Figura 5	- Processo de embriogênese somática secundária a partir de plantas de híbrido interespecífico de <i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> (B351733) ocorrido durante a etapa de enraizamento em meio suplementado com ácido indobutírico. A – Planta em meio de regeneração. B – Embriogênese somática secundária evidenciada durante a troca de meio.....	52
Figura 6	- Processo de assincronia de embriões somáticos de híbrido interespecífico de <i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> (B351733) em diversos estágios de desenvolvimento em meio de MS suplementado com AG ₃ , após 210 dias desde a inoculação.....	54
Figura 7	- Análise da fidelidade genética por ISSR de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática de folhas imaturas do primer 9 ps.....	56
Figura 8	Dendograma com bootstrap da análise genética feita por ISSR em 30 clones de palma de óleo gerados por meio de embriogênese somática.	58

CAPÍTULO 2

Figura 1	- Análise morfológica de embriões somáticos normais e hiperhídricos de um híbrido interespecífico de palma de óleo (<i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> (B351733) e seu processo de germinação. A. Agrupamento (cluster) de embriões somáticos normais. B. Germinação de agrupamentos (cluster) de embriões somáticos normais. C. Agrupamento (cluster) de embriões somáticos hiperhídricos. D. Germinação de embriões somáticos (cluster) hiperhídrico..	73
Figura 2	- Quantidade de embriões somáticos diferenciados por calo quanto ao aspecto normal e hiperhídrico em um híbrido interespecífico de palma de óleo (<i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i>).).....	75
Figura 3	- Análise histoquímica de embriões somáticos Hiperhídricos e Normais de de um híbrido interespecífico de palma de óleo (<i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i>) com Azul de Toluidina. A-C: Embriões somáticos Normais em corte longitudinal. D-G: Embriões somáticos Hiperhídricos em corte longitudinal. H: Embrião somático Normal em corte transversal. I: Embrião somático Hiperhídrico em corte transversal. J-L: Agrupamentos (cluster) de embriões somáticos normais. Abreviações: pd: Protoderme. cp: Procâmbio. rd: Região Distal. rp: Região Proximal. v: vacúolo. n: Núcleo. Barras: A = 500 µm, B, C, E, F, I = 50 µm, D, H = 500 µm e G = 200 µm. * = mucilagem, ponta de seta = núcleo.....	77

Figura 4	- Análise histoquímica de embriões somáticos Hiperhídricos e Normais de um híbrido interespecífico de de palma de óleo (<i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i>) com Lugol e XP. A-B: Embriões somáticos Normais em corte longitudinal corados com Lugol. C-D: Embriões somáticos Normais em corte longitudinal corados com XP. E-G: Embrião somáticos Hiperhídrico em corte longitudinal corado com XP. Abreviações: pd: Protoderme. cp: Procâmbio. rd: Região Distal. rp: Região Proximal. v: vacúolo. n: Núcleo. Barras: A e C: 500µm.	79
Figura 5	- Figura 5. Caracterização de células de embriões somáticos de palma de óleo (<i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i>) (A-C) e anormais - hiperhídricos (D-F). A. Células ricas em organelas (mitocôndria e retículo endoplasmático) e amiloplastos. B, C. Células com abundância de reservas (amiloplastos e corpos proteicos – pontilhado vermelho). D-E. Células com vacúolos proeminentes, amiloplastos residuais e grandes espaços intercelulares. Abreviações: am, amiloplasto; ei, espaço intercelular; m, micotcôndria; nc, nucléolo; n, núcleo; pc, parede celular; re, retículo endoplasmáticos e v, vacúolo. Barras: A, D = 5 mm, B, C, E, F = 2 mm.....	81
CAPÍTULO 3		
Figura 1	- Expressão gênica relativa de genes potencialmente relacionados à hiperhidricidade.....	97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	- Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (AG ₃) sobre o percentual de diferenciação de embriões somáticos, a partir de calos embriogênicos de palma de óleo (híbrido interespecífico de <i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> - B351733), após sete meses de cultivo.....	41
Tabela 2	- Razão de chance (<i>odds ratio</i>) de diferenciação de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos de palma de óleo (híbrido interespecífico de <i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> - B351733) entre os pares de tratamentos nas três concentrações de AG ₃ (0, 0,5 e 1,0 mg) avaliadas.....	42
Tabela 3	- Razão de Risco Relativo para verificar a probabilidade de um embrião somático do híbrido interespecífico de <i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> (B351733) se tornar hiperhídrico ou não (embrião normal ou em início de germinação) nos em diferentes concentração de AG ₃	46
Tabela 4	- Razão de chance (<i>odds ratio</i>) da germinação embriões somáticos de palma de óleo (híbrido interespecífico de <i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> - B351733) entre os pares de tratamentos nas três concentrações de AG ₃ (0, 0,5 e 1,0 mg).....	48
Tabela 5	- Avaliação mensal de plantas germinadas em diferentes concentrações de AIB (1,5 mL/L e 11 mL/L).	51
Tabela 6	- Razão de Chance (<i>odds radio</i>) de enraizamento entre os tratamento 11 e 1,5 mL/L de AIB.....	51
Tabela 7	Sequências de primers de ISSR utilizados para análise genética de clones de palma de óleo na reação de PCR.	54
Tabela 8	Análise de fidelidade genética por ISSR de clones de um híbrido interespecífico de <i>Elaeis oleifera</i> × <i>E. guineensis</i> (B351733) propagados via embriogênese somática de explantes foliares imaturos.	56
CAPÍTULO 3		
Tabela 1	- Informações gerais sobre os genes selecionados para análise de expressão gênica nos embriões de palma de óleo.....	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2iP	2-isopenteniladenina
AG ₃	Ácido Giberélico
AIB	Ácido Indolbutírico
AM	Manaus
CAT	Catalase
DF	Distrito Federal
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GTX	Peroxidasas
Hh	Hiperhídrico
ISSR	<i>inter-simple sequence repeat</i>
MS	Murashige e Skoog
Nn	Normal
PICLORAM	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
DS	Desenvolvimento Sustentável
OR	<i>Odds Ratio</i>
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RRR	Razão de Risco Relativo
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

	RESUMO GERAL	9
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
	2.1 Aspectos gerais da palma de óleo	14
	2.2 A embriogênese somática e sua aplicação em dendezeiro.....	17
	2.3 Ácido giberélico (AG ₃)	18
	2.4 A hiperhidricidade no cultivo <i>in vitro</i>	21
	2.5 Expressão gênica na hiperhidricidade e embriogênese somática	22
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
	CAPÍTULO 1	30
	RESUMO	31
1	INTRODUÇÃO	32
2	MATERIAIS E MÉTODOS	34
	2.1 Local dos experimentos e origem do material vegetal	34
	2.2 Indução de calos e multiplicação dos calos embriogênicos	34
	2.3 Diferenciação de embriões somáticos e regeneração de plantas	35
	2.3.1 Análise estatística dos dados obtidos	35
	2.4 Otimização do enraizamento.	37
	2.5 Aclimatização das plantas	37
	2.6. Análise de fidelidade genética por ISSR	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
	3.1 Otimização do protocolo de embriogênese somática	40
	3.2 Enraizamento e aclimatização	50
	3.3 Análise molecular dos regenerantes por ISSR	54
4	CONCLUSÕES	59
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	CAPÍTULO 2	67
	RESUMO	68

1	INTRODUÇÃO	69
2	MATERIAIS E MÉTODOS	71
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
4	CONCLUSÕES	81
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	CAPÍTULO 3	89
	RESUMO	90
1	INTRODUÇÃO	91
2	MATERIAIS E MÉTODOS	92
	2.1 Coleta de embriões	92
	2.2 Seleção de genes candidatos e desenho de <i>primers</i>	92
	2.3 Extração de RNA total	94
	2.4 Tratamento de RNA total e Síntese de cDNA	95
	2.5 RT-qPCR	95
3	RESULTADOS	96
	3.1 Resposta de Estresse e Defesa	98
	3.2 Transporte por membrana	98
	3.3 Regulação de etileno	99
	3.4 Desenvolvimento de planta	101
	3.5 Metabolismo energético	102
4	CONCLUSÕES	103
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

RESUMO GERAL

O objetivo do trabalho foi aperfeiçoar o protocolo de embriogênese somática de um híbrido interespecífico de palma de óleo (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) desenvolvido em sistema bifásico, a partir da melhoria das etapas de diferenciação e regeneração das plantas. Em um segundo experimento, foram avaliadas as diferenças morfológicas, anatômicas e histoquímicas de embriões somáticos normais e hiperhídricos de palma de óleo submetidos aos tratamentos com ácido giberélico (AG₃). Por fim, o estudo verificou genes diferentemente expressos em embriões somáticos hiperhídricos ou não em vias de regeneração. Explantes foliares imaturos de palma de óleo do genótipo B351733 foram utilizados em meio de cultivo semissólido, suplementado com 30 g/L de sacarose e 450 µM de Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram), além de 2,5 g/L de carvão ativado. Para multiplicação, os calos formados foram transferidos para novo meio de multiplicação, constituído pelo meio de MS com 30 g/L de sacarose, 5 µM de Picloram, 20 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 2,5 g/L de carvão ativado, onde permaneceram por 90 dias. Em seguida, os calos foram colocados para a diferenciação de embriões somáticos, em meio de cultivo de MS com sacarose 30 g/L, 1 g/L de caseína hidrolizada, 0,25 g/L de glutamina, asparagina, arginina e cisteína, além de 2,5 g/L de carvão ativado e três concentrações de AG₃ (0, 0,5 e 1,0 mg/L), onde permaneceram por até 210 dias. Os embriões somáticos diferenciados e que apresentavam início de germinação foram então transferidos para o meio líquido para a regeneração, composto pelo meio de MS1/2, suplementado com 30 g/L de sacarose, 1,0 g/L de caseína, 0,25 g/L de glutamina, asparagina, arginina e cisteína, 1,0 g/L polivinilpolipirrolidona (PVP) e duas concentrações de ácido indolbutírico (AIB): 1,5 e 11 mg/L. Por fim, análises de fidelidade genética foram realizadas para avaliar a estabilidade genética do material regenerado através de marcadores ISSR utilizando as folhas de plantas clonais regeneradas. Para as análises morfológicas, anatômicas e histoquímicas, embriões somáticos oriundos do meio de diferenciação e apresentando aspecto normal (Nm) e hiperhídrico (Hh) foram fotografados, emblocados e corados para avaliação, além de terem sido observados e comparados em microscopia eletrônica. Para os estudos da expressão gênica, embriões somáticos normais e hiperhídricos do tratamento controle e do tratamento que proporcionou os melhores resultados para a diferenciação de embriões somáticos foram aleatorizados, selecionados e avaliados. Um total de 19 genes potencialmente envolvidos na hiperhidricidade foram selecionados para as análises. Verificou-se que o tratamento com 1,0 mg/L de AG₃ melhorou significativamente a taxa de diferenciação (86,2%) e também na germinação (38,4%) de embriões somáticos,

quando comparado ao tratamento controle, sem a presença de AG₃ (41,7% e 17,1%, respectivamente). Os embriões somáticos que germinaram apresentaram uma porcentagem de enraizamento maior no tratamento com 11 mg/L de AIB (37%), quando comparado a taxa de enraizamento do meio com menor quantidade de auxina (20%). Com relação às análises de estabilidade genética realizadas, verificou-se diferenças em 13,3% das plantas analisadas. Quando se avaliou anatômica e histoquimicamente os embriões somáticos Nm e Hh, verificou-se maior acúmulo de proteínas e amido nos embriões somáticos Nm, quando comparado aos Hh que não apresentaram reservas de amido. No estudo de expressão gênica, os resultados revelaram que dos 19 genes testados, 17 deles apresentaram expressão gênica diferencial nos embriões hiperhídricos. Os genes envolvidos na resposta de estresse, metabolismo energético, defesa, transporte por membrana, regulação hormonal e desenvolvimento apresentaram-se regulados positivamente, com destaque para a síntese e transporte de etileno. Conclui-se que a adição de AG₃ ao meio de cultura melhora as taxas de diferenciação e regeneração de embriões somáticos em palma de óleo, embora também aumentem a ocorrência de embriões somáticos vitrificados. A principal característica avaliada de forma histoquímica e da expressão de genes deste tipo de formação foi a deficiência em acumular amido e apresentar a maioria dos genes envolvidos com esse fenômeno aumentados.

Palavras chave: *Arecaceae*, *Elaeis*, embriogênese somática, vitrificação, histoquímica, expressão gênica.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Uma das questões levantadas pela comunidade internacional nas últimas décadas é a busca por fonte de energias renováveis e sustentáveis, com vista a substituir ou auxiliar a produção de energia oriunda de fontes poluidoras e não renováveis, como o petróleo (OLIVEIRA; MARIO; PACHECO, 2020). Os autores também afirmam que o petróleo é a fonte de energia mais utilizada no mundo, porém, além de não ser uma fonte renovável, os preços vêm aumentando devido às crises econômicas, sociais e aos impactos ambientais causados pelo seu uso excessivo. Para mudar tal cenário, é necessário o investimento em estudos e em formas alternativas de energia, e o biodiesel torna-se uma solução promissora para suprir a demanda do mercado (HONG, 2012).

Atualmente, o biodiesel é um importante produto mundial que pode auxiliar na geração de empregos e renda dentro dos países, além da promoção de inclusão de povos e comunidades rurais e marginalizadas, caso a produção do biocombustível seja feita a partir de insumos vegetais (SANTOS et al., 2022; LIMA et al., 2023). Monteiro e Homma (2014) também afirmam que a demanda por combustíveis provenientes de óleos vegetais cresce, principalmente, em países em franco desenvolvimento, visto o baixo custo de produção em comparação com os óleos animais.

Diante deste cenário, o Brasil decidiu investir na produção de biodiesel e, em 2004, foi criado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), Resolução N°49, de 16 de novembro de 2004, com objetivo de “produzir o biodiesel a partir de diferentes matérias-primas, fortalecendo as potencialidades regionais” (BRASIL, 2019, p.1). Após a implementação do programa, diversos projetos surgiram com o intuito de aumentar a produção de biodiesel do país (FERREIRA et al., 2012). Por ser um país tropical e dotado de uma extensa área territorial, o Brasil tem as condições ideais para ser um grande produtor de biocombustível vegetal (GONTIJO et al., 2011). Dentre os cultivos de óleos vegetais, o Brasil se destaca pela produção de óleo de soja, porém a produção de palma de óleo (NOME CIENTÍFICO) tem seu destaque por apresentar um potencial de rendimento que varia entre 4 a 7 toneladas por hectares anualmente que equivale entre sete e dez vezes maior que o potencial do óleo de soja (LIN et al., 2009; JAYANTHI et al., 2015).

A palma de óleo é uma oleaginosa da família Areaceae e de valiosa importância devido ao óleo vegetal extraído desta cultura que pode ser utilizado em diversos produtos agroalimentares, óleos corporais e para produção de biodiesel (MUTSAERS, 2019). O óleo proveniente da palma de óleo foi o mais comercializado no mundo em 2016 e como projeções

futuras de incremento da demanda devido a seu alto rendimento por hectare (VIJAY et al., 2016; KHATUN et al., 2017)

A palma de óleo tem uma vida produtiva útil em média de 25 anos, e a cada ano, estima-se que 4% da produção total de palma de óleo precise ser renovada, o que daria em torno de 100 milhões de árvores a serem substituídas (CORLEY; TINKER, 2016). Atualmente, a produção e comercialização de mudas se dá, principalmente, por meio de sementes que, apesar de serem oriundas de cruzamentos controlados, gera genótipos desiguais quanto à capacidade de produção de óleo devido à alta heterozigosidade, o que dificulta o desenvolvimento uniforme da cultura (BARCELOS et al., 2015; CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020).

Uma das soluções para tal problema é a clonagem dos genótipos superiores. Porém, por se tratar de uma palmeira, a palma de óleo tem crescimento monopodial, com único crescimento apical e, portanto, sem perfilhamento, sendo praticamente impossível de ser clonada por meios tradicionais (LOW et al., 2008; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BARCELOS et al., 2015). Nesse sentido, países criaram programas e investiram no melhoramento genético da palma de óleo e, tentativamente, em técnicas de clonagem para propagação de genótipos de interesse. Uma das únicas e mais eficientes abordagens utilizadas para propagação vegetativa dessa espécie consiste na embriogênese somática (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; GOMES et al., 2016; GOMES et al., 2017; ALMEIDA et al., 2020; ZANG et al., 2021).

Todavia, ainda existem importantes gargalos a serem superados para aprimoramento da técnica. Dentre eles, pode-se destacar o alto custo (GOMES et al., 2016); além da produção de anormalidades dos calos e embriões somáticos (MONSALUD, 1995). Uma das anormalidades recorrentes em alguns genótipos é a vitrificação ou hiperhidricidade, na qual os tecidos vegetais são morfológica e anatomicamente caracterizados por sua transparência e má formação para o desenvolvimento vegetal (GAO; XIA; AN, 2022). Estudos para entendimento dos mecanismos que levam ou não a hiperhidricidade são poucos até o momento e, para a palma de óleo, inexistentes.

Apesar de vários estudos com a palma de óleo, a maioria deles é focado na parte de indução da embriogênese somática (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; ALMEIDA et al., 2020; ZANG et al., 2021; SILVA-CARDOSO et al., 2022), e o estudo sobre o entendimento dos processos que levam a diferenciação e regeneração de plantas são escassos.

O objetivo do trabalho foi aperfeiçoar o protocolo de embriogênese somática de um híbrido interespecífico de palma de óleo (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) desenvolvido em sistema bifásico, a partir da melhoria das etapas de diferenciação e regeneração das plantas. Em um segundo momento, foram avaliadas as diferenças morfológicas, anatômicas e histoquímicas de embriões somáticos normais e hiperhídricos de palma de óleo submetidos aos tratamentos com ácido giberélico (AG₃). Por fim, o estudo verificou genes diferentemente expressos em embriões somáticos hiperhídricos ou não em vias de regeneração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da palma de óleo

A palma de óleo (*Elaeis* sp.) é uma palmeira oleaginosa descrita por Nicholas Joseph Jacquin em 1763, e o gênero *Elaeis* deriva do grego *elaion*, que significa óleo (DRANSFIELD et al., 2015). Segundo a classificação filogenética atual da palma de óleo, ela pertence à classe da Lilopsida (monocotiledônea); sub-classe Arecidae; ordem Arecales; família Arecaceae; subfamília Arcoideae (TREGEAR; RIVAL; PINTAUD, 2011; CORLEY; TINKER, 2016). O dendezeiro, nome popular da referida espécie, caracteriza-se por ser uma palmeira com crescimento monopodial do caule que pode atingir o comprimento entre 25 a 30 metros (ADAM et al., 2005). Além disso, os autores afirmam que as folhas têm venação paralelinérvea e são do tipo pinada, com 30 a 45 folíolos em média, sendo que a estrutura pinada se desenvolve a partir do meristema apical. De acordo com o mesmo autor, como é típico de monocotiledôneas, o sistema radicular do dendezeiro é fasciculado, também conhecido como em cabeleira e é composto por diversas raízes adventícias primárias que se ramificam do bulbo radicular. A imagem de uma planta de dendezeiro pode ser vista na Figura 1.



Figura 1 – Planta de palma de óleo híbrida apresentando frutificação e crescimento vertical do caule reduzido. Fonte: Scherwinski-Pereira, J.E., Manaus, AM, 2012.

Nesse gênero, uma característica marcante é que as flores são monoicas, ou seja, apresentam tanto flores masculinas, quanto femininas em inflorescências separadas, e as mesmas são protegidas por brácteas denominadas espatas. Evolutivamente, as vantagens de ter flores monoicas que ocorrem ciclos é a diminuição da autofecundação, priorizando a fecundação cruzada (ADAM et al., 2011). O gênero em questão é composto por duas espécies de alta importância econômica de produção de óleo vegetal, sendo a primeira o *E. guineenses*, da região central e ocidental do continente africano, e a segunda a *E. oleífera*, nativa da região americana (REY et al., 2004). O dendezeiro africano é o mais cultivado devido ao fruto apresentar uma maior quantidade de óleo, porém, o dendezeiro americano apresenta vantagens genéticas importantes como melhor adaptação a alguns ambientes, pode ser colhida durante um período de vida mais longo e tolerância a pragas e doenças comuns que afetam o *E. guineenses* (CADENA et al., 2012; RIVERA; CAYÓN; LOPEZ, 2013). Por isso, a produção de híbridos entre os dois gêneros pode melhorar a produção de óleo vegetal.

O fruto da palma de óleo de onde é extraído o óleo vegetal é formado em cachos ovais, com média de 1500 frutos por cacho, sendo o fruto considerado uma drupa séssil (ADAM et al., 2005). A divergência do mesocarpo do fruto é de grande importância para seleção de genótipos superiores, podendo ser encontradas três variedades (Figura 2): *dura*, *pisífera* e *tenera*, sendo a última, fruto da hibridização das outras duas variantes (BUDIMAN et al., 2021). A espessura do endocarpo é determinada pela expressão do gene *Sh*, sendo as variantes *dura*, *pisífera* e *tenera*, respectivamente, homozigota dominante ($Sh+/Sh+$), homozigota recessiva ($Sh-/Sh-$) e heterozigota ($Sh+/Sh-$) para o gene *Sh* (MARTIN et al., 2022). A variedade *tenera* é a com maior potencial comercial, devido à maior espessura do endocarpo, que varia de 0,5 a 3 mm, e tem um teor de óleo no mesocarpo entre 60 e 95% (CORLEY; TINKER, 2016).

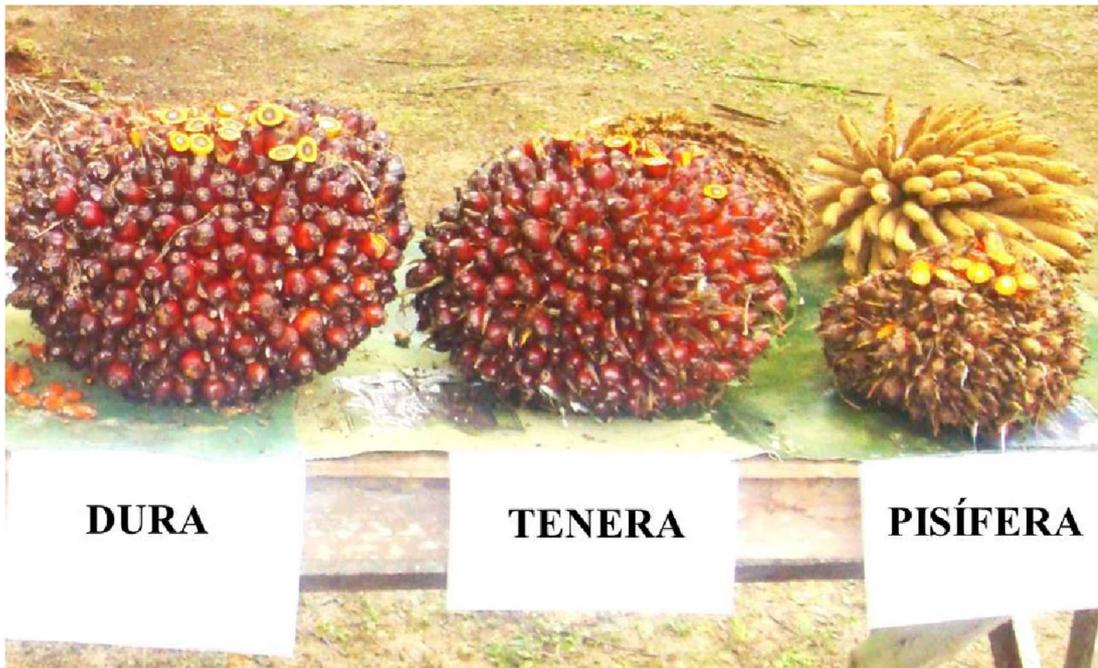


Figura 2 - Cachos com frutos da palma de óleo (*Elaeis* spp.) apresentando diferenças morfológicas entre *E. guineensis* var. *dura*; *E. guineensis* var. *tenera* e *E. guineensis* var. *pisifera*.

Fonte: Foto: Scherwinski-Pereira (BALZON, 2017)

De acordo com o trabalho de Corley e Tinker (2016), a palma de óleo tem uma vida produtiva útil em média de 25 anos e, a cada ano, estima-se que 4% da produção total de palma de óleo precisa ser renovada, o que daria em torno de 100 milhões de árvores a serem substituídas. Além da vida útil, a palma de óleo sofre com patógenos que prejudicam a cultura, como, visto na região norte do Brasil, a infecção por *Rhinostomus barbirostris* e *Ceratocystis paradoxa* (MOURA et al., 2013) e *Helminthosporiella stilbacea* (ROSADO et al., 2019).

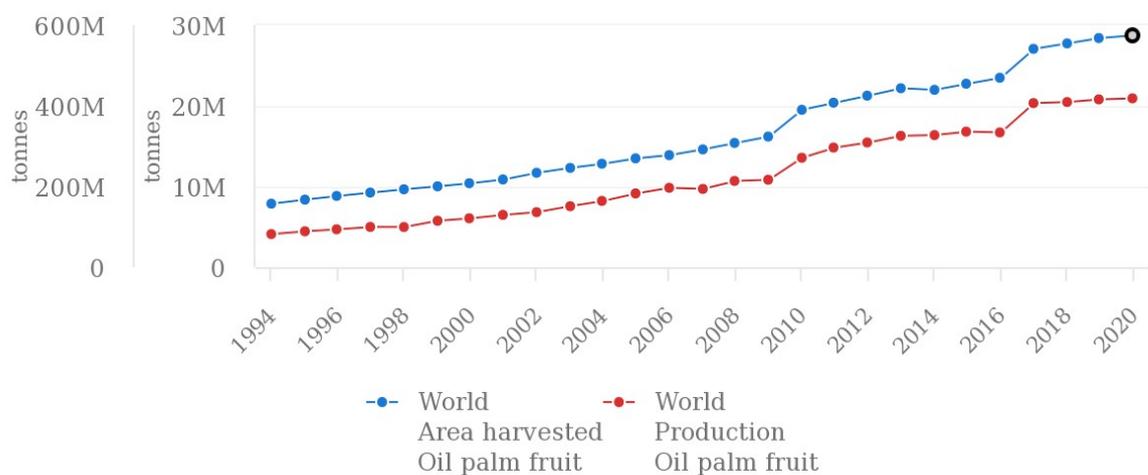


Figura 3 - Produção/rendimento de frutos de dendê no mundo + (total). A área plantada (linha azul) vai de 10 a 30 milhões de hectares, enquanto a produção (linha vermelha) vai de 200 a 600 milhões de toneladas.

Fonte: FAOSTAT (2020).

Ao analisar a produção e rendimento de palma de óleo pelo mundo (Figura 3), percebe-se que a área de plantio chega a quase 30 milhões de hectares. Em consonância com os dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) presentes da Figura 3, percebe-se que a produção de palma de óleo aumentou por quase três vezes em 20 anos (FAO, 2020). Esse importante incremento dos últimos anos deve-se ao grande número de produtos derivados do óleo usados no cotidiano das pessoas, como no setor alimentício, produção de sabão, produção de cosméticos e para geração de biocombustível (MUKHERJEE; SOVACOOOL, 2014; OOSTERVEER, 2015; MUTSAERS, 2019).

Neste sentido, o Brasil criou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), Resolução N°49, de 16 de novembro de 2004, com objetivo de “produzir o biodiesel a partir de diferentes matérias-primas, fortalecendo as potencialidades regionais” (BRASIL, 2019, p.1). Em virtude das condições climáticas e a extensa área territorial, o Brasil é um potencial produtor forte de palma de óleo e biocombustível oriundo de vegetais (GONTIJO et al., 2011). O Brasil já é um grande produtor de óleo vegetal e grande parte é oriundo da soja como fonte primária. A produção de palma de óleo tem seu destaque por apresentar um rendimento que varia entre quatro e sete toneladas por hectares anualmente, o que equivale a um valor entre sete e dez o potencial do óleo de soja (LIN et al., 2009; JAYANTHI et al., 2015).

Com os programas de melhoramento genético, a palma de óleo aumentou sua capacidade de produção em menor tempo, mas a demanda por mudas continua alta. A principal forma de propagação do dendezeiro é por sementes e, muitas delas apresentam dormência e dificuldades para germinar (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020). Adicionalmente, a propagação via semente, em diversas vezes, não gera genótipos produtivos como os parentais, devido à alta heterozigosidade da cultura da palma de óleo, o que não é interessante do ponto de vista produtivo e econômico (BARCELOS et al., 2015).

Para manutenção genética dos genótipos superiores que apresentam alta produção de óleo, a clonagem é uma ferramenta importante para propagação em massa de plantas selecionadas e superprodutivas. Contudo, diferente de diversas espécies vegetais, a palma de óleo é uma planta com crescimento monopodial, e a propagação via estaquia, brotos ou

qualquer outro método convencional (LOW et al., 2008; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BARCELOS et al., 2015). Nesse contexto, países investiram em técnicas de clonagem para a propagação de genótipos de interesse, entre as quais menciona-se a embriogênese somática, a mais utilizada atualmente para a propagação dessa espécie (BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; GOMES et al., 2016; GOMES et al., 2017; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2020; ZANG et al., 2021).

2.2 A embriogênese somática e sua aplicação em palma de óleo

Em termos conceituais, a embriogênese somática é o processo de formação de embriões por meio de células não germinativas, que irão dar origem estruturas semelhantes a embriões zigóticos (IKEUCHI et al., 2016; JAIN et al., 2018) por meio de várias etapas (transdiferenciação de tecidos, proliferação de calos, diferenciação e regeneração). Ela pode ser induzida a partir de uma ou mais células somáticas, sem fertilização ou fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010). Para indução da embriogênese somática, faz-se necessário, na grande maioria das vezes, a utilização de reguladores de crescimento ou fitohormônios (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; GOMES et al., 2016; GOMES et al., 2017; GUO et al., 2019;; ALMEIDA et al., 2020; ZANG et al., 2021). O produto gerado desta técnica são os embriões somáticos, que podem ser conceituados como estruturas bipolares que não têm conexão vascular com o tecido que o gerou (VON ARNOLD et al., 2002; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014; LELJAK-LEVANIĆ et al., 2015; HORSTMAN et al. 2017).

É importante salientar que a origem da fonte do explante e seu estágio de desenvolvimento são importantes fatores para melhoria da técnica (SILVA-CARDOSO et al., 2020). De maneira geral, existem duas vias de embriogênese somática: a direta, na qual os explantes não passam pelo estágio de formação de calos (HORSTMAN et al., 2017; IKEUCHI et al., 2016), e a indireta, na qual o explante precisa passar pelo processo de produção de calos (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010).

De fato, a embriogênese somática é uma técnica promissora de regeneração de plantas, principalmente em razão da totipotência e plasticidade das células vegetais (FEHÉR, 2015; GULZAR et al., 2020). Porém, ainda existem gargalos a serem superados para aprimoramento da técnica. Dentre eles, pode-se citar o alto custo da técnica, a necessidade de mão de obra especializada, além do uso de reagentes que encarecem o processo de propagação

comparativamente à utilização de sementes (GOMES et al., 2016). Outro fator importante a ser considerado é que por serem consideradas recalcitrantes ao cultivo *in vitro*, as palmeiras ainda carecem de estudos mais aprofundados para que o processo de embriogênese somática seja melhorado (SILVA-CARDOSO et al., 2020). Apesar de vários estudos com o dendezeiro, a maioria deles é focado na parte de indução da embriogênese somática (BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2020; ZANG et al., 2021). Contudo, fazem-se necessários estudos acerca da diferenciação de embriões somáticos a partir de calos, visando à factibilidade dos protocolos.

2.3 O uso do ácido giberélico (AG₃) na diferenciação de embriões somáticos

Apesar de ainda não ser bem explorada, a germinação de sementes pode auxiliar na compreensão dos processos fisiológicos de maturação e germinação dos embriões somáticos. Isso porque o embrião somático é bastante semelhante fisiologicamente e anatomicamente ao embrião zigótico (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; ALMEIDA et al., 2020)

Ao analisar a germinação de sementes na família da *Arecaceae*, é possível observar que espécies como *Acrocomia aculeata*, *Attalea vitrivir* e *Butia capitata* têm o ácido giberélico (AG₃) como um fator determinante para a germinação de suas sementes (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2018). Os mesmos autores afirmam que o efeito do AG₃ está diretamente relacionado com a quebra/deslocamento do opérculo que ocorre após a separação da região mais fraca do endosperma micropilar. Num estudo com macaúba (*A. aculeata*), Bicalho et al. (2015) verificaram que a adição de AG₃ proporcionou uma taxa de 37,4% de germinação, enquanto o controle com água proporcionou apenas 9,9%. Visto à proximidade taxonômica dessas palmeiras com a palma de óleo, o uso de AG₃ pode ser um importante fator para diferenciação de calos e germinação de embriões somáticos.

De fato, os níveis de AG₃ atuam na quebra de dormência das sementes ao induzir a síntese ou ativação de enzimas de desprendimento da parede celular, estímulos que promovem a protrusão e o desenvolvimento da radícula e do embrião, com isso, provendo a finalização do processo de germinação (BEWLEY et al., 2013). Guerra et al. (1997) demonstraram a influência do AG₃ na taxa de germinação da dicotiledônea *Acca sellowiana*. Nesse trabalho, os tratamentos com o regulador proporcionaram 100% de germinação, enquanto o grupo controle proporcionou apenas 50%. Outro estudo mais recente com mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L. × *V. angustifolium* Ait.) mostrou que diferentes reguladores de crescimento

podem induzir a maturação de embriões somáticos, dentre eles, o AG₃ (GHOSH; IGAMBERDIEV; DEBNATH, 2018).

As funções das giberelinas nas plantas são variadas, como crescimento caulinar e alongamento celular, estabelecimento e desenvolvimento de frutos, indução floral, maturação da planta, determinação sexual em plantas monóicas e a quebra de dormência (BINENBAUM; WEINSTAIN; SHANI, 2020). No cultivo *in vitro* ela pode ser usada na quebra de dormência de sementes (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020) e também para maturação de tecidos vegetais (MCKIM, 2019), incluindo a maturação e germinação de embriões somáticos (ILAH et al., 2016).

O ácido giberélico é uma giberelina e todas derivam de um composto denominado *ent-carueno* e sua rota biossintética se dá em três fases, como pode ser visto na Figura 4 (KERBAUY, 2019).

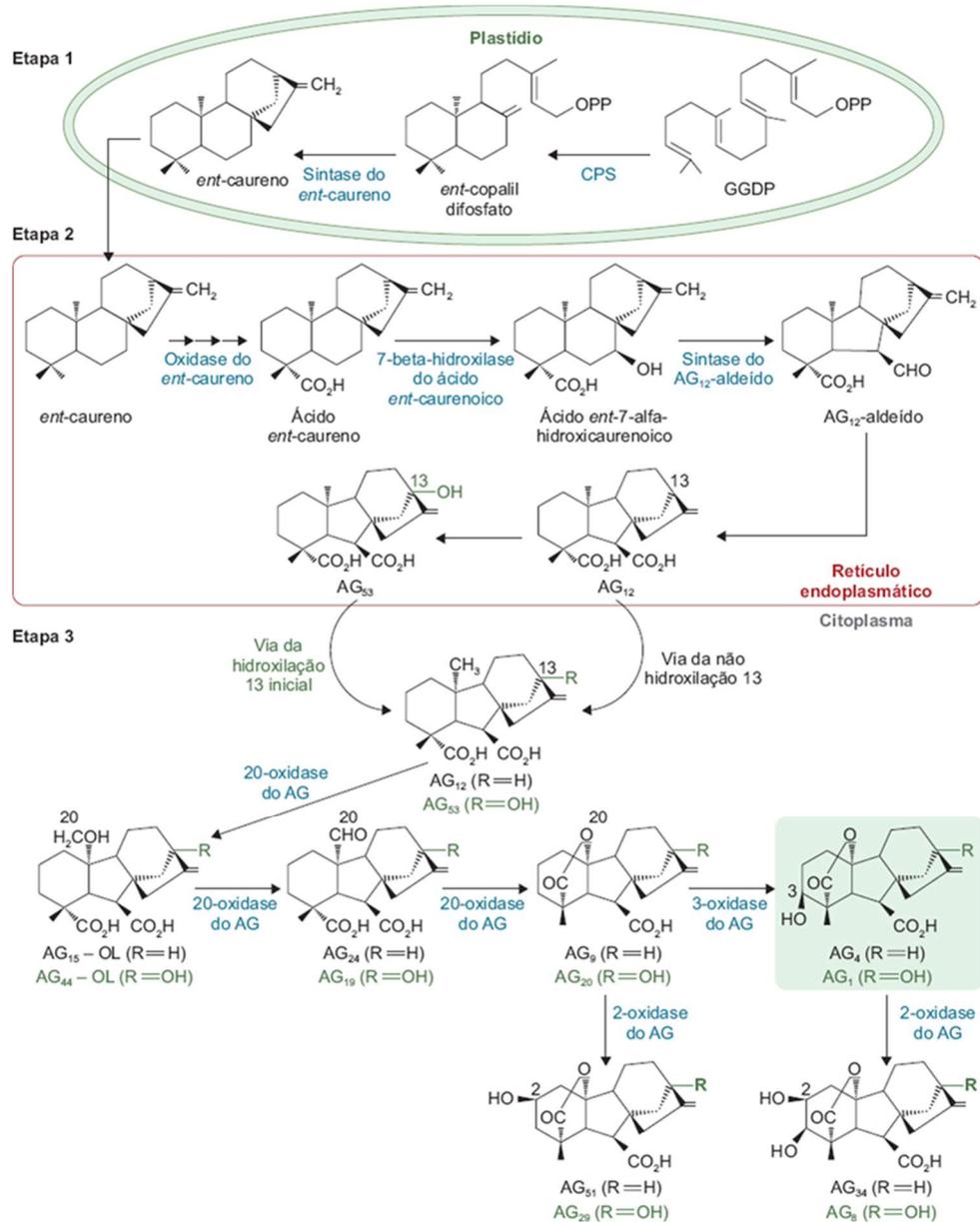


Figura 4. Principais passos da via biossintética de giberelinas nas plantas vasculares, mostrando a separação espacial das três etapas que ocorrem nos plastídios, no retículo endoplasmático e no citoplasma. As enzimas que catalisam as conversões ao longo da biossíntese de ácido giberélico (AG) estão indicadas em azul (CPS simboliza a síntese do ent-copalil difosfato) e as giberelinas bioativas estão ressaltadas no interior do quadro verde. A via da hidroxilação 13 inicial está apresentada em verde, e a via da não hidroxilação 13 em preto. Também é mostrado o papel metabólico da enzima 2-oxidase do AG no controle dos teores de giberelinas bioativas e de seus precursores imediatos.

Fonte de Kerbauy (2019, p. 225)

2.4 A hiperhidricidade no cultivo *in vitro*

A técnica de cultivar células, tecidos e órgãos de plantas *in vitro* é uma importante ferramenta para a propagação, a clonagem e estudos para melhor entendimento dos processos biológicos das plantas (RUFONNI; SAVONA, 2013). Contudo, a técnica precisa ser aprimorada para cada espécie, visto que a cultura de tecidos vegetais pode gerar anormalidades durante o desenvolvimento da planta (DEWIR et al., 2015). As anormalidades causam comprometimento anatômico e metabólico, prejudicando o crescimento e desenvolvimento vegetal (PADMANABHAN et al., 1998). Dentre os tipos de anormalidades podemos citar o meristema apical difuso e desorganizado (PADMANABHAN et al., 1998), a necrose nas regiões apicais de brotos, o desenvolvimento radicular anormal e ineficiente, fasciação do caule e a hiperhidricidade (RUFONNI; SAVONA, 2013).

A hiperhidricidade ou vitrificação é uma das principais anormalidades do cultivo *in vitro* vegetal e pode ser caracterizada principalmente pelo aspecto translúcido, friável, deformado e com excesso de água de um propágulo (ZIV, 1991; OLMOS; HELLIN, 1998; SOUNDARARAJAN et al., 2017). O termo vitrificação também é muito utilizado para os processos de transformação física do estado líquido para o sólido, muito utilizado na criopreservação de tecidos *in vitro*. Por isso, o termo utilizado neste estudo será o da hiperhidricidade, como sugerido por Deberg et al. (1992). Os efeitos da hiperhidricidade incluem o comprometimento de trocas gasosas, pela substituição de espaços aéreos das plantas por água, aumento considerável do estresse oxidativo (BAKIR et al., 2016), modificações fisiológicas, bioquímicas e até mesmo genéticas e epigenéticas (GAO; XIA; AN, 2022), além do comprometimento da parte aérea e radicular (DEWIR et al., 2018).

A hiperhidricidade ocorre geralmente devido ao ambiente propício fechado durante o cultivo que pode gerar anormalidades, malformações e disfunções morfológicas e fisiológicas (DEWIR et al., 2015). Além disso, reguladores de crescimento tendem a aumentar o estresse das plantas e, conseqüentemente, aumentar o processo de hiperhidricidade no cultivo *in vitro* (DEWIR et al., 2018; GEORGE, 1996). Durante a embriogênese somática, os explantes são submetidos a diversas condições de estresse e aplicação exógena de reguladores de crescimento, o que pode gerar estruturas hiperhídricas (MONSALUD, 1995).

Por isso, estudos sobre a reversão da hiperhidricidade vêm sendo feitos para solucionar os problemas da cultura de tecidos vegetal, e uma das formas é aplicação exógena de silício (MUNEER et al., 2017; SOUNDARARAJAN et al., 2017). Estes estudos, mostraram que o silício é capaz de reverter a condição anormal hiperhídrica e, por pela análise geral das proteínas diferencialmente expressas nos tratamentos com silício verificou-se que o nutriente

pode ter provocado esta recuperação do estado anormal da planta. Desta forma, as análises proteômica e transcriptômica podem auxiliar na descoberta dos mecanismos fisiológicos que levam a característica da hiperhidricidade e como revertê-la (LIU et al. 2017), fato sugerido neste trabalho.

2.5 Expressão gênica na hiperhidricidade e embriogênese somática

Para entender as respostas das plantas e as vias de sinalização de plantas, estudos estão utilizando a estratégia da expressão gênica diferencial para compressão de respostas das plantas a estímulos específicos (MARTINS et al., 2016). Por meio da técnica de análise de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), é possível quantificar de forma eficiente os transcritos específicos de amostras biológicas (VANHAUWAERT et al., 2014). Embora a análise de expressão gênica ofereça importantes informações acerca da condição estudada, ela não reflete a abundância das proteínas do indivíduo em questão (CHEN; HARMON, 2006). Os autores afirmam que existem controles de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais até a formação da proteína em sua forma ativa que podem ter funções biológicas diferentes dependendo do destino após as alterações no transcrito.

Poucos estudos se debruçaram acerca da expressão gênica relativa na hiperhidricidade no cultivo de tecidos vegetais *in vitro* (BAKIR et al., 2016; SREELEKSHMI; SIRIL; MUTHUFRISHNAN, 2022). Alguns genes e proteínas estão sendo estudados como possíveis influenciadores da anormalidade hiperhídrica, como a metilação de genes de aquaporina, transporte de etileno em *Arabidopsis* (GAO et al., 2022); proteínas ligadas ao combate do estresse oxidativo (MUNEER et al., 2017; SOUNDARARAJAN et al., 2017) e síntese dos precursores do etileno em *Dianthus chinensis* (SREELEKSHMI; SIRIL; MUTHUFRISHNAN, 2022).

Na literatura ainda não há relatos da expressão gênica envolvendo hiperhidricidade e embriogênese somática. Acerca da embriogênese somática, estudos buscam entender a competência embriogênica de espécies e buscar a indicadores de genótipos responsivos, como visto no trabalho com a palma de óleo de Santos e colaboradores (2018) e Ribeiro e colaboradores (2019). Nestes trabalhos citados anteriormente, identificou-se uma expressão diferencial em genes ligados ao metabolismo energético, resposta de defesa e resposta de estresse para competência embriogênica. A anatomia de calos não embriogênicos (células vacuoladas, espaços intercelulares e pouca densidade nuclear) (ALMEIDA et al., 2020) são

similares as características vistas em anatomia de tecidos vegetais hiperhídricos (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022).

Visto o exposto acima, a otimização das etapas de diferenciação e regeneração de embriões somáticos, além do entendimento da anormalidade da hiperhidricidade, pode melhorar a propagação da palma de óleo por meio da embriogênese somática para manutenção de características desejadas.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, H.; JOUANNIC, S.; ESCOUTE, J.; DUVAL, Y.; VERDEIL, J.; TREGGAR, J. W. Reproductive developmental complexity in the african oil palm (*Elaeis guineensis*, *Arecaceae*). **American Journal of Botany**, v.92, p.1836-1852, 2005.
- ADAM, H.; COLLIN, M.; RICHAUD, F.; BEULE, T.; CROS, D.; OMORE, A.; NODICHAO, L.; NOUY, B.; TREGGAR, J. W. Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1529-1537, 2011.
- ALMEIDA, R. F.; MEIRA, F. S.; GOMES H. T.; BALZON, T. A.; BARTOS, P. M. C.; MEIRA, R. O.; CUNHA; R. N. V.; LOPES, R. L.; METHA, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA J. E. Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. *Pisifera*) from immature leaf tissues. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 229-239, 2020.
- BABU, B. K.; MATHUR, R. K.; KUMAR, P. N.; RAMAJAYAM, D.; VENU, M. V. B.; BABU, S. S. Development, identification and validation of CAPS marker for SHELL trait which governs *dura*, *pisifera* and *tenera* fruit forms in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171933, 2017.
- BAKIR, Y.; ELDEM, V.; ZARARSIZ, G.; UNVER, T.. Global transcriptome analysis reveals differences in gene expression patterns between nonhyperhydric and hyperhydric peach leaves. **The plant genome**, v. 9, n. 2, p. plantgenome2015.09.0080, 2016.
- BALZON, T. A. **Aperfeiçoamento da embriogênese somática, reprodução e análise molecular de retrocruzamentos interespecíficos em palma de óleo (*Elaeis* spp.)**. 2017. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.
- BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 1, p. 41-50, 2013.

BARCELOS, E.; RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; MOTOIKE, S. Y.; BABIYCHUK, E.; SKIRYCH, A., KUSHNIR, S. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 190, 2015.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. Springer Science & Business Media, 2013.

BICALHO, E. M., PINTÓ-MARIJUAN, M., MORALES, M., MÜLLER, M., MUNNÉ-BOSCH, S., GARCIA, Q. S. Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance. **Plant Biology**, v. 17, n. 5, p. 990-996, 2015.

BINENBAUM, J.; WEINSTAIN, R.; SHANI, E. Gibberellin localization and transport in plants. **Trends in plant science**, v. 23, n. 5, p. 410-421, 2018.

BUDIMAN, L. F.; APRIYANTO, A.; PANCORO, A. D. I.; SUDARSONO, S. Genetic diversity analysis of *Tenera* × *Tenera* and *Tenera* × *Pisifera* Crosses and D self of oil palm (*Elaeis guineensis*) parental populations originating from Cameroon. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 20, n. 4, p. 937-949, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/biodiesel/programa-nacional-de-producao-e-uso-do-biodiesel-pnpb>. Acessado em 06 de Abril de 2022.

CADENA, T.; PRADA, F.; PEREA, A.; ROMERO, H. M. Lipase activity, mesocarp oil content, and iodine value in oil palm fruits of *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, and the interspecific hybrid O × G (*E. oleifera* × *E. guineensis*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 3, p. 674-680, 2013.

CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504-5516, 2006.

CORLEY, R.; TINKER, P. **The oil palm**. 5ª Edição. Chicester, Reino Unido: Wiley Blackwell. 2016.

COSTA, A. O.; OLIVEIRA, L. B.; LINS, M. P. E.; SILVA, A. C. M.; ARAUJO, M. S. M.; PEREIRA-JR, A. O.; ROSA, L. P. Sustainability analysis of biodiesel production: A review on different resources in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 407-412, 2013.

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

DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE J.; COHEN D.; GROUT B.; ARNOLD S. VON; ZIMMERMAN R.; ZIV M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant cell, Tissue and organ culture**, v. 30, n. 2, p. 135-140, 1992.

- DEWIR, Y. H.; EL-MAHROUK, M. E.; EL-BANNA, A. N. In vitro propagation and preliminary results of Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Cordyline fruticosa*. **South African Journal of Botany**, v. 98, p. 45-51, 2015.
- DEWIR, Y. H.; NURMANSYAH; NAIDOO, Y.; SILVA, J. A. T. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. **Plant cell reports**, v. 37, n. 11, p. 1451-1470, 2018.
- DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. A new phylogenetic classification of the palm family, *Arecaceae*. **Kew Bulletin**, p. 559-569, 2005.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the Nations. **Crops and livestock products: Oil palm fruit**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em 06 de Abril de 2022.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.
- FERREIRA, C. B. B.; LOPES, M. T. G.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MORERIA, D. A.; BARROS, W. S.; MATIELLO, R. R. Diversidade genética molecular de progênies de dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p. 378-384, 2012.
- GAO, H.; XIA, X.; AN, L. Critical roles of the activation of ethylene pathway genes mediated by DNA demethylation in Arabidopsis hyperhydricity. **The Plant Genome**, p. 1-16, 2022.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture. Part 2: in practice**. Exegetics limited, 1996.
- GHOSH, A.; IGAMBERDIEV, A. U.; DEBNATH, S. C. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
- GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 244-249, 2016.
- GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. 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**, v. 131, n. 2, p. 269-282, 2017.
- GONTIJO, T. S.; FERNANDES, E. A.; SARAIVA, M. B. Análise da volatilidade do retorno da commodity dendê: 1980-2008. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, p. 857-874, 2011.

- GUERRA, M.P.; PESCADOR, R.; DAL-VE스코, L. L.; NODARI, R. O.; DUCROQUET, J. P. In vitro morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: somatic embryogenesis and plant regeneration. **In: International Symposium on Myrtaceae 452**. 1997. p. 27-36.
- GULZAR, B. A. M.; MALIK; M. Q.; SAYEED, R.; MAMGAIN, J.; EJAZ, B. Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2020.
- GUO, H.; GUO, H.; ZHANG, L., TANG, Z., YU, X., WU, J., ZENG, F. Metabolome and transcriptome association analysis reveals dynamic regulation of purine metabolism and flavonoid synthesis in transdifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2070, 2019.
- HONG, J. Uncertainty propagation in life cycle assessment of biodiesel versus diesel: Global warming and non-renewable energy. **Bioresource Technology**, v.113, p.3-7, 2012.
- HORSTMAN, A.; LI, M.; HEIDMANN, I.; WEEMEN, M.; CHEN, B.; MUINO, J. M.; ANGENENT, G. C.; BOUTILIER, K. The BABY BOOM Transcription Factor Activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 Network to Induce Somatic Embryogenesis. **Plant Physiology**, v.175, n. 2, p. 848-857, 2017.
- IKEUCHI, M.; OGAWA, Y.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, v. 143, n. 9, p. 1442-1451, 2016.
- ILAH, A.; SYED, M.; REYAD, A. M.; MUJIB, A. Gibberellic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins (56, 34 and 26 KD) in somatic embryos of *Santalum album* L. **International Journal of Science and Research**, v. 5, p. 2263-2268, 2016.
- JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants**. Cham, Switzerland: Springer, 2018.
- JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; MURALI-MOHAN, N.; MANDAL, P. K. In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 256, 2015.
- KARNOVSKY, M. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol**, v. 27, p. 1A-149A, 1965.
- KERBAUY, G. B.: **Fisiologia vegetal**. 3. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
- KHATUN, R.; REZA, M. I. H.; MONIRUZZAMAN, M. YAAKOB, Z. Sustainable oil palm industry: The possibilities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 608-619, 2017.
- LELJAK-LEVANIĆ, D.; MIHALJEVIĆ, S.; BAUER, N. Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 7, p. 1-14, 2015.

- LIN, H.; MORCILLO, F.; DUSSERT, S.; TRANCHANT-DUBREUIL, C.; TREGGAR, J. W.; TRANBARGER, T. J. Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: evidence for conserved gene functions in early development. **Plant Molecular Biology**, v. 70, n. 1, p. 173-192, 2009.
- LIU, M.; JIANG, F.; KONG, X.; TIAN, J.; WU, Z.; WU, Z. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. **Scientia Horticulturae**, v. 217, p. 285-296, 2017.
- LOW, E. L.; ALIAS, H.; BOON, S.; SHARIFF, E. M.; TAN, C. A.; OOI, L. C. L.; CHEAH, S.; RAHA, A.; WAN, K.; SINGH, R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 62, 2008.
- LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 3, p. 485-496, 2014.
- MARTIN, J. J.; YARRA, R.; WEI, L.; CAO, H. Oil palm breeding in the modern era: Challenges and opportunities. **Plants**, v. 11, n. 11, p. 1395, 2022.
- MARTINS, C.; ANDRADE-JR, P. P. Produção de biodiesel no brasil: Estratégia de sustentabilidade social, econômica e ambiental. **Sustainable Business International Journal**, n. 40, p. 1-16, 2014.
- MARTINS, P. K.; MAFRA, V.; SOUZA, W. R.; RIBEIRO, A. P.; VINECKY, V.; BASSO, M. F.; CUNHA, B. A.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 28348, 2016.
- MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T. Structural changes in the micropylar region and overcoming dormancy in Cerrado palms seeds. **Trees**, v. 32, n. 5, p. 1415-1428, 2018.
- MCKIM, S. M. How plants grow up. **Journal of integrative plant biology**, v. 61, n. 3, p. 257-277, 2019.
- MONSALUD, M. J.; MATHEWS, H.; LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Control of hyperhydricity of mango somatic embryos. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 42, n. 2, p. 195-206, 1995.
- MONTEIRO, K. F. G.; HOMMA, A. K. O. Diferentes sistemas de produção com palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e a participação do Brasil no cenário internacional. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 200, p. 1-16, 2014.
- MUKHERJEE, I.; SOVACOOOL, B. K. Palm oil-based biofuels and sustainability in southeast Asia: A review of Indonesia, Malaysia, and Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, p. 1-12, 2014.

- MUNEER, S.; WEI, H.; PARK, Y. G.; JEONG, H. K.; JEONG, B. R. Proteomic analysis reveals the dynamic role of silicon in alleviation of hyperhydricity in carnation grown in vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 50, 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, 473-497, 1962.
- MUTSAERS, H. J. W. The challenge of the oil palm: using degraded land for its cultivation. **Outlook on Agriculture**, v. 48, n. 3, p. 190-197, 2019.
- OLMOS, E.; HELLÍN, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. **Scientia Horticulturae**, v. 75, n. 1-2, p. 91-101, 1998.
- OOSTERVEER, P. Promoting sustainable palm oil: viewed from a global networks and flows perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 107, p. 146-153, 2015.
- PADMANABHAN, K.; CANTLIFFE, D. J.; HARRELL, R. C.; MCCONNELL, D. B. A comparison of shoot-forming and non-shoot-forming somatic embryos of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] using computer vision and histological analyses. **Plant cell reports**, v. 17, n. 9, p. 685-692, 1998.
- POLIVANOVA, O. B.; BEDAREV, V. A. Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3313, 2022.
- RIBEIRO, D. G.; ALMEIDA, R. F.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; SOUSA, M. V.; RICARTO, C. A. O. R.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. **Journal of proteômica**, v. 192, p. 137-146, 2019.
- RIVERA, M. Y. D.; CAYÓN S.; D. G.; LÓPEZ, M. J. E. Physiological and morphological characterization of american oil palms (*Elaeis oleifera* HBK Cortes) and their hybrids (*Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*) on the Indupalma plantation. **Agronomía Colombiana**, v. 31, n. 3, p. 314-323, 2013.
- RUFFONI, B.; SAVONA, M. Physiological and biochemical analysis of growth abnormalities associated with plant tissue culture. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 54, n. 3, p. 191-205, 2013.
- SAIFUDDIN, M.; GOH, P. E.; HO, W. S.; MONERUZZAMAN, K. M.; FATIMA, A. Biodiesel production from waste cooking palm oil and environmental impact analysis. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v.20, p.186-192, 2014.
- SANTOS, I. R.; MAXIMIANO, M. R.; ALMEIDA, R. F.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; METHA, A. Genotype-dependent changes of gene expression during somatic embryogenesis in oil palm hybrids (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*). **Plos One**, v. 13, n. 12, p. e0209445, 2018.

- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; FERMINO, P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, n. 4, p. 378-395, 2010.
- SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020.
- SOUNDARARAJAN, P.; MANIVANNAN, A.; CHO, Y. S.; JEONG, B. R. Exogenous supplementation of silicon improved the recovery of hyperhydric shoots in *Dianthus caryophyllus* L. by stabilizing the physiology and protein expression. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 738, 2017.
- SREELEKSHMI, R.; SIRIL, E. A.; MUTHUKRISHNAN, S. Role of biogenic silver nanoparticles on hyperhydricity reversion in *Dianthus chinensis* L. an in vitro model culture. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-17, 2022.
- TREGEAR, J. W.; RIVAL, A.; PINTAUD, J. A family portrait: unravelling the complexities of palms. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p.1387-1389, 2011.
- VANHAUWAERT, S.; Expressed repeat elements improve RT-qPCR normalization across a wide range of zebrafish gene expression studies. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109091, 2014.
- VIJAY, V.; PIMM, S. L.; JENKINS, C. N.; SMITH, S. J. The Impacts of Oil Palm on Recent Deforestation and Biodiversity Loss. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159668, 2016.
- VONARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n. 3, p. 233-249, 2002.
- WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, n. 4, p. 443-462, 1986.
- ZANG, D.; SHI, P.; HTWE, Y. M.; LI, Z.; IHASE, L. O.; MASON, A. S.; SUN, X.; XIAO, Y.; WANG, Y. Caffeate may play an important role in the somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Industrial Crops & Products**, v. 174, p. 114143, 2021.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: **Micropropagation**. Springer, Dordrecht, 1991. p. 45-69.

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DAS FASES DE DIFERENCIAÇÃO E REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE PALMA DE ÓLEO COM A UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO

OTIMIZAÇÃO DAS FASES DE DIFERENCIAÇÃO E REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis spp.*) COM A UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO

RESUMO

A embriogênese somática é a principal técnica utilizada na clonagem de genótipos superiores de palma de óleo. Assim, o aprimoramento da embriogênese somática nesta espécie se torna necessário para baratear o processo e aumentar a oferta de mudas em razão da elevada procura. O objetivo deste trabalho foi otimizar as etapas de diferenciação de embriões somáticos e regeneração deles em plantas completas pela adição exógena de ácido giberélico (AG₃) ao meio de cultivo. Para tal, calos embriogênicos oriundos de explantes foliares foram transferidos para placas de petri contendo meio de cultura semissólido de Murashige e Skoog (MS) suplementado com sacarose 30 g/L, 1 g/L de caseína, 0,25 g/L de glutamina, asparagina, arginina e cisteína, além de 2,5 g/L de carvão ativado e três concentrações de AG₃ (0, 0,5 e 1,0 mg/L). Os calos ficaram por 210 dias no meio de diferenciação e foram analisados mensalmente. Uma vez germinadas, as plantas que apresentavam folhas foram transferidas para meio líquido com adição de duas concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (1,5 e 11 mg), visando completar o enraizamento. Por fim, realizou-se a análise de fidelidade genética das plantas obtidas por ISSR. Como resultado, observou-se que a maior concentração de AG₃ proporcionou maior diferenciação e germinação de embriões somáticos, com uma taxa de 86,2% de diferenciação. Acerca da germinação, o tratamento com 1 mg/L de AG₃ promoveu duas vezes mais germinação do que nos outros tratamentos. Porém, a utilização do regulador de crescimento na etapa de diferenciação proporcionou hiperhidricidade de alguns embriões somáticos. Com base nos resultados, observa-se que apesar de maior produção de embriões somáticos hiperhídricos, o tratamento com maior quantidade de AG₃ tem mais chances de produzir embriões normais do que embriões hiperhídricos. Os embriões germinados transplantados para os meios suplementados com maiores concentrações de AIB apresentaram maior taxa de enraizamento e apresentaram embriogênese somática secundária. Diante desses resultados, salienta-se a alta capacidade de produção de plantas clonais do híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* - B351733 mediante a suplementação do meio de cultivo com o AG₃ nas últimas etapas do processo.

Palavras-chave: Ácido giberélico, Embriogênese somática, Germinação, Hiperhidricidade.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por óleo no mundo é inegável e a procura por alternativas de energia renovável é importante, visto que o petróleo, forma de energia mais utilizada mundialmente, provém de uma fonte que não se renova (BYERLEE; FALCON; NAYLOR, 2017). Ao analisar o cenário, o Brasil criou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) em 2004 (BRASIL, 2019), expandindo sua influência na exportação de óleo, principalmente os oriundos de espécies vegetais (CASTRO, 2011).

A principal fonte de extração de óleo vegetal brasileiro é de cultivos de soja. Porém, a palma de óleo (*Elaeis* spp.), devido ao melhoramento genético, técnicas de cultivo e multiplicação de mudas, pode ocupar um lugar de destaque na exportação de óleo mundial (QAIM et al., 2020), uma vez que a palma de óleo é, atualmente, a planta com maior produtividade de óleo por área plantada (JAYANTHI et al., 2015).

Hodiernamente, estima-se que haja mais de 19 milhões de hectares de cultivo de palma de óleo com uma produção próxima a 81 milhões de toneladas (MURPHY et al., 2021). Além disso, Corley e Tinker (2016) afirmam que a estimativa de vida útil do dendezeiro é próxima dos 25 anos e, portanto, 4% das plantas precisam ser renovadas anualmente para manutenção da alta produtividade. Visto o potencial geográfico e climático do Brasil, a palma de óleo pode ser uma ótima alternativa ou complemento para soja, visto que as duas culturas não competem por espaço geográfico e as regiões mais propícias para plantação desta espécie são áreas da região norte e nordeste do Brasil (SANTOS et al., 2022).

A expansão comercial da palma de óleo contribuiu de forma significativa para o crescimento econômico de países do sudeste asiático, como a Indonésia e a Malásia, que represam mais de 80% de toda produção dessa planta (QAIM et al., 2020; MURPHY et al., 2021). Além disso, Byerlee, Falcon e Naylor (2017) estimam que cerca 50% da produção mundial de dendê provém de pequenos agricultores. Com isso, é possível diminuir as taxas de desemprego, gerar renda e demonstrar os efeitos positivos dessa *commodity* que por vezes é tratada como um vilão por conta da expansão desenfreada que ocorreu anos atrás (EDWARDS, 2019).

Apesar da alta eficácia na produção de óleo vegetal, a palma de óleo tem sua multiplicação vinculada à propagação via sementes. Os problemas relacionados à produção de mudas por sementes incluem a demora para o beneficiamento e quebra de dormência (CHANPRASERT et al., 2012), plantios desuniformes e alta heterozigosidade que pode gerar características não desejadas (BARCELOS et al., 2015), com dificuldades no manejo

(KONAN et al., 2010), fato agravado pelo longo ciclo reprodutivo da cultura que dificulta a seleção de genótipos superiores (CORLEY; TINKER, 2016; CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020).

Para reduzir os problemas mencionados acima, a produção clonal de mudas é uma alternativa viável, visto que encurta o tempo para obtenção de mudas com genes desejados, além de permitir a uniformização do plantio (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010). A única alternativa de clonagem para palmeiras como as do gênero *Elaeis* é a embriogênese somática, devido ao crescimento monocaule que as espécies apresentam, sendo praticamente impossível a propagação por brotos ou estaquia (KONAN et al., 2010; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; BARCELOS et al., 2015; GOMES et al., 2016; GOMES et al., 2017; ALMEIDA et al., 2020; ZANG et al., 2021). Zang e colaboradores (2021) mencionam que a principal etapa da embriogênese somática estudada é a indução de calos embriogênicos, pois é somente quando se obtém resultados consistentes nela é que os protocolos podem ser avaliados quanto a sua capacidade em produzir mudas. No entanto, parece evidente que a otimização das etapas de diferenciação e regeneração de embriões somáticos é de fundamental importância para diminuição dos custos da técnica e aumento na eficiência da produção de mudas.

Apesar de nas últimas etapas do processo embriogênico, a maioria dos estudos sugerirem a retirada de regulares de crescimento (BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; ALMEIDA et al., 2020), alguns estudos demonstram maior diferenciação e germinação de embriões somáticos com a introdução de fitormônios, dentre eles o ácido giberélico (GUERRA et al., 1997; SILVA et al., 2018).

As giberelinas são hormônios conhecidos pelo auxílio na germinação de sementes e alongamento do nó e entrenó (BINENBAUM; WEINSTAIN; SHANI, 2020). Para o dendezeiro, Cui, Lamade e Tcherkez (2020) reportam que as giberelinas têm um papel importante na quebra da dormência das sementes ao inibir o ácido abscísico. Assim, ao analisar como o embrião zigótico é influenciado pelos hormônios nas sementes, pode-se fazer um paralelo para utilizar reguladores de crescimento para otimizar as etapas do processo de embriogênese somática.

Na embriogênese somática, o uso de AG₃ é pouco estudado até o momento. Dentre eles, o estudo de Ghosh, Igamberdiev e Debnath (2018) demonstrou que o uso do AG₃ induziu uma maior maturação de embriões somáticos em um híbrido de mirtilo. Ao analisar o processo em palmeiras da família Arecaceae, o AG₃ promoveu 4x mais formação de calos em *Cocos nucifera* (L.) (MONTERO-CÓRTEZ et al., 2010). Porém, o papel do AG₃ nas etapas da

embriogênese somática ainda não está claro, pois em alguns estudos são utilizadas para maturação (GHOSH; IGAMBERDIEV; DEBNATH, 2018), outros para induzir a formação de calos (HITA; LAFARGA; GUERRA, 1997; RUDUŚ; KĘPCZYŃSKA; KĘPCZYŃSKI, 2002; MONTERO-CÓRTEZ et al., 2010) e o AG₃ pode até mesmo inibir a embriogênese somática (BEN-ALI et al., 2023). Ao analisar a literatura acerca do uso do AG₃ no processo de embriogênese somática, percebe-se que o regulador causa diferentes efeitos em determinada espécie. Portanto, faz-se necessário entender os efeitos do AG₃ nas etapas de diferenciação de calos embriogênicos de palma de óleo.

Visto o exposto acima, o objetivo deste capítulo foi otimizar as etapas de diferenciação de embriões somáticos e regeneração deles em plantas completas de palma de óleo pela adição exógena de ácido giberélico (AG₃) ao meio de cultivo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos e origem do material vegetal

As atividades foram realizadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), no Laboratório de Cultura de Tecidos II, localizado em Brasília – Distrito Federal (DF). O material vegetal utilizado nos experimentos foi obtido do híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) adulto B-351733, coletado no Campo Experimental do Rio Urubu, localizado no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, e pertencente ao Programa de Melhoramento Genético da Palma de Óleo da Embrapa Amazônia Ocidental.

2.2 Indução de calos e multiplicação dos calos embriogênicos

A embriogênese somática para obtenção de clones do híbrido interespecífico B-351733 (*Elaeis oleifera* × *E. guineensis*) foi realizada a partir de tecidos foliares imaturos (palmitos) que já estavam em meio de cultura semissólido desde 2016. A metodologia foi dividida em seis fases: indução de calos, multiplicação de calos, diferenciação de embriões somáticos, regeneração de plantas (germinação), enraizamento e aclimatização.

A indução de calos e multiplicação foi realizada de acordo com protocolo descrito por Balzon et al. (2013). Os calos embriogênicos foram induzidos a partir de explantes foliares que após desinfestação foram inoculados em placas de Petri (15 x 90 mm) preenchidas com meio de cultura semissólido de Murashige e Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose e 450 µM de Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram), além de 2,5 g/L de carvão ativado. Neste meio, os explantes permaneceram por

até 180 dias, quando então, calos primários foram obtidos. Para a multiplicação, os calos foram colocados em meio de cultura semissólido de MS, suplementado com 30 g/L de sacarose, 5 μ M de Picloram e 20 μ M de 2-isopenteniladenina (2iP) e 2,5 g/L de carvão ativado, por 90 dias.

2.3 Diferenciação de embriões somáticos e regeneração de plantas

Para a etapa de diferenciação e germinação dos embriões somáticos, os calos foram colocados para se desenvolver em três diferentes tratamentos, utilizando-se como meio básico aquele formado pelo meio semissólido de MS com metade da força ($\frac{1}{2}$ MS), suplementado com 30 g/L de sacarose, 1 g/L de caseína, 0,25 g/L de glutamina, asparagina, arginina e cisteína, além de 2,5 g/L de carvão ativado. A este meio de cultura, avaliou-se o ácido giberélico (AG₃), nas concentrações de 0; 0,5 e 1,0 mg/L. Cada tratamento foi composto por 30 placas de petri contendo sete calos distribuídos aleatoriamente pela placa.

2.3.1 Análise estatística dos dados obtidos

A análise estatística deste experimento foi estabelecida visando avaliar a diferenciação de embriões somáticos dos calos embriogênicos com base nos três tratamentos: (1) 0 mg/L de AG₃ (controle); (2) 0,5 mg/L de AG₃ e (3) 1,0 mg/L de AG₃. Para cada tratamento foram selecionados inicialmente $n = 210$ calos embriogênicos que foram avaliados mensalmente durante 7 meses quanto a formação de novos calos embriogênicos (contagem), embriões somáticos normais (%), e embriões somáticos germinados (%). Além destes, também se detectou a ocorrência de anormalidades durante o processo, a partir da formação de embriões somáticos hiperhídricos, os quais também foram avaliados e contabilizados.

A variável resposta utilizada para avaliar a diferenciação dos embriões somáticos foi a dicotômica $Y = \text{diferenciou/não diferenciou}$ e a (possível) variável explicativa (fator) a $T = \text{tratamento}$ (três tratamentos: 0; 0,5 e 1,0 mg/L de AG₃). Como a variável resposta pode apresentar apenas um entre dois possíveis valores (ou *diferenciou* ou *não diferenciou*), o modelo de dados recomendado para avaliar este tipo de resposta foi o modelo GLM de família binomial, popularmente conhecido por modelo de regressão logística.

Ressalta-se que os novos calos embriogênicos que se formaram durante os sete meses de observação foram considerados como acréscimo aos $n = 210$ calos de cada um dos tratamentos utilizados. Assim, ao final de sete meses de execução do experimento, 42 novos calos embriogênicos surgiram dos calos de tratamento 0 mg/L de AG₃ (controle), 56 novos

calos surgiram dos calos de tratamento 0,5 mg/L de AG₃ e 161 novos calos surgiram dos calos de tratamento 1,0 mg/L de AG₃. Portanto, para efeitos de avaliação de diferenciação dos calos embriogênicos em embriões somáticos normais, hiperhídricos e germinados foi considerada a amostra de $n_0 = 252$, $n_{0,5} = 266$ e $n_{1,0} = 371$ calos embriogênicos, respectivamente.

Visto que anormalidades foram observadas durante o experimento, no caso a hiperhidricidade, o total de embriões somáticos diferenciados nos três tratamentos foi avaliado, levando-se em consideração que de um calo foi possível se diferenciarem embriões somáticos normais, embriões somáticos em início de germinação, além de embriões hiperhídricos. Interessantemente, de acordo com o observado, embriões somáticos que se diferenciaram em embrião somático normal e àqueles em início de germinação, apresentaram-se imutáveis, ou seja, não mais apresentaram anormalidades ao longo do processo. Já para aqueles embriões somáticos que se diferenciaram com aspectos hiperhídricos, verificou-se que eles poderiam mudar seu estado, podendo, portanto, retornar ao estado de um embrião somático normal ou então em início de germinação.

Assim, a análise estatística empregada para com o total de embriões somáticos diferenciados nos três tratamentos testados (0; 0,5 e 1,0 AG₃ mg/L) foi avaliar o tipo de diferenciação ocorrido que, conforme citado, apresentaram três possibilidades: embrião somático normal (Nn), embrião somático em início de germinação (G), e embrião somático hiperhídrico (Hh). Neste caso a variável resposta do experimento foi considerada de natureza nominal, apresentando três níveis (H, N e G). A análise estatística recomendada e utilizada para este caso foi a regressão logística multinomial.

No caso de regressão logística binomial a variável resposta, que apresenta natureza nominal, apresentou apenas dois níveis, genericamente designados por “sucesso” e “fracasso” e a avaliação dos resultados se deu pela avaliação da razão de chance (*odds ratio*). Como a variável resposta é de natureza multinomial (possui mais de dois níveis, no caso do experimento em questão apresenta três níveis), a forma de avaliação dos resultados foi feita por meio da avaliação da razão de risco relativo (*relative risk ratio* – RRR), de acordo com Hilbe (2009).

Na regressão logística multinomial um nível é escolhido para ser o nível de base de comparação. No caso do experimento, desejou-se realizar a comparação de embriões somáticos normais e em início de germinação em relação aos embriões somáticos hiperhídricos, pois estes últimos não são de interesse como resultado final do processo

biológico analisado. Assim, o nível de referência básico (*baseline*) foram os embriões somáticos hiperhídricos (Hh).

Nesta etapa do trabalho, a análise estatística do conjunto de dados obtidos e a montagem dos gráficos foi realizada utilizando-se o programa R.

2.4 Otimização do enraizamento e aclimatização das plantas regeneradas

Para otimizar o enraizamento e complementar o crescimento radicular das plantas, os embriões somáticos que apresentaram início de germinação em meio com as diferentes concentrações de AG₃ (com emissão de parte aérea) foram colocados em frascos de vidro (250 mL de capacidade) contendo 35 mL de meio líquido. Este meio de cultura foi formado por ½MS, suplementado com 30 g/L de sacarose, 1,0 g/L de caseína hidrolizada, 0,25 g/L de glutamina, asparagina, arginina e cisteína, além de 1,0 g/L polivinilpolipirrolidona (PVP). A este meio de cultura de enraizamento avaliou-se ainda duas concentrações de ácido indolbutírico (AIB): 1,5 e 11 mg/L, no qual a maior concentração foi utilizada referente ao trabalho de Gomes e colaboradores (2016). Para tal, no primeiro mês de avaliação (janeiro) foram alocadas n₁ = 75 embriões a 11 mg/mL e n₂ = 80 embriões a 1,5 mg/mL.

Ao final de 12 meses e 12 subcultivos em meio de enraizamento, as plantas foram avaliadas mensalmente por meio de um GLM binomial. Foram então analisadas as razões de chance (*odds ratio*) entre os pares de tratamento para verificar a chance de enraizamento de cada tratamento em que as plantas foram submetidas. Com os dados obtidos acima, também foi realizada a avaliação do tempo médio de enraizamento das plantas tratadas com 1,5 e 11 mg/L de AIB. A análise comparativa entre os tratamentos foi feita usando-se o teste *t* com correção de Welch, onde se considera eventual heterocedasticidade entre os dois grupos de tratamento

Todos os meios de cultura semisólidos utilizados na pesquisa foram adicionados de 2,5 g/L⁻¹ de Phytigel (Sigma®) e o pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1, antes da adição do gelificante. A esterilização dos meios foi realizada por autoclavagem à 121 °C durante 20 min. Para diferenciação e regeneração de embriões somáticos, as placas foram colocadas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 100 μmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas LED (Philips® - Green Power 20W 60Hz).

2.5. Aclimatização das plantas

Para aclimatização, plantas com 8 a 10 cm de altura e com sistema radicular bem desenvolvido (2 a 3 cm de comprimento) tiveram suas raízes lavadas em água corrente e

imediatamente transferidas para copos plásticos (300 mL de capacidade) contendo uma mistura de substrato comercial (Plantmax®) e areia (3:1 v/v), sob condições de câmara de crescimento tipo B.O.B (Percival I-30) à 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Uma vez transplantadas, nas duas semanas iniciais, as plantas foram cobertas com outro copo plástico transparente para manutenção da umidade. A irrigação foi realizada a cada três dias e, após, 30 a 40 dias, as plantas foram transferidas para casa de vegetação para completarem o desenvolvimento.

2.6. Análise de fidelidade genética por ISSR

Para avaliar a fidelidade genética dos clones produzidos, 30 indivíduos do melhor tratamento de diferenciação e germinação foram aleatoriamente selecionados para as análises. Amostras de folhas de plantas regeneradas *in vitro* foram coletadas e submetidas ao processo de extração de DNA. Para tal fim, utilizou-se 700 μL de tampão CTAB 2% à 65°C, com uma concentração de 2 μL de 2-mercaptoetanol por mL, que foram trituradas em *TissueLyser* por 1 minutos (frequência de 30/s). As amostras foram incubadas em banho-maria, à 65°C por 1 hora e agitadas a cada 10 minutos. Após o banho-maria, as amostras descansaram em temperatura ambiente por cinco minutos. Na capela de exaustão foram introduzidos 600 μL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1), homogeneizados e levados para centrífuga por 15 minutos a 12.000 RPMs. Retirou-se o sobrenadante para outro tubo e foram adicionados 400 μL de isopropanol gelado e armazenados à -20°C por 1 hora, com agitação a cada 15 minutos. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas por mais 15 minutos a 12000 RPM e retirada a parte aquosa, deixando apenas o *pellet*. Acrescentou-se 500 μL de etanol 70% gelado para desprender os *pellets* com nova centrifugação por 5 minutos. Esse processo foi repetido por mais duas vezes com a utilização de etanol 100%. Os tubos foram então deixados para secar por 12 horas. Em seguida, os pellets foram ressuspensos em 100 μL tampão TE contendo RNase (com 1 μl de RNase para cada 1ml de tampão). Após ressuspender, as amostras foram agitadas por 30 segundos e incubadas em estufa, a 37°C, por uma hora.

Terminado o processo de extração, foi realizada uma análise de integridade em eletroforese em um gel de agarose 1%, com marcadores de 3,10,20 e 50 ng/ μL de DNA Lambda. Caso íntegro, as amostras foram quantificadas em equipamento NanoDrop. Após a quantificação, para melhor análise molecular, foi feita uma diluição nos tubos para todos

ficarem com 3ng/ μL de DNA. A análise foi realizada por marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), de acordo com Gomes (2016).

Para tanto, 28 *primers* foram selecionados de Gomes (2016) (Sigma-Aldrich®). Posteriormente, as reações de ISSR foram realizadas por meio de uma solução com: 2,84 μL de água ultra pura, 1,3 μL de tampão IB 10X, 1,3 μL de BSA (2,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1,3 μL de dNTPs (2,5 mM), 0,26 μL de Taq DNA polimerase (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 3 μL de *primer* (1,2 mM) e 3 μL de DNA genômico (3 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). A etapa de amplificação foi realizada por PCR em termocicladores Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®), com temperatura à 94°C por cinco minutos, com intuito de desnaturação da dupla hélice do DNA; seguido de 35 ciclos de 45 segundos à 94°C para desnaturação proteica; mais 45 segundos à 56°C para anelamento dos *primers* e mais um minuto à 72°C para que a síntese da cadeia complementar pela DNA polimerase. Além disso, mais sete minutos foram acrescidos à temperatura de 72°C para maior extensão das diversas cadeias complementares.

Os fragmentos obtidos e amplificados por meio da PCR foram separados por eletroforese horizontal em gel 2D de agarose à 1,5% com acréscimo de brometo de etídio para visualização das bandas em luz ultravioleta. Em outros poços foi pipetada uma amostra sem DNA para controle negativo e uma amostra padrão de DNA 1Kb “ladder” (Invitrogen®), com fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos. Os géis obtidos foram fotodocumentados com sistema eletrônico de captura de fotos.

Para análise dos marcadores ISSR, cada banda visualizada foi considerada como um *locus* de DNA. Para avaliação, a presença de banda foi caracterizada como “1” e a ausência de fragmento no *locus* como “0”. Com esses dados foram estimados os níveis de alteração genômica consequentes dos tratamentos aplicados para diferenciação e germinação de embriões somáticos. Para tal, foi dividido o número de mutações observadas (fragmentos polimórficos) pelo número total de fragmentos amplificados. Para conceituação de mutação no estudo, um fragmento de DNA foi considerado polimórfico quando presente em um dos clones e ausente nos demais, ou quando ausente em um clone e presente nos demais. Os dados obtidos de presença e ausência foram avaliados no programa NYSYT para produção de uma árvore de similaridade e calculado o bootstrap pelo programa Bood.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização do protocolo de embriogênese somática

Os calos oriundos das folhas jovens surgiram após 180 dias de em meio de cultura com Picloram. A emissão de massas celulares embriogênicas ocorreu principalmente na região central do explante, com aspecto globular e coloração bege-amarronzada (Figura 1A). Notou-se também formação de calos embriogênicos com formato alongado próximos das extremidades da folha imatura (Figura 1B).

O aspecto morfológico dos calos é bastante similar ao visto em Almeida et al. (2020), alongados ou globulares, com moderada oxidação do explante (folha imatura). Em alguns estudos, nota-se os efeitos negativos da oxidação na embriogênese somática, prejudicando a formação de calos (KLUBICOVÁ et al., 2017; YANG et al., 2018; LIU et al., 2020). Entretanto, em palmeiras os dois aspectos podem ser vistos, no qual a oxidação foi positiva como no caso de *Euterpe precatoria* (Mart.) (FERREIRA et al., 2022) e *Elaeis guineensis* (SILVA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2020), e efeitos negativos em *Arenga pinnata* (AWAL; MUDA, 2017) e *Calamus thwaitesii* (HEMANTHAKUMAR et al., 2019).

Para elucidar o efeito da oxidação, Ribeiro e colaboradores (2019) identificaram que um balanço de proteínas contra o estresse oxidativo é necessário para garantir o sucesso dos genótipos responsivo na fase de indução, visto que oxidação em excesso pode causar danos aos tecidos foliares, porém ela pode ter um efeito positivo na calogênese. Por isso, altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) são problemáticas, porém, em concentrações apropriadas, eles podem atuar como moléculas sinalizadoras para regulação do desenvolvimento da planta sob estresse (MITTLER et al., 2011). As ROS's podem ser mediadas via hormonal durante o desenvolvimento da planta (BARTOLI et al., 2013), e este processo pode ter acontecido visto que as auxinas são utilizadas para indução da embriogênese somática contribuem para a reprogramação celular (MENDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). Dentre as formas de regulação que as ROS's podem fazer na célula, destaca-se a capacidade no ciclo celular das plantas, importante para o processo de multiplicação celular (FEHÉR et al., 2008; ZHOU et al., 2016). Num estudo feito para verificar o papel de enzimas antioxidantes e eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS), a superexpressão destas proteínas causaram uma diminuição na formação de calos embriogênico em *Hevea brasiliensis* (MARTIN et al., 2018).

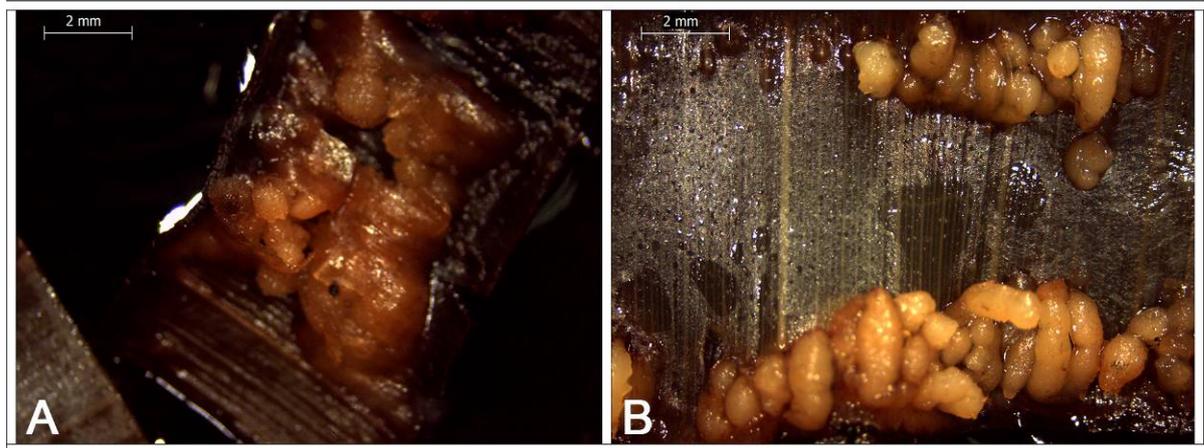


Figura 1. Formação de calos em folhas jovens imaturas do híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) após 180 dias em meio de MS suplementado com 450 µM de Picloram. A. – Surgimento de calos na região central com aparência globular. B. Surgimento de calos alongados nas extremidades do explante.

Acerca das análises de diferenciação de embriões somáticos pela introdução dos calos em meio de cultivo suplementado com AG₃, percebeu-se maior percentagem de diferenciação de embriões somáticos no tratamento com maior concentração do regulador. Como verificado na Tabela 1, o total de embriões somáticos diferenciados contabilizados nos tratamentos de 0, 0,5 e 1,0 mg/L de AG₃ foi de 105, 168 e 320, respectivamente. Assim, a adição de 1 mg/L de AG₃ proporcionou a maior taxa de diferenciação de embriões somáticos, após sete meses de cultivo (86,2%), em relação aos demais tratamentos.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃) sobre o percentual de diferenciação de embriões somáticos, a partir de calos embriogênicos de palma de óleo (híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* - B351733), após sete meses de cultivo.

AG ₃ (mg/L)	Total de calos avaliados	Total de calos com embriões somáticos diferenciados	% de diferenciação
0	252	105	41,7
0,5	266	168	63,2
1,0	371	320	86,2

Devido à presença do ácido giberélico, a multiplicação de calos não cessou, e após 210 dias, o tratamento controle apresentou um número inferior de embriões somáticos por calo do que o tratamento suplementado com 1,0 mg/L de AG₃. Almeida, Oliveira e Dantas (2000) demonstraram que a utilização de AG₃ na etapa de maturação produziu mais plantas em detrimento da formação de novos calos em mamoeiro.

Os reguladores de crescimento, em especial as auxinas, são fatores essenciais para promoção da embriogênese somática dado o seu efeito estressor, participando da reprogramação gênica que induz a formação de calos (MENDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). A maioria dos protocolos de embriogênese somática para palma de óleo sugerem retirada dos reguladores de crescimento do meio de cultura para a diferenciação dos calos em embriões somáticos, em especial a auxina indutora (BALZON et al., 2013; ALMEIDA et al., 2020). Porém, nesse trabalho, como observado na Tabela 1, o AG₃ proporcionou maior diferenciação de embriões somáticos. Vale ressaltar que, na literatura, a utilização de giberelinas no trabalho de Huh, Lee e Nam (2017) no qual a combinação de AG₃ e BAP produziram plantas mais vigorosas do que em tratamentos sem a giberelina em *Passiflora edulis*. Em razão dos resultados obtidos foram então analisadas as razões de chance (*odds ratio*) entre os pares de tratamento (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2. Razão de chance (*odds ratio*) de diferenciação de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos de palma de óleo (híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* - B351733) entre os pares de tratamentos nas três concentrações de AG₃ (0, 0,5 e 1,0 mg/L) avaliadas

Tratamentos comparados (AG ₃)	IC 95%		
	Razão de chance	Razão de chance Limite Inferior	Razão de chance Limite Superior
0,5 mg : 0 mg	2,4000	1,5738	3,6599
1,0 mg : 0 mg	8,7843	5,5304	13,9527
1,0 mg : 0,5 mg	3,6601	2,3067	5,8078

Os tratamentos são estatisticamente ‘diferentes’ entre si se o IC 95% não contiver o valor unitário (quando o valor entre os limites inferiores e superiores passaram pelo número 1). Se o IC 95% contiver o valor unitário, então significa dizer que as chances de diferenciação de ambos podem ser iguais.

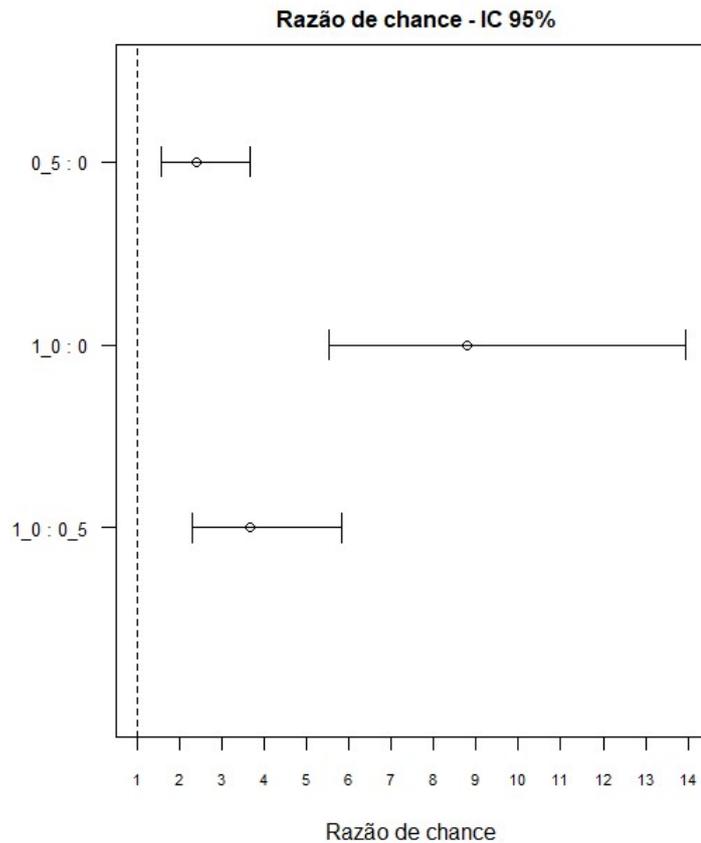


Figura 2. Razões de chance (*odds ratio* – OR) e intervalos de confiança de 95% calculadas para diferenciação de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos de palma de óleo (híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* - B351733) com diferentes concentrações de AG₃ (0, 0,5 e 1,0 mg).

Em razão de não ter sido observado valores unitários para os dados da Tabela 2, considera-se que os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Assim, com base na amostra avaliada, a mesma apresentou evidência de que um calo embriogênico em meio com 1,0 mg/L de AG₃ tem 8,78 vezes mais chances de diferenciar embriões somáticos se comparado a um calo embriogênico do tratamento controle (0 mg/L de AG₃), com 95% de confiança que esta razão possa ser entre 5,53 e 13,95 vezes superior. Já na comparação entre o tratamento com 0,5 mg/L de AG₃, existe uma chance de 2,4 vezes mais embriões somáticos diferenciados quando comparado ao grupo controle, com 95% de confiança que esta razão possa ser entre 1,57 e 3,66 vezes. Portanto, entre os grupos de calos em meio de diferenciação com concentrações de AG₃, o que possuía a concentração maior deste regulador de crescimento apresenta 3,66 vezes mais chances de diferenciar embriões

somáticos, com um intervalo de confiança de 95% que esta razão pode estar entre 2,31 e 5,81 vezes mais.

Embora a influência das giberelinas não esteja bem definida nas etapas da embriogênese somática, nos embriões zigóticos, ele é crítico para o desenvolvimento inicial do embrião. Isso ocorre devido ao potencial de ativação de genes que promovem síntese proteica de enzimas e que digerem a camada de aleurona e facilitam o crescimento e desenvolvimento de embrião, permitindo, assim, a profusão da radícula e a germinação (BEWLEY et al., 2013). Ademais, Binenbaum, Weinstain e Shani (2020), afirmam que o AG₃ tem um papel fundamental na germinação por ir para camada de aleurona (local onde tem reservas) para ativar enzimas hidrolíticas para nutrição do embrião. Porém, o embrião somático não apresenta todas as estruturas da semente, tendo um germinação diferente da zigótica. Em um trabalho com videira (*V. vinifera* Pinot noir), foi visto que o AG₃ promoveu uma melhora na quebra da endodormência vista em embriões somáticos desta espécie (LARROUY; JAKSONS; BICKNELL, 2017). Porém, não existem trabalho que falem sobre este tipo de dormência em embriões somáticos de palma de óleo. Portanto, o efeito de maturação de tecidos vegetais das giberelinas por meio do alongamento e divisão celular que este fitormônio promove em células meristemáticas (MCKIM, 2019) pode ter auxiliando em uma diferenciação, maturação e melhor germinação dos embriões somáticos, como visto em trabalhos com *Santalum album* L (ILAH et al., 2016) e *Byrsonima intermedia* A. Juss (SILVA et al., 2018).

Para o cultivo *in vitro*, Montero-Córtes e colaboradores (2010) descrevem que a suplementação do meio com AG₃ aumentou a produção de calos e formação de embriões em coco, ativando enzimas capazes de hidrolisar os compostos presentes no meio de cultivo. Ao analisar o cenário na embriogênese somática na etapa indutória, o papel do AG₃ não está claro, visto que em alguns trabalhos a embriogênese somática é inibida na presença deste composto (FUJIMURA; KOMAMINE, 1975; KOCHBA et al., 1978; HUTCHINSON; KRISHNARAJ; SAXENA, 1997; TOKUJI; KURIYAMA, 2003; BEN ALI et al., 2022), e em outro ela é estimulada (HITA; LAFARGA; GUERRA, 1997; RUDUŚ; KĘPCZYŃSKA; KĘPCZYŃSKI, 2002). O presente estudo, tem semelhanças com o trabalho de Das, Rout e Das (1995), no qual o AG₃ combinado com aminoácidos aumentou a diferenciação de calos em embriões somáticos.

Na Figura 3 é possível observar as etapas do desenvolvimento da embriogênese somática deste trabalho, incluindo desde a introdução dos explantes foliares imaturos no meio

de indução de calos (Fig. 3A) até a aclimatização de uma planta clonada em casa de vegetação (Fig. 3L). A otimização do protocolo de embriogênese somática é importante devido ao alto custo que esta técnica exige para geração de mudas, seja pela necessidade de mão de obra especializada, quanto pelo alto gasto de compostos (ZANG et al., 2021).

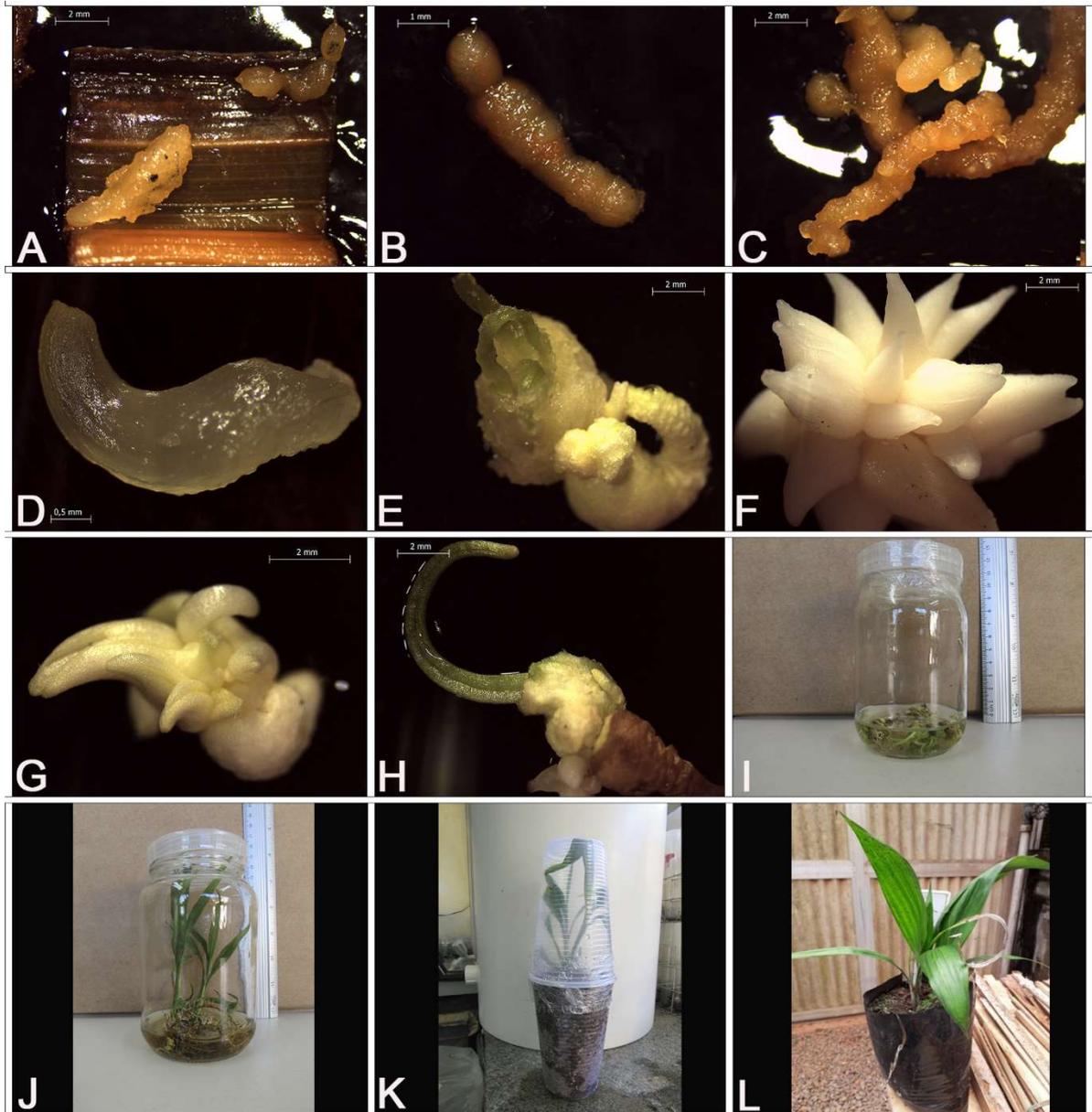


Figura 3. Etapas do processo de embriogênese somática em folhas jovens imaturas do híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) até a aclimatização. A - Surgimento de calos embriogênicos após 180 dias em meio suplementado com Picloram. B – Calo introduzidos em meio de multiplicação de MS suplementado com Picloram e 2iP. C - Calos após 90 dias no meio de multiplicação. D - Embrião somático hiperhídrico meio de MS com AG₃ após 210 dias. E – Germinação de embrião somático hiperhídrico em meio de MS com AG₃ após 210 dias. F – Agrupamento (cluster) com vários embriões somáticos normais em meio de MS com AG₃ após 210 dias. G – Embrião somático normal em meio de MS com AG₃ após 210 dias. H – Germinação de embrião somático normal em meio de MS com AG₃

após 210 dias. I – Planta em meio de MS líquido com AIB para crescimento da parte aérea e radicular. J – Plantas após seis meses em meio líquido com AIB. K – Planta aclimatizada. L – Planta clonada de palma de óleo transplantada para casa de vegetação.

Durante o processo de diferenciação de embriões somáticos, verificou-se a ocorrência da anormalidade conhecida como hiperhidricidade, que pode ser observado na Figura 3E. Em razão destes embriões somáticos poderem mudar seu estado de hiperídrico para normal, foi calculada a Razão de Risco Relativo (RRR) do evento ocorrer (Tabela 3).

Tabela 3. Razão de Risco Relativo para verificar a probabilidade de um embrião somático do híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) se tornar hiperídrico ou não (embrião normal ou em início de germinação) nos em diferentes concentrações de AG₃

	AG ₃ (mg/L)					
	0,0		0,5		1,0	
	Normal/ Hiperídrico	Germinado/ Hiperídrico	Normal/ Hiperídrico	Germinado/ Hiperídrico	Normal/ Hiperídrico	Germinado/ Hiperídrico
RRR	0.581	0.327	0.957	1.076	1.141	2.554
IC 95%	0.376 e 0.899	0.192 e 0.557	0.547 e 1.672	0.549 e 2.106	0.682 e 1.909	1.414 e 4.612

A razão de risco relativo (RRR) observado de o calo tratado a 0 mg/L de AG₃ (controle) resultar em embrião somático normal em relação ao hiperídrico foi de 0,581. Isto significa dizer que a probabilidade de a 0 mg/L de AG₃ um embrião somático ser normal é de 42% ($1 - 0,58 = 0,42 = 42\%$) menor que a probabilidade deste mesmo embrião somático ser hiperídrico. Para este resultado, o intervalo de confiança de 95% varia entre 0,376 e 0,899. Ou seja, temos 95% de confiança que pode até ser que esta probabilidade seja 63% menor ou mesmo 10% menor que a probabilidade deste embrião somático ser hiperídrico.

A RRR do calo tratado com 0 mg/L de AG₃ (controle) resultar em embrião somático germinado em relação ao hiperídrico foi de 0,327, isto é, com probabilidade 67% menor deles virarem embriões hiperídricos. O intervalo de confiança de confiança neste caso variou entre 0,192 e 0,557, ou seja, com probabilidade entre de 81% e 44% menor que a probabilidade deste calo originar embriões somáticos hiperídricos.

Já a razão de risco relativo (RRR) de o calo tratado com 0,5 mg/L de AG₃ diferenciar embriões somáticos normais em relação aos hiperídricos foi de 0,957. Assim, a probabilidade

de 0,5 mg/L de AG₃ proporcionar embriões somáticos normais foi de 4%, com o intervalo de confiança de 95% variando entre 0,547 e 1,672, ou seja, com 95% de confiança que esta probabilidade possa ser 45% menor ou mesmo 67% maior deste calo originar embriões somáticos hiperhídricos. Nesta mesma concentração, a RRR de um calo tratado com 0,5 mg/L de AG₃ (controle) resultar em embrião somático germinado em relação a um hiperhídrico foi de 1,076, ou seja, de 8% maior que a probabilidade deste mesmo calo originar embriões hiperhídricos. O intervalo de confiança de 95% neste caso variou entre 0,549 e 2,106, com 45% menor ou 211% maior (ou 2,11 vezes maior) que a probabilidade deste calo originar embriões somáticos hiperhídricos.

Por fim, a RRR de um calo tratado com 1,0 mg/L de AG₃ resultando em embriões somáticos normais em relação aos hiperhídricos foi de 1,141. Isto significa dizer que a probabilidade desta concentração em originar embriões normais foi de 14% maior que a probabilidade deste mesmo calo originar embriões somáticos hiperhídricos. O intervalo de confiança neste caso variou entre 0,682 e 1,909, ou seja, probabilidades 32% menor ou 91% maior que a probabilidade deste calo originar embriões hiperhídricos. Já a RRR de um calo tratado com 1,0 mg/L de AG₃ (controle) resultar em embriões somáticos germinados em relação a um hiperhídrico foi de 2,554, ou seja, de 255% chances maiores, ou 2,55 vezes maior deste mesmo calo originar embriões somáticos hiperhídricos. O intervalo de confiança de 95% variou entre 1,414 e 4,612, portanto, com probabilidade 1,41 vezes maior ou 4,61 vezes maior que a probabilidade deste calo originar embriões hiperhídricos.

Com base nos resultados de RRR, nota-se que mesmo que a produção de embriões somáticos hiperhídricos tenha sido maior no tratamento de 1,0 mg de AG₃, a propensão para obtenção de “não anormalidade” (embrião somático normal ou em início de germinação) neste tratamento é maior se comparado com os hiperhídricos. A hiperhidricidade é uma anormalidade relativamente comum em espécies de plantas multiplicadas na cultura de tecidos vegetais (KEVERS et al., 2004; GAO et al., 2017). Dentre os efeitos desta anormalidade, pode-se notar uma morfologia vítrea dos explantes, com grande acúmulo de água (POLIVANOVA, BEDAREV; 2022). Os impactos nas plantas são dos mais diversos, que incluem desde alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas (GAO et al., 2018; POLIVANOVA, BEDAREV; 2022), além de mudanças epigenéticas (GAO et al., 2022), no qual as plantas perdem vigor e não completam seu total desenvolvimento. Hazakira (2006) afirma que as condições impostas pelo cultivo de células *ex-situ*, no qual as plantas são

expostas a condições de estresse, podem gerar desbalanço fisiológico e causar a hiperhidricidade.

Altas concentrações de reguladores de crescimento (MONSALUD, 1995) e ambientes fechados que aumentem significativamente as quantidades de etileno e diminuam as trocas gasosas tendem a facilitar o processo de hiperhidricidade (DEWIR et al., 2018; GAO et al., 2022). Entretanto, em alguns casos observou-se que a suplementação do meio com AG₃ por até 360 dias proporcionou a reversão da hiperhidricidade, com a geração de embriões somáticos normais. A reversão de anormalidades também foi observada no estudo de Doi e colaboradores (2010), quando os embriões somáticos de *Gentiana triflora* foram transferidos para um meio de cultivo suplementado com AG₃. Porém, os autores não afirmam no texto qual tipo de anormalidade foi revertida.

Os efeitos observados da giberelina na diminuição da Razão de Chance de formação de embriões hiperhídricos pode estar relacionado ao seu papel na iniciação do processo germinativo, não permitindo o acúmulo do etileno que tem um sistema auto catalítico (BINENBAUM; WEINSTAIN; SHANI, 2020), ou algum efeito que iniba a síntese ou absorção do etileno. Nesse contexto, análises de compostos bioquímicos e de expressão gênica podem contribuir para um melhor entendimento dos efeitos do AG₃ sobre o cultivo *in vitro* e a reversão da hiperhidricidade (LIU et al. 2017).

Acerca dos resultados de início de germinação dos embriões somáticos em meio com diferentes concentrações de AG₃, os IC 95% do *odds ratio* foram calculados e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Razão de chance (*odds ratio*) da germinação embriões somáticos de palma de óleo (híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* - B351733) entre os pares de tratamentos nas três concentrações de AG₃ (0, 0,5 e 1,0 mg).

Tratamentos comparados AG ₃	Razão de chance	Razão de chance Limite Inferior	Razão de chance Limite Superior
0,5 mg : 0 mg	1,0937	0,5109	2,3413
1,0 mg : 0 mg	2,4280	1,2501	4,7159
1,0 mg : 0,5 mg	2,2201	1,2941	3,8085

Da tabela acima, os tratamentos são estatisticamente ‘diferentes’ entre si se o IC 95% não contiver o valor unitário. Se o IC 95% contiver o valor unitário, então significa dizer que as chances de diferenciação de ambos podem ser iguais.

Com base na amostra avaliada, a probabilidade de um calo com embriões somáticos germinar no tratamento de 1,0 mg de AG₃ é de 2,42 vezes, com 95% de confiança que esta razão possa estar entre 1,25 e 4,71 vezes mais. Comparando o tratamento controle com o 0,5

mg de AG₃, a chance dos embriões somáticos germinarem no tratamento é de 1,09, com 95% de confiança que esta razão possa estar entre 0,51 e 2,34 vezes. Como este intervalo observado contém o valor unitário, é possível então que as chances de germinação sejam iguais entre os tratamentos 0,5 e 0 de AG₃.

Ao comparar os tratamentos, o de maior concentração de AG₃ tem 2,22 vezes mais chances de proporcionar a germinação, quando comparado com aqueles do tratamento 0,5 de AG₃, com 95% de confiança que esta razão possa ser entre 1,29 e 3,80 vezes maior.

Os resultados da eficácia do AG₃ nas etapas de maturação e germinação também são similares ao reportado em *Byrsonima intermedia* (SILVA et al., 2018). Neste trabalho, a maior concentração desse regulador de crescimento produziu maior número de plantas. Em *Plectranthus bourneae*, o ácido giberélico auxiliou na regeneração de plantas, porém, quando adicionado em uma concentração mais baixa e combinado com outro regulador de crescimento, o 6-benzyladenine (BA) (THANIARASU; KUMAR; RAO, 2021).

Ao analisar os tratamentos em relação à germinação dos embriões somáticos, verifica-se que não houve diferenças significativas entre o tratamento controle e o de 0,5 mg/L de AG₃. O único tratamento que diferiu estatisticamente dos demais foi o tratamento onde a maior concentração deste regulador de crescimento foi adicionada (Figura 4).

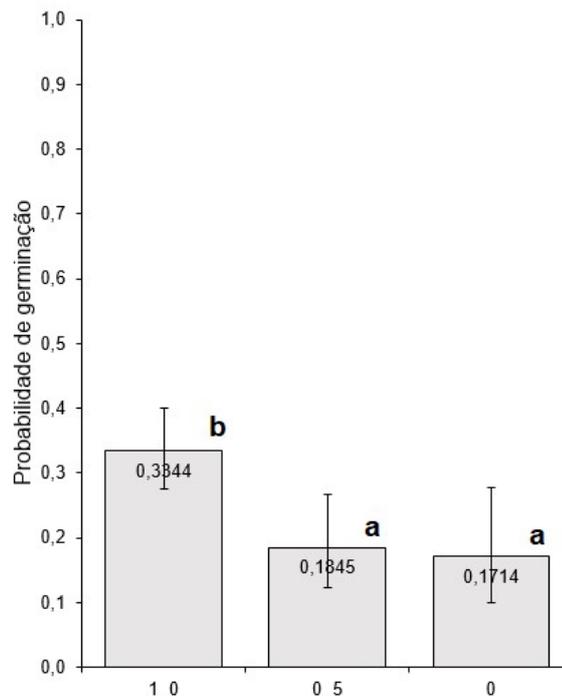


Figura 4. Germinação de embriões somáticos de palma de óleo (híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* - B351733) oriundos de calos embriogênicos tratados com

diferentes concentrações de AG₃. Letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas com base no *Odds Ratio*

Nos estudos de Li e Qu (2002) e Corredoira, San-José e Vieitez (2012), o uso de AG₃ com BAP aumentou a frequência de regeneração de plantas de *Cynodon dactylon* e *Quercus alba*, respectivamente. Em trabalho mais recente, o uso de AG₃ promoveu maior germinação em decorrência de uma menor atividade de multiplicação celular no processo de embriogênese somática de *Quercus suber* L. (BEN-ALI et al., 2022). Os pesquisadores afirmaram que os embriões germinaram de forma espontânea com aparecimento de raízes da região basal e atingiram a fase de embrião cotiledonar.

Para a palma de óleo, não há relatos do uso de AG₃ nas etapas de embriogênese somática. Porém, as giberelinas atuam como indutoras de maturação de tecidos vegetais e até mesmo de diferenciação de tecidos, como no caso do câmbio vascular em tabaco (DAYAN et al., 2012). O acúmulo diferencial de giberelinas em tecidos específicos é um importante fator para o desenvolvimento, morfologia e fisiologia dos órgão vegetais, bem como para as fases transicionais de desenvolvimento (RIZZA; JONES, 2019). As giberelinas atuam na degradação de proteínas do tipo DELLA que libera fatores de transcrição, tais como o PIF (Fator de Interação com a Giberelina), que podem então ativar a expressão de genes relacionados ao crescimento celular e alongação do caule (BINENBAUM; WEINSTAIN; SHANI, 2020) Essa ativação gera respostas fisiológicas específicas, como o alongamento celular e o crescimento dos tecidos vegetais (MCKIM, 2019).

3.2 Enraizamento e aclimatização

Após a germinação inicial dos embriões somáticos, as plantas foram transferidas para meios contendo AIB e demonstraram um maior enraizamento no tratamento com maior concentração do regulador de crescimento (Tabela 5.)

Tabela 5. Avaliação mensal de plantas germinadas em diferentes concentrações de AIB (1,5 mL/L e 11 mL/L).

	11 mg/L de AIB Enraizamentos (75 plantas)	1,5 mg/L de AIB Enraizamentos (80 plantas)
MESES		
JAN	5	0

FEV	12	3
MAR	10	2
ABR	8	0
MAI	7	1
JUN	3	2
JUL	3	2
AGO	4	3
SET	4	0
OUT	3	4
NOV	8	2
DEZ	2	4
<hr/>		
Total enraizamento =	69	23
Não enraizadas =	6	57

Ao analisar a razão de chance de enraizamento na Tabela 6, percebe-se que, com base na amostra avaliada, a mesma apresentou evidência de que em 12 meses (de observação), uma planta com tratamento 11 mg/L de AIB tem 28,5 vezes mais chances de enraizar se comparado a uma planta submetida ao tratamento com 1,5 mg/L, com 95% de confiança que esta razão de chance pode estar entre 10,9 e 74,8 vezes mais.

Tabela 6. Razão de Chance (*odds ratio*) de enraizamento entre os tratamentos 11 e 1,5 mL/L de AIB.

Tratamentos comparados de AIB	Razão de chance	Razão de chance - Limite Inferior	Razão de chance - Limite Superior
11 : 1.5	28.5	10.8631	74.7718

Acerca do tempo médio de enraizamento, a estatística do teste *t* com correção de Welch teve um valor de $p = 0,01083$ sendo, portanto significativo ao nível de 5%. Ou seja, os dados da amostra sugerem evidência de que, em média, plantas com tratamento 1,5 mg/L de AIB enraizam em 7,7 meses enquanto que sementes com tratamento 11 mg/L enraizam em 5,4 meses. A amostra assim apresentou evidência de que o enraizamento é mais rápido em meio com 11 mg/L de AIB.

A utilização de auxinas no meio de cultivo após o desenvolvimento de parte aérea *in vitro* auxilia no processo de enraizamento (KONAN et al., 2007; GOMES et al., 2015). Outro

ponto observado durante o estudo, é que na concentração mais elevada de AIB houve contínuo escurecimento (oxidação) do meio de cultivo, o que exigiu a realização de trocas mensais do meio para garantir melhor desenvolvimento das plantas. Como consequência do excesso de manipulação, observou-se um aumento das taxas de contaminação de plantas, diminuindo a eficácia do processo. Embora essas taxas não tenham sido registradas, sugere-se a necessidade de se diminuir a manipulação dos materiais em cultivo para produção de mudas em larga escala (GOMES et al., 2016).

No presente estudo, observou-se, inicialmente, um incremento nas taxas de diferenciação e germinação de embriões somáticos, concomitantemente à contínua formação de calos e da ocorrência de embriogênese secundária (Figura 5).

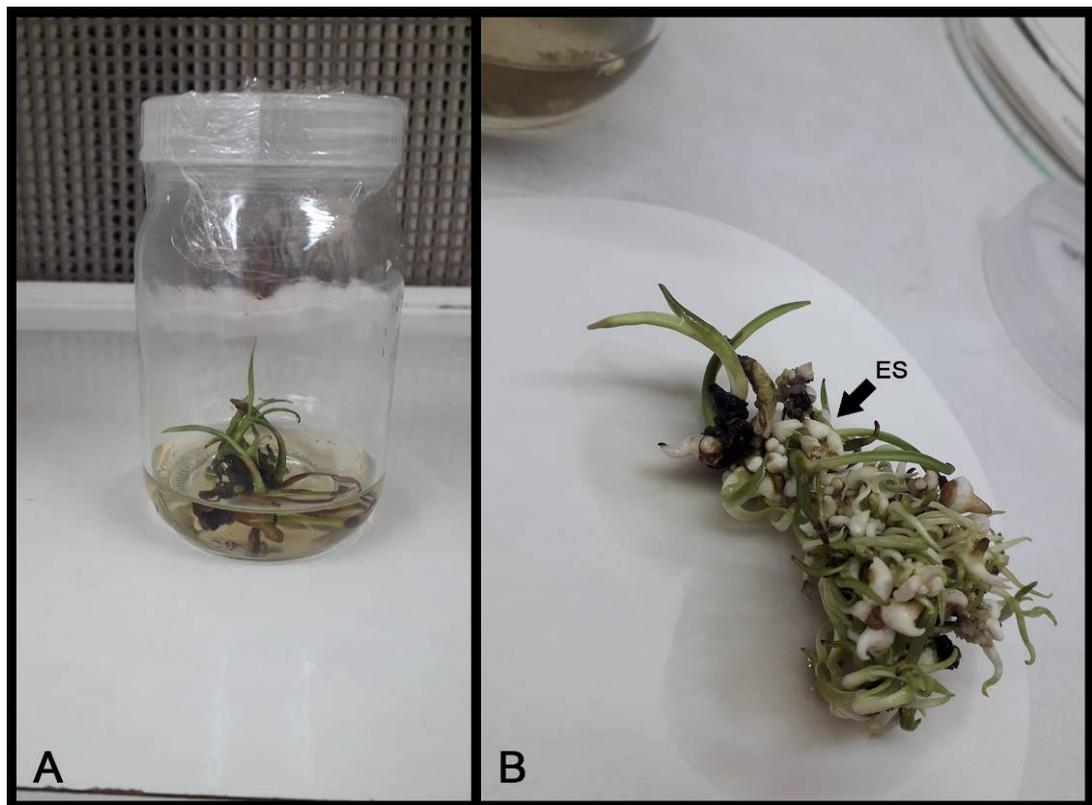


Figura 5 – Processo de embriogênese somática secundária a partir de plantas de híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) ocorrido durante a etapa de enraizamento em meio suplementado com ácido indolbutírico. A – Planta em meio de regeneração. B – Embriogênese somática secundária evidenciada durante a mudança de meio de cultura.

A ocorrência de embriogênese secundária proporcionou a formação de novos embriões somáticos, sugerindo ser uma importante alternativa para aumentar a produção de plantas clonadas. A utilização de reguladores de crescimento, mesmo após as etapas de indução e multiplicação de calos, pode reprogramar geneticamente tecidos vegetais e gerar novos embriões, como visto em *Cocos nucifera* (L.) (MONTERO-CÓRTEZ et al., 2010). Este efeito também foi visto por Silva e colaboradores (2019) que demonstraram que a utilização do AG₃ foi importante tanto para maturação dos embriões somáticos, quanto para a promoção de uma embriogênese secundária, aumentando o número de embriões em *Byrsonima intermedia*.

Os efeitos residuais das auxinas nas fases anteriores e a introdução do AIB no meio de regeneração podem promover a embriogênese secundária devido ao fato de se tratar de uma auxina e, portanto, promover divisão celular (MÉNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

Constatou-se também assincronia no processo embriogênico, com *clusters* apresentando embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 6). Segundo Balzon, Luiz e Scherwinski-Pereira (2013), os embriões somáticos do dendezeiro tendem a se formar de forma assincronizada, permanecendo o processo de diferenciação por meses ou até anos. Como observado por Jayanthi e colaboradores (2015), diferentes estágios de embriões somáticos de dendezeiro podem ser vistos em um mesmo explante (*cluster*).

O efeito da assincronia não pode ser visto apenas em dendezeiro, mas também em outras palmeiras como *Euterpe preactoria* (FERREIRA et al., 2022) e em plantas de café (ETIENNE et al., 2013). Winkelmann (2016) afirma que um dos muitos problemas observados na técnica de embriogênese somática é a diferenciação assíncrona, pois pode proporcionar morte de material, menor eficiência de regeneração e menor controle do tempo de produção de novas mudas.

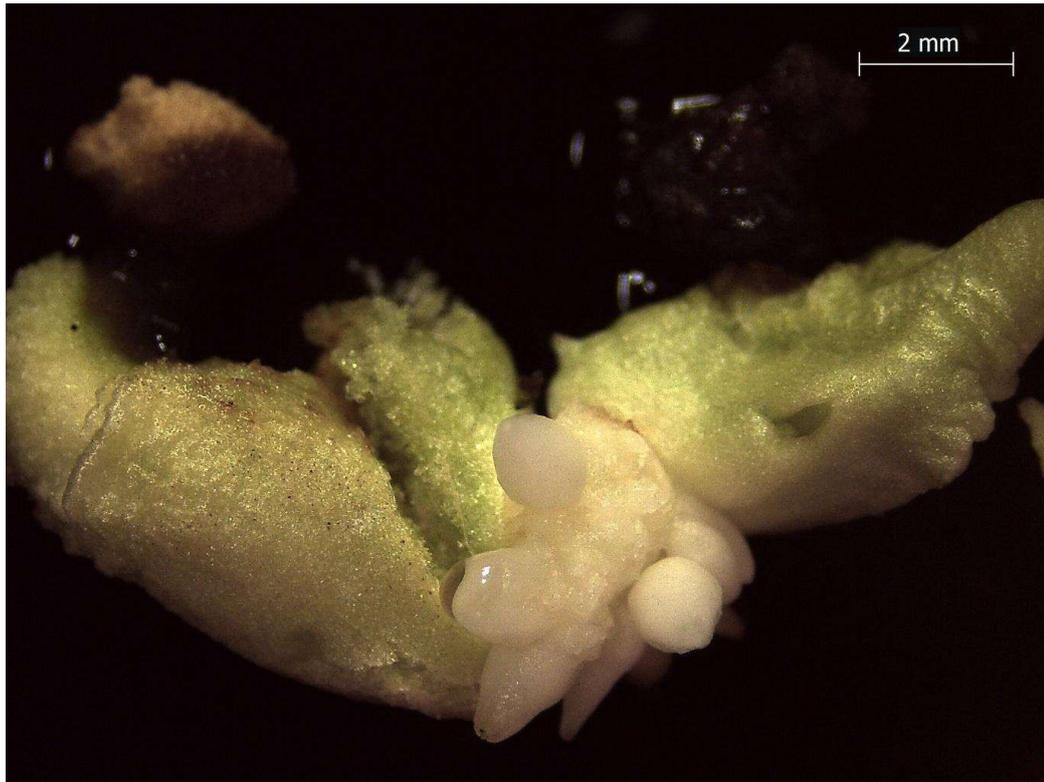


Figura 6. Processo de assincronia de embriões somáticos de híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) em diversos estágios de desenvolvimento em meio de MS suplementado com AG₃, após 210 dias desde a inoculação.

3.3 Análise molecular dos clones regenerados por ISSR

Foram avaliados 24 primers que apresentaram polimorfismo na reação de PCR para análise genética por ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). As sequências dos primers utilizados está presente na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências de primers de ISSR utilizados para análise genética de clones de palma de óleo na reação de PCR.

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'
5 zm	CACACACACACACA CAGC	60 zm	GCCACGCTGCTGCT GCTGCTGCT
11 zm	TGTCACACACACAC ACAC	1 pv	GACAGACAGACARG
12 zm	GGTCACACACACAC ACAC	2 pv	GACACGACAC
15 zm	GTGCACACACACAC ACAC	3 pv	GAGAGAGAGAGAG AGARG

18 zm	GTGCTCTCTCTCTCTCTCTC CTC	4 pv	GACAGACAGACA
39 zm	AGCAGCAGCAGCAC	6 pv	GACAGACAGACART
51 zm	GCACCCACACACAC ACACACACA	7 ps	AGAGAGAGAGAGA GAGYG
52 zm	GGCACCACACACAC ACACACACA	8 ps	CACACACACACACA CARY
55 zm	CCTCCACACACACA CACACACA	9 ps	ACACACACACACAC ACYA
56 zm	GCTACCACACACAC ACACACACA	10 ps	AGAGAGAGAGAGA GAGYT
57 zm	CGTCCACACACACA CACACACA	11 ps	GTGTGTGTGTGTGTG TYC
58 zm	CGAACCACACACAC ACACACACA	12 ps	CACACACACACACA

*Os nucleotídeos Y e R, inseridos nas sequências dos primers 1, 3, 6 pv e 7, 8, 9, 10 e 11 ps, representam a utilização de ambas as pirimidinas (T e C) e ambas as purinas (G e A), respectivamente.

Durante as ampliações, diferenças de bandas foram observadas em alguns indivíduos, sendo possível a visibilidade de prováveis variações somaclonais. Na grande maioria dos explantes não houve alteração alguma como pode ser visto na figura 7. Na Figura que corresponde ao primer “9 ps” é possível observar modificações no indivíduo 14 e 27. Os resultados gerados pela análise de fidelidade genética por ISSR de todos os primers estão presentes na Tabela 8. Pode-se verificar que houve uma taxa de 1,27% de variação genômica dentre os 30 organismos avaliados. A formação de embriões via embriogênese somática pode ocasionar variações somaclonais devido às altas concentrações de reguladores de crescimento que geram alta multiplicação de celular e possíveis mutações nesse processo (GARCIA et al., 2019).

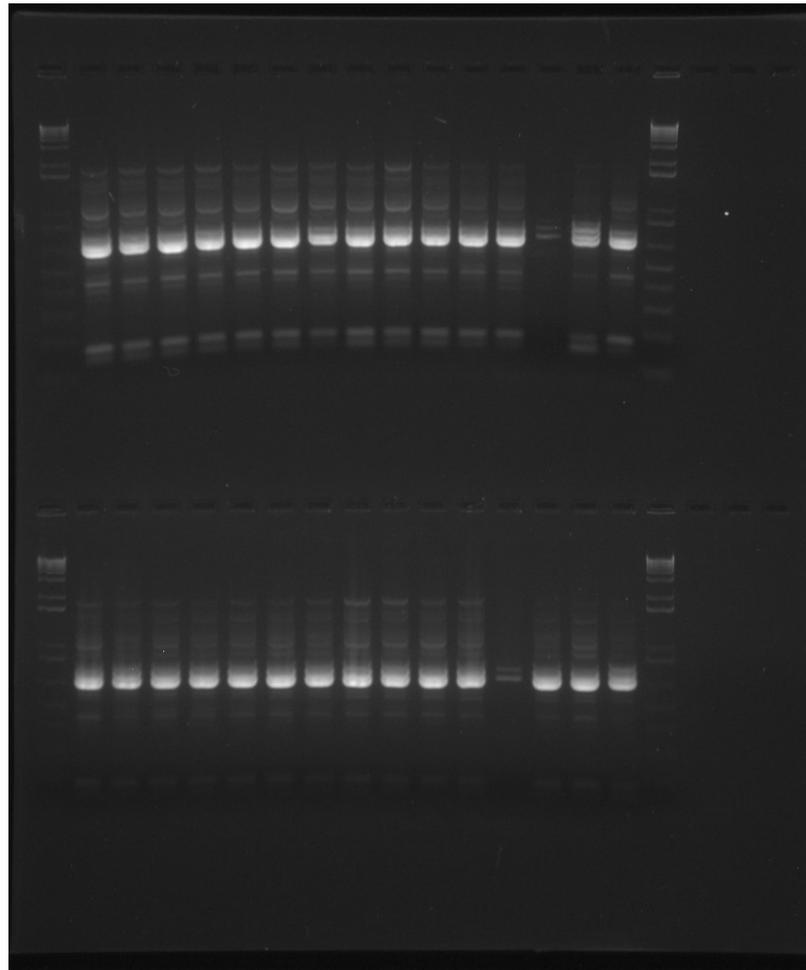


Figura 7. Análise da fidelidade genética por ISSR de clones de dendezeiro micropropagados via embriogênese somática de folhas imaturas do primer 9 ps.

Tabela 8. Análise de fidelidade genética por ISSR de clones de um híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) propagados via embriogênese somática de explantes foliares imaturos.

Mutações	Locus analisados	Alteração genética (%)
50	143	1,27

O resultado apresentado vai em dissonância ao visto na análise genética por marcadores moleculares de *Elaeis guineensis* (GANTAIT et al., 2015), de *Panax ginseng* (LEE et al., 2023) e de *Hibiscus sabdariffa* (KONAR et al., 2018). Para Sanputawong e Te-chato (2011), às variações somaclonais em dendezeiro não ocorrem em grande quantidade por modificação genética e sim por hipometilações no genoma. Porém, deve-se considerar que o material utilizado no trabalho esteve por seis anos em meio de cultivo com reguladores de crescimento e pode ter acumulado mais diferenças genéticas em relação à planta mãe.

Para uma análise mais completa e fidedigna, a análise por dendograma pode nos esclarecer em quais indivíduos ocorreram as variações somaclonais e com qual intensidade (Figura 7). Percebe-se que o indivíduo 14 apresenta diferença no começo do dendograma e a maior diferença genética entre todos os outros, com uma confiabilidade de 100% pelo bootstrap. Quatro plantas apresentam diferenças acima de 90 no bootstrap (16, 14, 12 e 27), que é o número utilizado por estes autores para considerar uma possível variação somaclonal. A vantagem da análise por ISSR é o baixo custo da técnica e sua maior reprodutibilidade do que outros marcadores moleculares (KONAR et al., 2018). Além disso, a grande quantidade de polimorfismos que podem ser observados pela técnica, aumenta o grau de confiabilidade dos resultados (AMITEYE, 2021). Apesar da aparição de variações somaclonais, é necessário observar as plantas durante seu crescimento para verificação de anormalidades nos clones, sobretudo em campo.

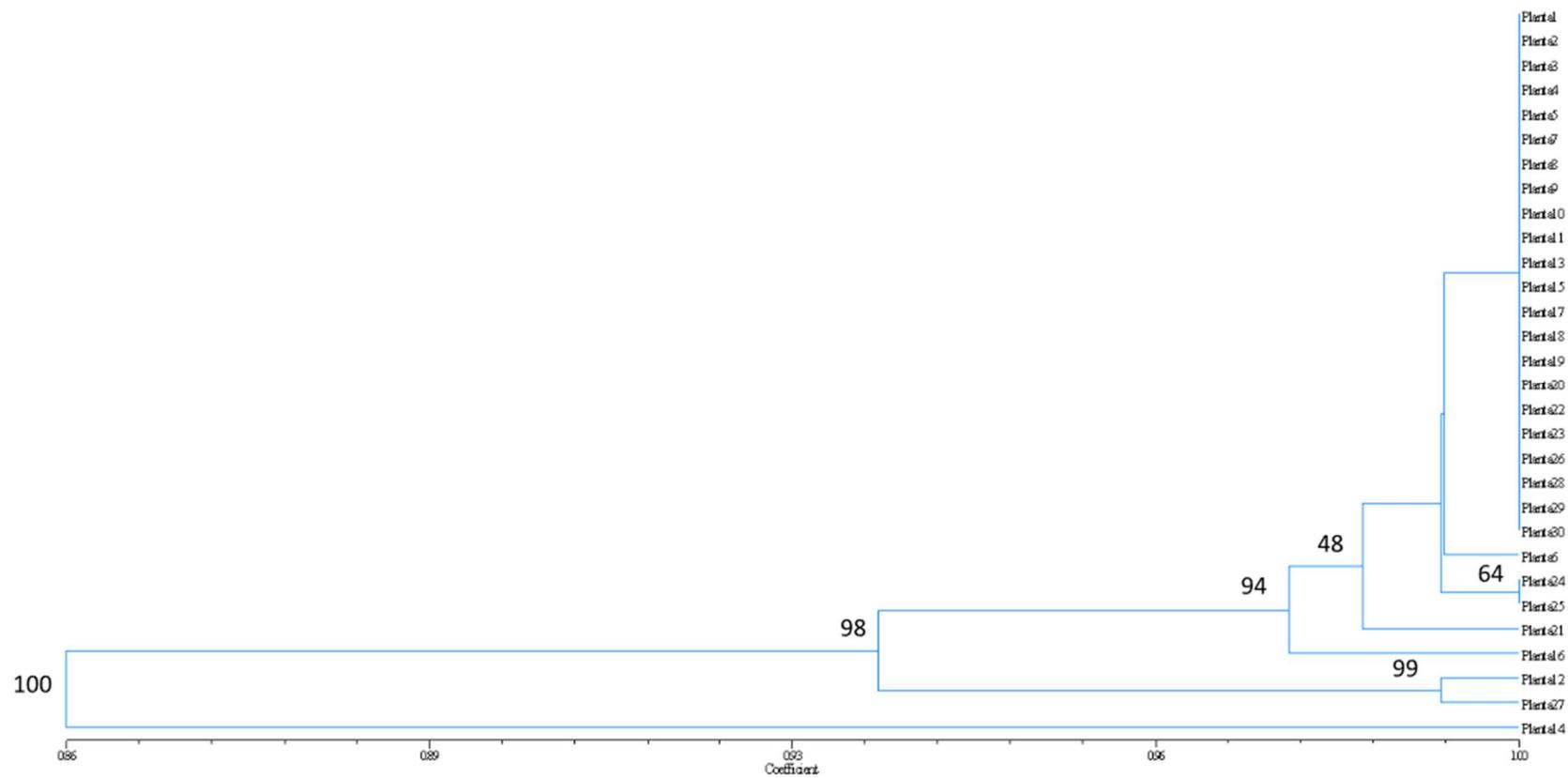


Figura 8. Dendrograma com bootstrap da análise genética feita por ISSR em 30 clones de palma de óleo gerados por meio de embriogênese somática.

4. CONCLUSÕES

Na etapa de diferenciação da embriogênese somática, a introdução de ácido giberélico (AG₃) na concentração de 1,0 mg/L promoveu a diferenciação de embriões somáticos quando comparado ao tratamento controle, otimizando esta etapa. Porém, percebeu-se que no tratamento com maior quantidade de regulador de crescimento houve formação de embriões anormais, caracterizados como hiperhídricos. Todavia, apesar da produção de embriões somáticos hiperhídricos, o tratamento com maior quantidade de AG₃ tem mais chances de produzir embriões normais do que embriões hiperhídricos quando se analisa o RRR entre todos os tratamentos;

Ao analisar a germinação, o tratamento com 1,0 mg/L de AG₃ promoveu maior quantidade de embriões germinados. Portanto, o uso do ácido giberélico otimizou a etapa de diferenciação e promoveu uma maior germinação de embriões, promovendo uma maior formação de plantas. As taxas de enraizamento foram maiores na média quando o AIB foi utilizado na concentração de 11 mg/L em meio de cultura;

Acerca da fidelidade genética, algumas plantas apresentaram variação de bandeamento, podendo indicar a ocorrência de variação somaclonal. No entanto, novos experimentos devem ser avaliados para confirmar tal hipótese.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. P.; OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2017-2024, 2000.

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

AMITEYE, S. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. **Heliyon**, v. 7, n. 10, 2021.

AWAL, A.; MUDA, N. A. Somatic embryogenesis in sugar palm (*Arenga pinnata* Wurmmb Merr.) from zygotic embryo explants. **Pertanika Journal of Science & Technology**, v. 25, n. 107, 2017

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature

zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 1, p. 41-50, 2013.

BARCELOS, E.; RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; MOTOIKE, S. Y.; BABIYCHUK, E.; SKIRYCZ, A., KUSHNIR, S. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 190, 2015.

BARTOLI, C. G.; CASALONGUÉ, C. A.; SIMONTACCHI, M.; MARQUEZ-GARCIA, B.; FOYER, C. H. Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 73-88, 2013.

BEN ALI, N.; BENKADDOUR, R.; RAHMOUNI, S.; BOUSSAOUDI, I.; HAMDOUN, O.; HASSOUN, M.; AZAROUAL, L.; BADOUC, A.; MARTINS, P.; LAMARTI, A. Secondary somatic embryogenesis in Cork oak: influence of plant growth regulators. **Forest Science and Technology**, p. 1-11, 2023.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. Springer Science & Business Media, 2013.

BINENBAUM, J.; WEINSTAIN, R.; SHANI, E. Gibberellin localization and transport in plants. **Trends in plant science**, v. 23, n. 5, p. 410-421, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/biodiesel/programa-nacional-de-producao-e-uso-do-biodiesel-pnpb>. Acessado em 06 de Abril de 2022.

BYERLEE, D.; FALCON, W. P.; NAYLOR, R. The tropical oil crop revolution: food, feed, fuel, and forests. **Oxford University Press**, 2017.

CASTRO, C. N. **O programa nacional de produção e uso do biodiesel (PNPB) e a produção de matéria-prima de óleo vegetal no norte e no nordeste**. Texto para discussão, 2011.

CHANPRASERT, W., MYINT, T., SRIKUL, S., WONGSRI, O. Effects of neonicotinoid and method of breaking dormancy on seed germination and seedling vigour of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Oil Palm Research**, v. 24, n. 1, p. 227-34, 2012.

CORLEY, R.; TINKER, P. **The oil palm**. 5ª Edição. Chicester, Reino Unido: Wiley Blackwell. 2016.

CORREDOIRA, E.; SAN-JOSÉ, M. C.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. **Trees**, v. 26, p. 881-891, 2012.

- CUI, J.; LAMADE, E.; TCHERKEZ, G. Seed Germination in Oil Palm (*Elaeis guineenses* Jacq.): A Review of Metabolic Pathways and Control Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4227, 2020.
- DAS, A. B.; ROUT, G. R.; DAS, P. In vitro somatic embryogenesis from callus culture of the timber yielding tree *Hardwickia binata* Roxb. **Plant cell reports**, v. 15, p. 147-149, 1995.
- DEWIR, Y. H.; NURMANSYAH; NAIDOO, Y.; SILVA, J. A. T. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. **Plant cell reports**, v. 37, n. 11, p. 1451-1470, 2018.
- DOI, H.; TAKAHASHI, R.; HIKAGE, T.; TAKAHATA, Y. Embryogenesis and doubled haploid production from anther culture in gentian (*Gentiana triflora*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** , 102, 27-33, 2010
- EDWARDS, R. B. Export agriculture and rural poverty: evidence from Indonesian palm oil. **Dartmouth College: Hanover, Germany**, 2019.
- ETIENNE, H.; BERTRAND, B.; GEORGET, F.; LARTAUD, M.; MONTES, F.; DECHAMP, E.; VERDEIL, J.; BARRY-ETIENNE, D. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. **Tree Physiology**, v. 33, n. 6, p. 640-653, 2013.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the Nations. **Crops and livestock products: Oil palm fruit**. 2022 Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em 06 de Abril de 2022.
- FEHÉR, A.; ÖTVÖS, K.; PASTERNAK, T. P.; PETTKÓ-SZANDTNER, A. The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G0-to-G1 transition) of plant cells. **Plant signaling & behavior**, v. 3, n. 10, p. 823-826, 2008.
- FERREIRA, C. B. B.; LOPES, M. T. G.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MORERIA, D. A.; BARROS, W. S.; MATIELLO, R. R. Diversidade genética molecular de progênies de dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p. 378-384, 2012.
- FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA-SCHERWINSKI, J. E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, p. 1-19, 2022.
- FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Plant Science Letters**, v. 5, n. 6, p. 359-364, 1975.
- GANTAIT, S.; SINNIHAH, U. R.; SURANTHRAN, P.; PALANYANDY, S. R.; SUBRAMANIAM, S. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) oylembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. **Protoplasma**, v. 252, p. 89-101, 2015.

- GAO, H.; XIA, X.; AN, L.; XIN, X.; LIANG, Y. Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during in vitro culture. **Plant Science**, v. 254, p. 1-11, 2017.
- GAO, H.; LI, J.; JI, H.; AN, L.; XIA, X. Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*Vaccinium spp.*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, p. 65-76, 2018.
- GAO, H.; XIA, X.; AN, L. Critical roles of the activation of ethylene pathway genes mediated by DNA demethylation in Arabidopsis hyperhydricity. **The Plant Genome**, p. 1-16, 2022.
- GHOSH, A.; IGAMBERDIEV, A. U.; DEBNATH, A. C. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
- GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 1, p. 111-117, 2015.
- GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 244-249, 2016.
- GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. 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**, v. 131, n. 2, p. 269-282, 2017.
- GUERRA, M. P.; PESCADOR, R.; DAL-VE스코, L. L.; NODARI, R. O.; DUCROQUET, J. P. In vitro morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: somatic embryogenesis and plant regeneration. **In: International Symposium on Myrtaceae 452**. p. 27-36. 1997.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia horticulturae**, v. 108, n. 2, p.105-120, 2006
- HEMANTHAKUMAR, A. S.; PREETHA, T. S.; PILLAI, P. P.; SEENI, S. Embryogenesis followed by enhanced micro-multiplication and eco-restoration of *Calamus thwaitesii* Becc.: an economic non-wood forest produce for strengthening agroforestry system. **Agroforestry Systems**, v. 93, p. 1093-1105, 2019.
- HILBE, J. M. **Modelos de Regressão Logística**. 1ª edição. Nova Iorque: Chapman e Hall, 2009.
- HITA, O.; LAFARGA, C.; GUERRA, H. Somatic embryogenesis from chickpea (*Cicer arietinum* L.) immature cotyledons: The effect of zeatin, gibberellic acid and indole-3-butyric acid. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p. 333-338, 1997.

- HUH, Y. S.; LEE, J. K.; NAM, S. Y. Effect of plant growth regulators and antioxidants on in vitro plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Journal of Plant Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 335-342, 2017.
- HUTCHINSON, M. J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Inhibitory effect of GA 3 on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 435-438, 1997.
- ILAH, A.; SYED, M.; REYAD, A. M.; MUJIB, A. Gibberellic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins (56, 34 and 26 KD) in somatic embryos of *Santalum album* L. **International Journal of Science and Research**, v. 5, p. 2263-2268, 2016.
- JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; MURALI, M. N.; MANDAL, P. K. In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2015.
- KAEWTAPHAN, P.; CHANPRASERT, W.; SAYASOONTHORN, S.; WONGSRI, O.; PETCHRRUN, T. Germination of de-operculated oil palm (*Elaeis guineensis*) seed as affected by gibberellic acid (AG3). **Seed Science Technology**, v. 44, p. 298–309, 2016.
- KERBAUY, G. B.: **Fisiologia vegetal**. 3. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
- KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 181-191, 2004.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Stimulation of embryogenesis in citrus ovular callus by ABA, ethephon, CCC and Alar and its suppression by AG3. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 89, n. 5, p. 427-432, 1978.
- KONAN, E.; K.; KOUADIO, J. Y.; FLORI, A.; DURAND-GASSELIN, T.; RIVAL, A. Evidence for an interaction effect during in vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 5, p. 456-466, 2007.
- KONAN, K. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, J. Y.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIE, C. 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**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010.
- KONAR, S.; KARMAKAR, J.; RAY, A.; ADHIKARI, S.; BANDYOPADHYAY, T. K. Regeneration of plantlets through somatic embryogenesis from root derived calli of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle) and assessment of genetic stability by flow cytometry and ISSR analysis. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0202324, 2018.

KLUBICOVÁ, K.; UVÁCKOVÁ, L.; DANČENKO, M.; NEMECEK, P.; SKULTÉTY, L.; SALAJ, J.; SALAJ, T. Insights into the early stage of *Pinus nigra* Arn. somatic embryogenesis using discovery proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 169, p. 99-111, 2017.

LARROUY, J.; JAKSONS, P.; BICKNELL, R. Response interactions in grape somatic embryogenic cultures to cold and gibberellic acid treatments to overcome embryo dormancy. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 129, n. 1, p. 45-52, 2017.

LEE, J. W.; KIM, J. U.; BANG, K. H.; KWON, N.; KIM, Y. C.; JO, I. H.; PARK, Y. D. Efficient somatic embryogenesis, regeneration and acclimatization of *Panax ginseng* Meyer: True-to-type conformity of plantlets as confirmed by ISSR analysis. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1270, 2023.

LI, L.; QU, R. In vitro somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. **Plant Breeding**, v. 121, n. 2, 155-158, 2002

LIU, M.; JIANG, F.; KONG, X.; TIAN, J.; WU, Z.; WU, Z. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. **Scientia Horticulturae**, v. 217, p. 285-296, 2017.

LIU, Y.; WEI, C.; WANG, H.; MA, X.; SHEN, H.; YANG, L. Indirect somatic embryogenesis and regeneration of *Fraxinus mandshurica* plants via callus tissue. **Journal of Forestry Research**, v. 32, n. 4, p. 1613-1625, 2021.

MARTIN, F.; ABATI, V.; BUREL, A.; CLÉMENT-VIDAL, A.; SANIER, C.; FABRE, D.; WORAATHASIN, N.; RIO, M.; BESRET, P.; FARINAS, B.; MONTORO, P.; LECLERCQ, J. Overexpression of EcGSH1 induces glutathione production and alters somatic embryogenesis and plant development in *Hevea brasiliensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 803-814, 2018.

MATSUMOTO, K. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca in vitro. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 3, p. 107-110, 1991.

MCKIM, S. M. How plants grow up. **Journal of integrative plant biology**, v. 61, n. 3, p. 257-277, 2019.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A.; LEDEZMA-RODRÍGUEZ, M.; AVILEZ-MONTALVO, R. N.; JUÁREZ-GÓMEZ, Y. L.; SKEETE, A.; AVILEZ-MONTALVO, J.; DE-LA-PEÑA, C.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 77, 2019.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G. A. D.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN-BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in plant science**, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MONSALUD, M.; MATHEUS, H.; LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Control of hyperhydricity of mango somatic embryos. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 42, n. 2, p. 195-206, 1995.

- MONTERO-CORTÉS, M.; SÁENZ, L.; CORDOVA, I.; QUIROZ, A.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. GA 3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). **Plant cell reports**, v. 29, p. 1049-1059, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, 473-497, 1962.
- NORSAZWAN, M. G.; PUTEH, A. B.; RAFII, M. Y. Oil palm (*Elaeis guineensis*) seed dormancy type and germination pattern. **Seed Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 15-26, 2016.
- OLIVEIRA, A. M.; MARIO, M. C.; PACHECO, M. T. T. Fontes renováveis de energia elétrica: evolução da oferta de energia fotovoltaica no Brasil até 2050. **Brazilian Applied Science Review**, v. 5, n. 1, p. 257-272, 2021.
- POLIVANOVA, O. B.; BEDAREV, V. A. Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3313, 2022
- QAIM, M.; SIBHATU, K. T.; SIREGAR, H.; GRASS, I. Environmental, economic, and social consequences of the oil palm boom. **Annual review of resource economics**, v. 12, n. 1, p. 321-344, 2020.
- QUEIROZ-LIMA, E.; OLIVEIRA, E. P.; LIMA-PEREIRA, A.; ROCHA, A. C. B.; LASMAR, D. J. Tecnologias em biocombustíveis na Amazônia-histórico de pesquisas, aplicação e perspectivas para a região. **Peer Review**, v. 5, n. 22, p. 454-467, 2023.
- RIBEIRO, D. G.; ALMEIDA, R. F.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; SOUSA, M. V.; RICARTC, C. A. O. R.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. **Journal of proteômica**, v. 192, p. 137-146, 2019.
- RIZZA, A.; JONES, A. M. The makings of a gradient: spatiotemporal distribution of gibberellins in plant development. **Current opinion in plant biology**, v. 47, p. 9-15, 2019.
- RUDUŚ, I.; KĘPCZYŃSKA, E.; KĘPCZYŃSKI, J. Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. **Plant growth regulation**, v. 36, p. 91-95, 2002.
- SANPUTAWONG, S.; TE-CHATO, S. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of in vitro oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Agricultural Technology**, v.7, p.531-545, 2011.
- SANTOS, A. C.; ANJOS, S. S. N.; BRAGA, M.; VIANA, N. M.; SOARES, I. P. Aplicação industrial de óleos vegetais em biocombustível: um estudo prospectivo e análise de sinais para apontar tendências de mercado. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 39, n. 2, p. 26995, 2022.

- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; FERMINO, P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, n. 4, p. 378-395, 2010.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; SILVA-GUEDES, R.; SILVA, R. A.; FERMINO, P. C. P.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** , v. 109, p. 501-508, 2012.
- SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Cultura de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais** , v. 111, n. 1, pág. 59-67, 2012.
- SILVA, D. P. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; SILVA, L. C. FERREIRA, G. N.; REIS, M. V. Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: induction and maturation via indirect approach. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** , v. 133, n. 1, pág. 115-122, 2018.
- SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020.
- THANIARASU, R.; KUMAR, T.; RAO, MV Indirect somatic embryogenesis and genetic homogeneity assessment in *Plectranthus bourneae* Gamble-an endemic plant to Western Ghats of Tamil Nadu, India. **Journal of Applied Horticulture**, v. 23, n. 2, p. 224-230, 2021.
- TOKUJI, Y.; KURIYAMA, K. Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 2, p. 133-141, 2003.
- WINKELMANN, T. Somatic Versus Zygotic Embryogenesis: Learning from Seeds. In: GERMANA, M., LAMBARDI, M. (eds) **In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology**, vol 1359. Humana Press, New York, NY. 2016.
- YANG, X.; YANG, X.; GUO, T.; GAO, K.; ZHAO, T.; CHEN, Z.; AN, X. HIGH-Efficiency Somatic Embryogenesis from Seedlings of *Koeleruteria paniculata* Laxm. **Forests**, v. 9, n. 12, p. 769, 2018.
- ZANG, D.; SHI, P.; HTWE, Y. M.; LI, Z.; IHASE, L. O.; MASON, A. S.; SUN, X.; XIAO, Y.; WANG, Y. Caffeate may play an important role in the somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Industrial Crops & Products**, v. 174, p. 114143, 2021.
- ZHOU, T.; YANG, X.; GUO, K.; DENG, J.; XU, J.; GAO, W.; LINDSEY, K.; ZHANG, X. ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 6, p. 2108-2124, 2016.
- ZIV, M. Quality of micropropagated plants—vitrification. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 27, p. 64-69, 1991.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS NORMAIS E HIPERHÍDRICOS DE PALMA DE ÓLEO

ANÁLISE MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS NORMAIS E HIPERHÍDRICOS DE PALMA DE ÓLEO

RESUMO

A palma de óleo (*Elaeis sp.*) é a oleaginosa de maior produtividade em óleo vegetal, principalmente utilizando-se genótipos melhorados. Porém, a multiplicação da espécie ocorre quase que exclusivamente via sementes, uma solução que pode causar heterogeneidade de respostas das plantas em campo. A técnica da embriogênese somática surge como uma importante ferramenta para superar tais dificuldades, por permitir produzir clones idênticos às plantas matrizes. Entretanto, esta técnica pode ocasionar anormalidades nos explantes, sendo uma delas a hiperhidricidade, descrita como plantas com aspecto translúcido devido ao acúmulo de água nos tecidos, que pode causar desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas na planta, comprometendo o seu desenvolvimento. Este trabalho teve como objetivo analisar os aspectos morfológicos e histoquímicos de embriões somáticos normais e hiperhídricos de palma de óleo submetidos a tratamentos com ácido giberélico (AG₃). Para tal, embriões somáticos que estavam em meio de MS suplementado com 1,0 mg de AG₃ e apresentando aspecto normal (Nm) e hiperhídrico (Hh) foram emblocados em historesina e corados com azul de toluidina, Lugol e Xilidine Ponceau para análises histoquímicas. Os resultados observados mostraram que houve maior quantidade de embriões somáticos Nm diferenciados por explante, com taxa de germinação próxima do zero nos embriões somáticos Hh. Adicionalmente, verificou-se maior acúmulo de proteínas e amido nos embriões somáticos Nm, quando comparado aos Hh. Verificou-se ainda que em embriões somáticos Nm as reservas proteicas estavam localizadas mais na região proximal (eixo embrionário), enquanto que o amido teve suas reservas acumuladas mais na região distal dos embriões somáticos. Os embriões somáticos Hh não apresentaram reservas de amido e observou-se que maior quantidade de espaços intercelulares, em relação ao embrião somático Nm. Entretanto, alguns embriões somáticos Hh apresentaram características histoquímicas semelhantes aos Nm, o que pode explicar a ocorrência de reversões do estado Hh para o Nm observadas neste trabalho. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou resultados similares com a histoquímica, baixa presença de amido, espaços intercelulares e células vacuoladas nos embriões hiperhídricos. Vale ressaltar que os dois embriões apresentam organelas citoplasmáticas, núcleo e nucléolo, demonstrando uma alta atividade metabólica nos embriões.

Palavras-Chave: Anatomia, Embriogênese somática; Vitrificação

1 INTRODUÇÃO

A demanda pela multiplicação da palma de óleo tem aumentado exponencialmente nos últimos anos, devido ao seu alto potencial de produção de óleo vegetal, tornando-se a oleaginosa mais importante do ponto de vista comercial (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020). Por meio do fruto do dendê, podem ser extraídos o óleo de palmiste, com um teor de 55% de óleo extraído da amêndoa, e o óleo de palma que é extraído do mesocarpo e contém cerca de 20% de óleo (GLIMN-LACY; KAUFMAN, 2006; FEROLDI; CREMONEZ; ESTEVAM, 2014).

Devido ao alto rendimento, a produção de óleo de palma aumentou e gerou empregos, visto que é uma planta perene e de ciclo longo (PÁDUA, 2012; CORLEY; TINKER, 2016). Porém, a necessidade de substituições de plantas em campo, além da multiplicação de genótipos melhorados tornou-se mais constante e novas tecnologias para produção de mudas de qualidade e reconhecido valor genético e agrônômico são necessárias (BARCELOS et al., 2015; CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020).

A grande parte das mudas de palma de óleo comercializadas para compor os plantios comerciais são originárias de sementes, pois devido às características de não perfilhamento das plantas, a multiplicação vegetativa por técnicas convencionais é praticamente impossível de ser aplicada para esta palmeira (LOW et al., 2008; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BARCELOS et al., 2015). Neste sentido, a embriogênese somática apresenta-se como uma técnica de grande potencial, por ser a única capaz de permitir a clonagem de materiais selecionados e em larga escala (ZANG et al., 2021; FERREIRA et al., 2022; SILVA-CARDOSO; GOMES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2022).

Entretanto, apesar da técnica já ser bastante conhecida para a clonagem de espécies de palmeiras, como a palma de óleo, a embriogênese somática necessita ser rotineiramente otimizada, devido aos problemas inerentes ao cultivo destes tipos de plantas. (GOMES et al., 2016; SILVA-CARDOSO et al., 2020). Além disso, a técnica pode ocasionar anormalidades na formação das plantas e embriões somáticos, nas quais destacam-se a hipertrofia dos embriões somáticos (MEIRA et al., 2019), a dificuldade de germinação e formação de plantas completas (GARCIA et al., 2019), além da ocorrência de variação somaclonal nas plantas regeneradas (KRISHNA et al., 2016).

Recentemente, a otimização dos protocolos de embriogênese somática de palma de óleo em nosso grupo de pesquisa mostraram que, apesar dos importantes avanços em etapas do processo (GOMES et al., 2016; ALMEIDA et al., 2020; SILVA-CARDOSO; GOMES;

SCHERWINSKI-PEREIRA, 2022), embriões somáticos hiperhídricos foram detectados juntamente com os de desenvolvimento normal (dados não publicados, ver Capítulo I). Essa desordem pode ser caracterizada pelo aspecto translúcido e vítreo dos órgãos vegetais que são acometidos por ela, causando prejuízos ao desenvolvimento geral do vegetal, não raramente levando-os à morte (KEVERS et al., 2004; GAO et al., 2017; GAO; XIA; AN, 2022). Tal ocorrência pode ser causada por uma série de fatores, entre as quais destacam-se o acúmulo de etileno no frasco (KEVERS et al., 2004), a desregulação nos níveis nutricionais do meio de cultura onde as plantas estão sendo produzidas (IVANOVA; STANDE, 2011; MAMEDES-RODRIGUES et al., 2019), além de condições da alta umidade de cultivo (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022).

Dentre os principais agentes já estudados causadores da hiperhidricidade, destaca-se modificação das vias de produção e transporte de etileno e CO₂ (ZIV, 1999; DRIES et al., 2013; GAO et al., 2022), altas concentrações de citocininas (IVANOVA; STADEN, 2011; LIU et al., 2017; GANTAIT; MAHANTA, 2022), diferentes agentes gelificantes e concentrações de sacarose (IVANOVA; STADEN, 2011; TOAIMA; BOSILA; EL-ATEEQ, 2016; BAYRAKTAR et al., 2020) e a influência de determinados íons no meio de cultivo (POLIVANOVA; BERDAREV, 2022).

Entretanto, apesar de ser um fenômeno já bastante conhecido na literatura, este tipo de desordem é praticamente desconhecido, não citado ou ignorado em protocolos de embriogênese somática de palma de óleo. Para identificar os possíveis prejuízos da hiperhidricidade, a análise histológica pode ser uma ferramenta eficaz no entendimento deste fenômeno, visto que a qualidade morfológica e fisiológica é fundamental no processo de embriogênese somática (SILVA-CARDOSO et al., 2020). Métodos histoquímicos, em geral, geram resultados qualitativos e comparações entre os diferentes tipos de explantes podem aprimorar a compreensão dos resultados (FIGUEIREDO et al., 2007). Adicionalmente, a caracterização dos compostos nutricionais dos embriões somáticos, pode demonstrar a qualidade fisiológica dos mesmos e as semelhanças e diferenças com o embrião zigótico (SILVA-CARDOSO et al., 2019).

Portanto, o objetivo do trabalho foi verificar as diferenças morfológicas, anatômicas e histoquímicas de embriões de embriões somáticos normais e hiperhídricos de palma de óleo submetido a tratamentos com ácido giberélico (AG₃).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para análise histoquímica e morfológica, seis embriões somáticos de cada um dos estágios caracterizados como normais e hiperhídricos foram aleatoriamente separados para as análises. Os materiais foram obtidos diretamente do meio de diferenciação (de acordo com o Capítulo 1), após 210 dias de cultivo.

A análise morfológica dos diferentes tipos de calos obtidos foi realizada durante a etapa de indução de calos de forma visual e com auxílio de um estereoscópio (Leica, Mod. EZ4 HD), acoplado ao computador contendo software de captura de imagens (Software LAS EZ 2.0). Analisou-se a contagem de embriões por calo na fase de diferenciação e plantas formados por cluster de embriões tanto normais quanto hiperhídricos. O teste estatístico utilizado foi o teste *t* para análise de diferenças significativas.

Para as análises histoquímicas, as amostras foram fixadas, desidratadas e emblocadas em resina conforme metodologia abaixo. A fixação foi realizada em em solução Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965) com paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05M (pH 7,2) no qual as amostras ficaram 24h dentro da solução, sendo que a primeira hora estava em condição de vácuo. Após o dia em solução, foram feitas três lavagens na mesma solução de cacodilato de sódio, por 1 h cada, todos em condições de vácuo. A desidratação foi feita em série etanólica crescente (70-100%, 1 hora cada) e a infiltração em historresina (Leica, Heidelberg, Germany), seguindo as especificações do fabricante. Utilizando-se micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), cortes seriados longitudinais e transversais de 7 µm foram obtidos, distendidos e aderidos às lâminas microscópicas com uso de placa aquecedora a 40 °C. Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,5%) (O'Brien et al. 1964). Testes histoquímicos também foram realizados para verificar a presença de proteínas e amido, respectivamente, utilizando-se Xilidine Ponceau (XP) e Lugol (Johansen 1940; Vidal 1969).

As imagens foram registradas por meio de microscópio (Leica, Mod. DM 300) acoplado ao computador contendo software de captura de imagens (Software LAS EZ 2.0). As fotos foram agrupadas pelo programa Adobe Photoshop para montagem das pranchas.

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) e mantidas a 4°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, passaram por uma pós-fixação com tetróxido de

ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Para esta etapa de pós-fixação, as amostras foram imersas em acetato de uranila a 0,5% por 24 horas a 4°C e desidratadas em uma série ascendente de etanol (de 10% a 100%). Em seguida, as amostras foram infiltradas com resina Epon 812© seguindo o protocolo do fabricante. A inclusão foi realizada em moldes específicos para polimerização a 70°C. Cortes ultrafinos com uma espessura de 60 nm foram obtidos utilizando um ultramicrotomo Leica. Esses cortes foram contrastados com acetato de uranila a 5% por 1 hora no escuro. As amostras foram então analisadas e documentadas fotograficamente utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (MET - modelo Zeiss EM 109). As imagens foram analisadas comparando as diferenças entre embriões normais e hiperhídricos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A característica morfológica dos embriões somáticos considerados normais foram a coloração esbranquiçada, alguns com coloração bege (Figura 1A). Os embriões somáticos eram maciços e compactos, com maior tendência a serem alongados. A germinação destes embriões ocorreu de forma assíncrona e durante o desenvolvimento, nem todos sobreviveram e tornaram-se plantas completas (Figura 1B). A estrutura dos embriões somáticos é semelhante aos obtidos por Balzon, Luis e Scherwinski-Pereira (2013), Gomes e colaboradores (2016), Almeida e colaboradores (2020), e Zang e colaboradores (2021).

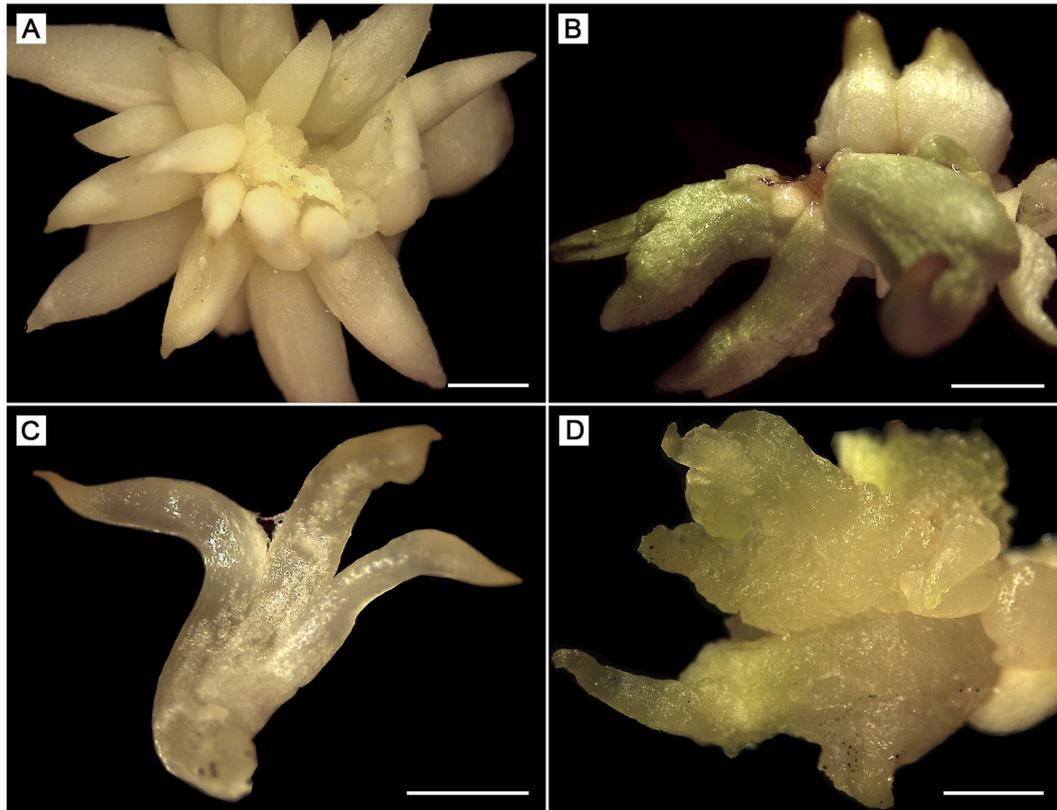


Figura 1. Análise morfológica de embriões somáticos normais e hiperhídricos de um híbrido interespecífico de de palma de óleo (*Elaeis oleifera* × *E. guineensis* (B351733) e seu processo de germinação. **A.** Agrupamento (*cluster*) de embriões somáticos normais. **B.** Germinação de agrupamentos (*cluster*) de embriões somáticos normais. **C.** Agrupamento (*cluster*) de embriões somáticos hiperhídricos. **D.** Germinação de embriões somáticos (*cluster*) hiperhídrico.

No que tange os embriões somáticos hiperhídricos, a aparência era translúcida com aspecto friável e aquoso (Figura 1C). Durante o processo de germinação, os embriões somáticos hiperhídricos apresentaram anormalidades morfológicas e nenhum conseguiu se desenvolver em planta completa (Figura 1D). Garcia e colaboradores (2019) relatam que a maior dificuldade na clonagem de genótipos via embriogênese somática é o grande número de anormalidades que surgem nos embriões somáticos, que por sua via, não conseguem se desenvolver em plantas saudáveis.

Devido ao estresse provocado pelas etapas da embriogênese somática, é comum que anormalidades surjam durante o processo (KRISHNA et al, 2016). As alterações podem ser devido à inadequadas condições do cultivo in vitro ou o próprio método que pode gerar alterações genéticas ou epigenéticas no DNA (FEHÉR et al., 2015; GARCIA et al., 2016; GARCIA et al., 2019). Num estudo feito por Gao e colaboradores (2022) foi observado que

mudanças epigenéticas em genes que promovem a síntese e transporte de etileno foram encontradas em plantas hiperhídricas.

Ao analisar a quantidade de embriões somáticos por explante, os calos que deram origem a embriões somáticos normais apresentaram-se em maior quantidade em relação aos calos que deram origem a embriões somáticos hiperhídricos (Figura 2). Este resultado é similar ao visto por Balzon, Luis e Scherwinski-Pereira (2013) no qual a média de embriões somáticos por *cluster* foi de 15 com variação de mais ou menos 5. A diferença entre os dois tipos de embriões somáticos foi significativa, demonstrando a maior capacidade de formar embriões somáticos cuja anormalidade não está presente.

A hiperhidricidade é causada por maior quantidade de água nos espaços intercelulares (DRIES et al., 2011; POLIVANOVA; BEDAREV, 2022) e, geralmente, aumento na concentração do etileno (GAO et al., 2022). Estes dois fatores juntos, podem promover uma menor quantidade de O₂ disponível para respiração da planta, além do etileno ter efeitos sobre a produção de citocininas e auxinas, promovendo uma menor divisão celular e formação de novos embriões somáticos por calos (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022).

Porém, o etileno não é a única causa da hiperhidricidade e outros agentes podem influenciar na formação de plantas anormais. No estudo de Liu e colaboradores (2017), observou-se que a diminuição na concentração de citocininas ocasionava em uma menor formação de plantas hiperhídricas e um menor biossíntese de etileno. Na embriogênese somática, a combinação de reguladores de crescimento, como as citocininas, são importantes no processo de indução e multiplicação de calos (BALZON; LUIZ; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013).

Ainda analisando o processo de embriogênese somática no cultivo *in vitro*, os protocolos utilizam íons e agentes gelificantes nos meios de cultura para realização do processo embriogênico (IKEUCHI et al., 2016; JAIN et al., 2018). A diminuição na quantidade de íons de nitrato (IVANOVA; STADEN, 2008), fosfato (PASQUALETTO, ZIMMERMAN; FORDHAM, 1988) e os componentes do meio MS podem diminuir a formação de plantas hiperhídricas (ZIV; SCHWARTZ; FLEMINGER, 1987). Já quanto aos efeitos dos agentes gelificantes, o ágar se mostrou um gelificante melhor ao diminuir a quantidade de formação de plantas hiperhídricas (BAYRAKTAR et al., 2020). No estudo presente, utilizou-se o Phytigel®, um gelificante à base de goma gelana (Gelrite TM), pois contém menos impurezas, por isso são amplamente utilizados na cultura de células e tecidos vegetais (POLIVANOVA; BERDAREV, 2022). Aparentemente, a estrutura física dos géis à base de goma gelana promove uma absorção mais intensa de substâncias associadas a um alto

índice de hiperhidricidade: água, citocininas e íons amônio (FRANK et al., 2004). Há evidências de um aumento no conteúdo de citocininas endógenas em plantas cultivadas em meio com goma gelana em comparação com plantas cultivadas em meio de ágar (IVANOVA et al., 2006).

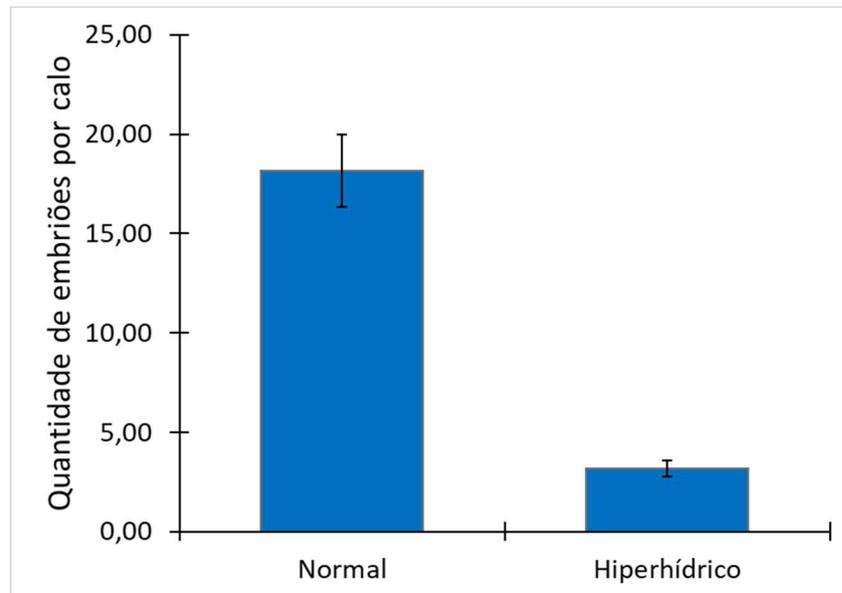


Figura 2. Quantidade de embriões somáticos diferenciados por calo quanto ao aspecto normal e hiperhídrico em um híbrido interespecífico de palma de óleo (*Elaeis oleifera* × *E. guineensis*).

Acerca da germinação, a média de plantas por explante dos *clusters* de embriões normais foi de 11,0 com erro padrão de 1,159. Os resultados são similares às taxas de regeneração de alguns trabalhos anteriores com embriogênese somática de palma de óleo (KONAN et al., 2010; THUZAR et al., 2011; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013). Dentre os embriões hiperhídricos aleatorizados, não foi observada a presença de germinação, por isso, não foi feita uma análise comparativa entre eles.

Ao analisar os resultados da histoquímica com azul de toluidina, percebe-se que os embriões somáticos normais (Figura 3 A-C) apresentaram uma maior razão de núcleo: citoplasma em relação aos embriões somáticos hiperhídricos (Figura 3 D-F). Pode-se notar também, que a anormalidade provocou um aumento nos espaços intercelulares em relação ao grupo normal. Como visto nos trabalhos de Rojas-Martinez e Visser e Klerk (2010), Dries e colaboradores (2013) e Tian, Jian e Wu (2015), a hiperhidricidade promoveu uma maior quantidade de espaços intercelulares, os quais podem ser preenchido com água (GAO et al.,

2022), além de uma substituição de ar por água na região apoplástica da célula (DRIES et al., 2011).

Porém, em ambos os casos, a formação da protoderme e do procâmbio foram identificadas. Em brotos de cravo hiperhídricos foram notadas anormalidades na formação dos feixes vasculares e do procâmbio em cortes anatômicos (ZIV, 1991). A presença de AG₃ em sementes, melhorou o desenvolvimento no crescimento normal de *Beta vulgaris* L., bem como rendimento de raiz, porcentagem de açúcares, pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b* e carotenóides), conteúdo de água relativa, pressão osmótica foliar e os caracteres anatômicos sob condições de estresse hídrico (AZAB, 2018).

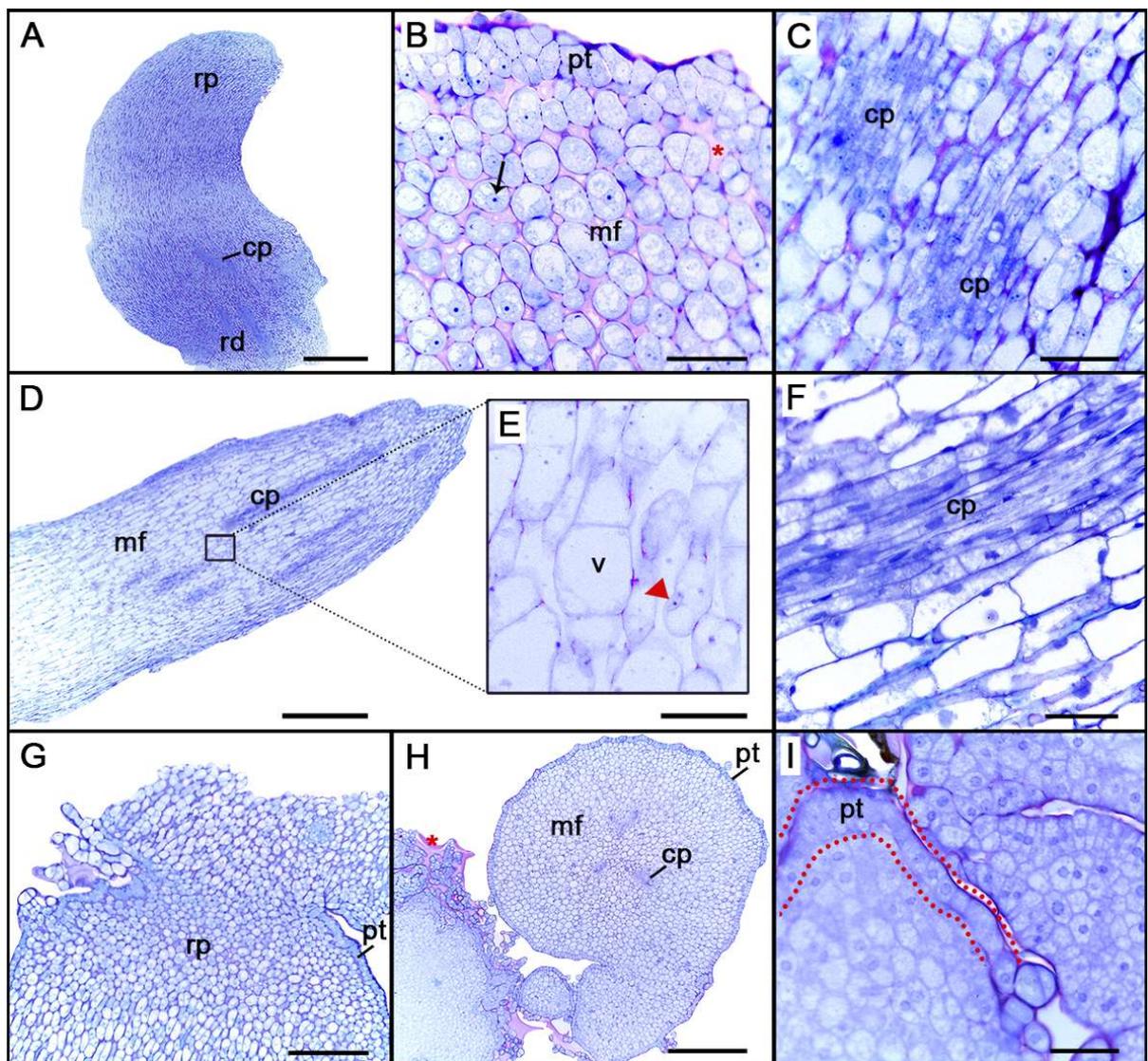


Figura 3. Análise histoquímica de embriões somáticos hiperhídricos e normais de de um híbrido interespecífico de palma de óleo (*Elaeis oleifera* × *E. guineensis*) com Azul de Toluidina. **A-C:** Embriões somáticos normais em corte longitudinal. **D-G:** Embriões somáticos hiperhídricos em corte longitudinal. **H:** Embrião somático normal em corte

transversal. **I**: Embrião somático hiperhídrico em corte transversal. Abreviações: pd: Protoderme. cp: Procâmbio. rd: Região Distal. rp: Região Proximal. v: vacúolo. n: Núcleo. Barras: A = 500 µm, B, C, E, F, I = 50 µm, D, H = 500 µm e G = 200 µm. * = mucilagem, ponta de seta = núcleo.

Na Figura 3G observa-se que, apesar do embrião somático ser hiperhídrico, o mesmo apresenta características similares aos embriões somáticos normais (Figura 3H), visto a densidade citoplasmática e os espaços intercelulares. Dentre os seis calos hiperhídricos analisados, este foi o único que apresentou tal estruturação. Alguns trabalhos demonstraram que é possível a reversão da hiperhidricidade com a utilização de melhor ventilação e alteração de gelificante (TSAY et al., 2006; IVANOVA; STADEN, 2010; PALHARES-NETO et al., 2018), utilização de AgNO₃, (VINOTH; RAVINDHRAN, 2015; GAO et al., 2017; SREELEKSHMI; SIRIL, 2020; LI et al., 2022) e de reguladores de crescimento como ácido salicílico (HASSANNEJAD, 2012; BERNARD; NAVAB-MOGHADAM; MIRZAJANI, 2015; LIU et al., 2017) e meta-topolina-ribosídeo (ABDOULI et al., 2022). No trabalho de Doi e colaboradores (2010) embriões somáticos que foram transplantados para o meio com AG₃ conseguiram reverter a anormalidade e se regenerar por completo, entretanto os autores não destacam no texto qual tipo de anormalidade foi observada durante o experimento.

Acerca das análises histoquímicas de amido e proteína foi possível perceber que os embriões somáticos normais (Figura 4 A-D) apresentaram quantidades maiores de reservas nutricionais, em relação ao grupo hiperhídrico (Figura 4 E-F). Além disso, não foi evidenciado em nenhum embrião somáticos anormal a presença de amido, apenas de proteínas.

Em relação às atividades do amido, Eliášová et al. (2022) citam que diversos carboidratos não estruturais têm diversas funções dentro das plantas, dentre elas, destaca-se o papel de agente de controle osmótico, regulação gênica e nas vias de sinalização. Com isso, os grãos de amido aparentes nos embriões somáticos normais podem ter um papel no controle impedindo o acúmulo de água do apoplasto (DRIES et al., 2013) ou regulando as modificações epigenéticas que podem causar a hiperhidricidade (GAO et al., 2022). Entretanto, a presença de grão de amidos em embriões somáticos de palmeiras da família Arecaceae não são comuns (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2020).

Ao analisar a germinação, os grãos de amidos presente em embriões zigóticos de palmeiras estão relacionados a um processo de germinação mais acelerado e eficaz, podendo está ligado a recalcitrância de algumas sementes desta espécie (OLIVERA et al., 2013). O AG₃ no processo de germinação e quebra dos grãos de amido da camada de aleurona é

fundamental para o desenvolvimento do embrião (BEWLEY et al., 2013). Na pesquisa de Kok, Meilina e Parameswari (2015) para entender o papel do endosperma de palma de óleo, identificou-se uma grande quantidade de polissacarídeos de parede, além de abundância proteica e lipídica.

Ao analisar a quantidade de proteínas pelo teste histoquímico, percebe-se um déficit na quantidade de proteínas totais nos embriões somáticos hiperhídricos, visto que essa anormalidade pode causar mudanças na biossíntese de aminoácidos e, conseqüentemente, uma baixa taxa protéica (KEVERS et al., 2004). Além disso, o grande acúmulo de água pode causar mudanças estruturais nas enzimas e nas vias metabólicas de produção de proteínas (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022).

Em palmeiras, os embriões zigóticos apresentam grande quantidade de reservas de proteínas, que podem estar relacionados com o desenvolvimento da semente até sua fase de independência fotossintética (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017; DIAS et al., 2018; DIAS et al., 2020; FERREIRA et al., 2020). No estudo de Ribeiro e colaboradores (2019), identificou-se que um balanço de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo são necessárias para suportar os diversos estresses causados pela embriogênese somática e ter uma taxa balanceada de oxidação. Além disso, percebe-se uma grande relação entre a hiperhidricidade e superexpressão de genes ligados a atividade antioxidante como catalase e superóxido dismutase (BAKIR et al., 2016; MUNEER et al., 2017; SOUNDARARAJAN et al., 2017).

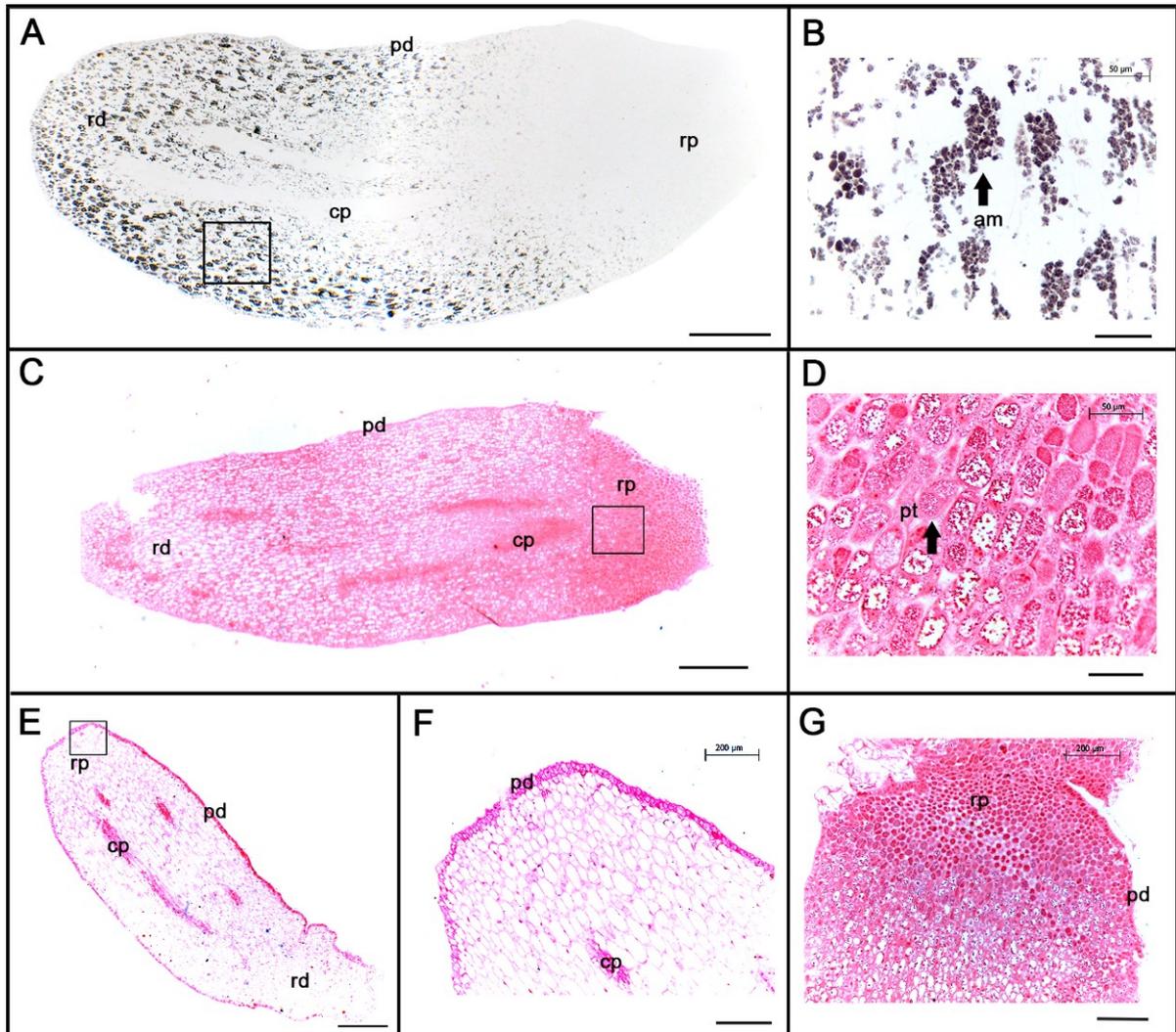


Figura 4. Análise histoquímica de embriões somáticos Hiperhídricos e Normais de um híbrido interespecífico de palma de óleo (*Elaeis oleifera* × *E. guineensis*) com Lugol e XP. **A-B:** Embriões somáticos Normais em corte longitudinal corados com Lugol. **C-D:** Embriões somáticos Normais em corte longitudinal corados com XP. **E-G:** Embrião somático Hiperhídrico em corte longitudinal corado com XP. Abreviações: pd: Protoderme. cp: Procâmbio. rd: Região Distal. rp: Região Proximal. v: vacúolo. n: Núcleo. Barras: A e C: 500μm.

A distribuição das reservas no embrião somático normal ocorreu de forma que o amido se concentrou na região distal, enquanto que as proteínas concentraram-se na região proximal das amostras. Assim como na análise com azul de toluidina, apenas um embrião somático hiperhídrico apresentou presença de proteínas similares às observadas nos embriões somáticos normais (Figura 4G). Com estas observações, percebe-se que as reservas nos embriões somáticos são importantes no embrião somático normal em relação ao vitrificado, e o mesmo

acontecesse no embrião zigótico de palma de óleo (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020). Além disso, as análises histoquímicas foram fundamentais para compreender melhor a qualidade fisiológica de embriões somáticos (SILVA-CARDOSO et al., 2019). Com este estudo, é possível compreender melhor a etapa de diferenciação e germinação visto que os conhecimentos acerca da competência e qualidade embriogênica com análises histológicas em palmeiras é deficitário (SILVA-CARDOSO; GOMES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2022).

Em consonância ao visto na histoquímica, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou resultados similares como a presença de vacúolos maiores e mais espaços intercelulares nos embriões hiperhídricos (Figura 5). Entretanto, foi possível observar a presença de amido nos embriões hiperhídricos, diferentemente do visto na histoquímica. Os dois embriões apresentam organelas citoplasmáticas, núcleo e nucléolo, demonstrando uma alta atividade metabólica nos embriões.

Destacado de vermelho na Figura 5C, há a possibilidade de serem proteínas e concordar com o visto na histoquímica, tendo mais proteínas no embriões normais. Porém, no teste de tetrazólio os explantes que ficaram mais corados de preto apresentaram mais lipídios, e houve uma alta concentração de pigmentação nos embriões normais em relação aos anormais que estavam sem coloração. Portanto, o destacado em vermelho pode ser a presença de lipídios como conteúdo de reserva já que a planta estudada é uma oleaginosa. De acordo com Cui Lamade e Tcherkez (2020), a presença de lipídios pode ser um fator importante para melhor germinação de sementes de dendezeiro. Visto que o trabalho busca uma melhorar a clonagem de palma de óleo para produção de larga escala do óleo vegetal, a presença de lipídios no embrião sugere uma boa relação dos embriões normais para desenvolvimento de uma planta saudável com as características desejadas.

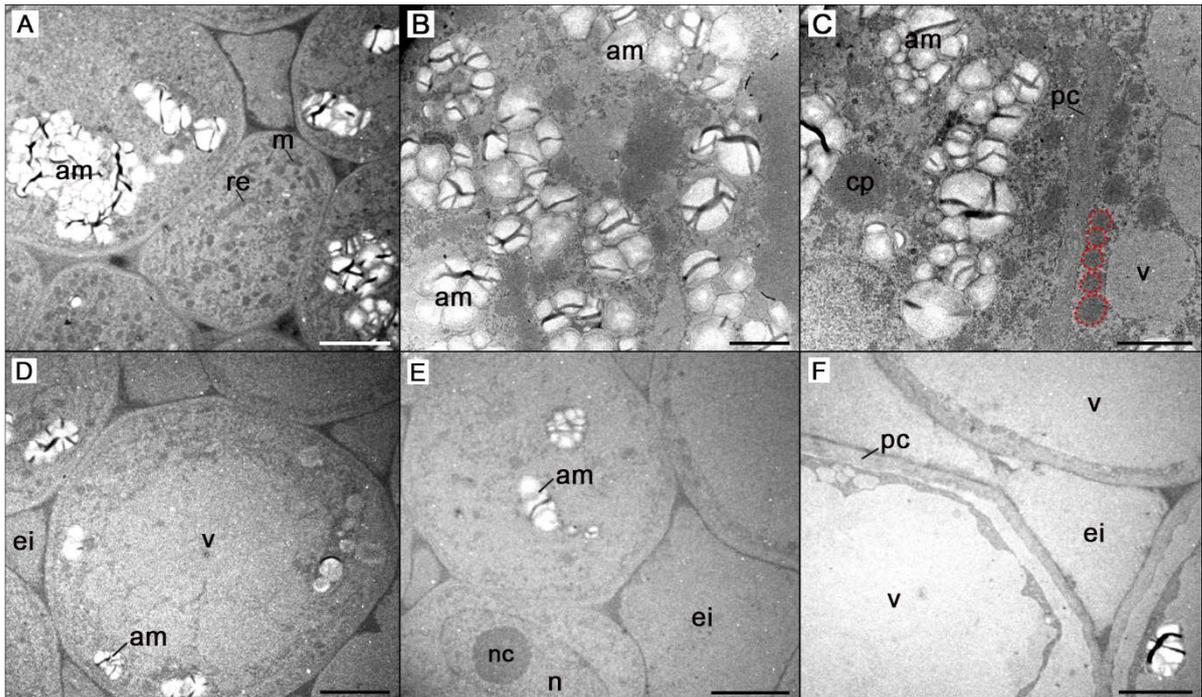


Figura 5. Caracterização de células de embriões somáticos normais de palma de óleo (*Elaeis oleifera* × *E. guineensis*) (A-C) e anormais - hiperídricos (D-F). **A.** Células ricas em organelas (mitocôndria e retículo endoplasmático) e amiloplastos. **B, C.** Células com abundância de reservas (amiloplastos e corpos proteicos – pontilhado vermelho). **D-E.** Células com vacúolos proeminentes, amiloplastos residuais e grandes espaços intercelulares. Abreviações: am, amiloplasto; ei, espaço intercelular; m, micotcôndria; nc, nucléolo; n, núcleo; pc, parede celular; re, retículo endoplasmáticos e v, vacúolo. Barras: A, D = 5 mm, B, C, E, F = 2 mm.

4 CONCLUSÕES

Acerca da germinação, a hiperhidricidade apresentou taxas próximas do 0 de germinação, demonstrando que a anormalidade que causa acúmulo de águas nos tecidos vegetais pode comprometer o desenvolvimento tanto do embrião somático quanto do desenvolvimento da planta;

Analisando os aspectos histológicos e anatômicos por microscopia óptica e de transmissão, foi observado que os embriões somáticos normais apresentam melhor qualidade fisiológica visto uma maior abundância proteica, de amido e células menos vacuoladas. A distribuição de proteínas e amido foi distinta, sendo que a região distal continha mais amido e a região proximal com uma maior concentração proteica. Além disso, os embriões somáticos hiperídricos apresentaram maior espaços intercelulares e nenhuma reserva de amido para seu desenvolvimento. Entretanto, observou-se que alguns embriões anormais apresentaram características semelhantes aos normais, demonstrando uma possível

capacidade de reversão da hiperhidricidade. Apesar do observado, os embriões hiperhídricos apresentam núcleo e organelas definidas, demonstrando uma alta atividade metabólica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOULI, D.; PLAČKOVÁ, L.; DOLEŽAL, K.; BETTAIEB, T.; WERBROUCK, S. P. Topolin cytokinins enhanced shoot proliferation, reduced hyperhydricity and altered cytokinin metabolism in *Pistacia vera* L. seedling explants. **Plant Science**, v. 322, p. 111360, 2022.

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

AZAB, E. Seed Pre-soaking on Gibberellic Acid (AG3) Enhance Growth, Histological and Physiological Traits of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L) under Water Stress. **Egyptian Journal of Agronomy**, v. 40, n. 2, p. 119-132, 2018.

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

BARCELOS, E.; RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; MOTOIKE, S. Y.; BABIYCHUK, E.; SKIRYCZ, A., KUSHNIR, S. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 190, 2015.

BAYRAKTAR, M.; HAYTA-SMEDLEY, S.; UNAL, S.; VAROL, N.; GUREL, A. Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive (*Olea europaea* L.) cultivar 'Gemlik'. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 264-273, 2020.

BERNARD, F.; NAVAB-MOGHADAM, N.; MIRZAJANI, F. The effect of colloidal silver nanoparticles on the level of lignification and hyperhydricity syndrome in *Thymus daenensis* vitro shoots: a possible involvement of bonded polyamines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, p. 546-553, 2015.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. Springer Science & Business Media, 2013.

CORLEY, R.; TINKER, P. **The oil palm**. 5ª Edição. Chicester, Reino Unido: Wiley Blackwell. 2016.

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

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

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

DOI, H.; TAKAHASHI, R.; HIKAGE, T.; TAKAHATA, Y. Embryogenesis and doubled haploid production from anther culture in gentian (*Gentiana triflora*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** , 102, 27-33, 2010.

DRIES, N. V. D.; KRENS, F. A.; GIANNÌ, S.; KLERK, G. J. M. Volumes of apoplastic water and air in hyperhydric leaves of *Arabidopsis thaliana* seedlings. In: **VII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 961**. p. 519-524, 2011.

DRIES, N. V. D.; GIANNÌ, S.; CZEREDNIK, A.; KRENS, F. A.; KLERK, G. J. M. Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 16, p. 5221-5230, 2013.

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

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

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

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA-SCHERWINSKI, J. E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, p. 1-19, 2022.

FEROLDI, M.; CREMONEZ, P. A.; ESTEVAM, A. Dendê: do cultivo da palma à produção de biodiesel. **Revista Monografias Ambientais**, p. 3800-3808, 2014.

- FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, J. M. G.; PEDRO, L. M. G.; ASCENSÃO, L. Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos. **Cell Response**, v. 11, p. 640-643, 2007.
- FRANCK, T.; KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J.; DEBY, C.; GREIMERS, R.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 519-527, 2004.
- GANTAIT, S0; MAHANTA, M. Hyperhydricity-induced changes among in vitro regenerants of gerbera. **South African Journal of Botany**, v. 149, p. 496-501, 2022.
- GAO, H.; XIA, X.; AN, L.; XIN, X.; LIANG, Y. Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during in vitro culture. **Plant Science**, v. 254, p. 1-11, 2017.
- GAO, H.; LI, J.; JI, H.; AN, L.; XIA, X. Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*Vaccinium spp.*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, p. 65-76, 2018.
- GAO, H.; XIA, X.; AN, L. Critical roles of the activation of ethylene pathway genes mediated by DNA demethylation in Arabidopsis hyperhydricity. **The Plant Genome**, p. 1-16, 2022.
- GARCIA, C.; CORRÊA, F.; FINDLEY, S.; ALMEIDA, A. A.; COSTA, M.; MOTAMAYOR, J. C.; SCHELL, R.; MARELLI, J. P. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1936-1951, 2016.
- GARCIA, C.; ALMEIDA, A. A. F.; COSTA, M.; BRITTO, D.; VALLE, R.; ROYAERT, S.; MARELLI, J. P. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 193-212, 2019.
- GLIMN-LACY, J.; KAUFIMAN, P. B. Plant family (*Arecaceae*). In: **Botany Illustrated – Introduction to plants, major groups, flowering plant families**. p 125–126, 2006.
- GOMES, H T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 244-249, 2016.
- HASSANNEJAD, S.; BERNARD, F.; MIRZAJANI, F.; GHOLAMI, M. S. A improvement of hyperhydricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 40-46, 2012.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia horticulturae**, v. 108, n. 2, p.105-120, 2006.

- IVANOVA, M.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; VAN STADEN, J. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured in vitro in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. **Plant Growth Regulation**, v. 50, p. 219-230, 2006.
- IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 227-231, 2008.
- IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, v. 60, p. 143-150, 2010.
- KARNOVSKY, M. J. A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 181-191, 2004.
- KOK, S.; MEILINA, O. A. E. C.; PARAMESWARI, N. A histological study of oil palm (*Elaeis guineensis*) endospermas during seed development. **Journal of Oil Palm Research**, v. 27, n. 2, p. 107-112, 2015.
- KONAN, K. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, J. Y.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIE, C. 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**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010.
- KRISHNA, H.; ALIZADEH, M.; SINGH, D.; SINGH, U.; CHAUHAN, N.; EFTEKHARI, M.; SADH, R. K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-18, 2016.
- LI, L.; AN, Q.; WANG, Q. M.; LIU, W.; QI, X.; CUI, J.; WANG, Y.; KE, H. The mechanism of bud dehyperhydricity by the method of 'starvation drying combined with AgNO₃' in *Lycium ruthenicum*. **Tree Physiology**, v. 42, n. 9, p. 1841-1857, 2022.
- LIU, M.; JIANG, F.; KONG, X.; TIAN, J.; WU, Z.; WU, Z. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. **Scientia Horticulturae**, v. 217, p. 285-296, 2017.
- LOW, E. L.; ALIAS, H.; BOON, S.; SHARIFF, E. M.; TAN, C. A.; OOI, L. C. L.; CHEAH, S. RAHA, A.; WAN, K.; SINGH, R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology**, v.8, p.1-19, 2008.
- MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; BATISTA, D. S.; NAPOLEÃO, T. A.; FORTINI, E. A.; CRUZ, A. C. F.; COSTA, M. G. C.; OTONI, W. C. Regulation of cell wall development in *Brachypodium distachyon* in vitro as affected by cytokinin and gas exchange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, p. 207-219, 2019.

- MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L.M.; OLIVEIRA, D. M. T. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. **Protoplasma**, v. 254, p. 1563-1578, 2017.
- MEIRA, F. S.; LUIS, Z. G.; SILVA-CARDOSO, I. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Developmental pathway of somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) revealed by histological events. **Flora**, v. 250, p. 59-67, 2019.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCANDANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F.O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 1633-1645, 2013.
- PÁDUA, M. S. **Germinação in vitro, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Tese de mestrado, 118 p, 2012.
- PALHARES-NETO, L.; SOUZA, L. M.; MORAIS, M. B.; ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; ULISSES, C. Controlling hyperhydricity in micropropagated plants of *Lippia grata* Schauer (Verbenaceae), a native species of a dry seasonal tropical forest with pharmacological potential. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 529-538, 2018.
- PASQUALETTO, P.-L.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 14, p. 31-40, 1988.
- POLIVANOVA, O. B.; BEDAREV, V. A. Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3313, 2022.
- RIBEIRO, D. G.; ALMEIDA, R. F.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; SOUSA, M. V.; RICARTO, C. A. O. R.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. **Journal of proteômica**, v. 192, p. 137-146, 2019.
- ROJAS-MARTÍNEZ, L.; VISSER, R. G.; KLERK, G. J. The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. **Propag Ornament Plants**, v. 10, n. 4, p. 169-175, 2010.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; FERMINO, P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, n. 4, p. 378-395, 2010.
- SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomical and histochemical studies of the somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea*

from immature inflorescences. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 444-450, 2019.

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020.

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

SOUNDARARAJAN, P.; MANIVANNAN, A.; CHO, Y. S.; JEONG, B. R. Exogenous supplementation of silicon improved the recovery of hyperhydric shoots in *Dianthus caryophyllus* L. by stabilizing the physiology and protein expression. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 738, 2017.

SREELEKSHMI, R.; SIRIL, E. A. Influence of polyamines on hyperhydricity reversion and its associated mechanism during micropropagation of China pink (*Dianthus chinensis* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 26, p. 2035-2045, 2020.

THUZAR, M.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, S.; JANTASURIYARAT, C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 123-128, 2011.

TIAN, J.; JIANG, F.; WU, Z. The apoplastic oxidative burst as a key factor of hyperhydricity in garlic plantlet in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, p. 571-584, 2015.

TOAIMA, N.; BOSILA, H.; EL-ATEEQ, A. A. In vitro growth regulators, gelling agents and sucrose levels affect micropropagation of *Gypsophila paniculata* L. **Middle East J. Agric. Res.**, v. 5, p. 313-323, 2016.

TSAY, H. S.; LEE, C. Y.; AGRAWAL, D. C.; BASKER, S. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* a medicinal plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 445-449, 2006.

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

VINOTH, A.; RAVINDHRAN, R. Reduced hyperhydricity in watermelon shoot cultures using silver ions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, p. 258-264, 2015.

ZANG, D.; SHI, P.; HTWE, Y. M.; LI, Z.; IHASE, L. O.; MASON, A. S.; SUN, X.; XIAO, Y.; WANG, Y. Caffeate may play an important role in the somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Industrial Crops & Products**, v. 174, p. 114143, 2021.

ZIV, M. Quality of micropropagated plants—vitrification. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 27, p. 64-69, 1991.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro; implications for hardening. **Plant Science**, v. 52, n. 1-2, p. 127-134, 1987.

CAPÍTULO 3

EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES SOMÁTICOS NORMAIS E HIPERHÍDRICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis spp.*)

EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES SOMÁTICOS NORMAIS E HIPERHÍDRICOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis spp.*)

RESUMO

A palma de óleo é a planta oleaginosa com maior produção de óleo vegetal na atualidade. Para propagação de genótipos com alta produtividade, a embriogênese somática é a técnica utilizada devido à falta de perfilhos e não homogeneidade na produção via semente. Porém, a anormalidade da hiperhidricidade é comum no cultivo in vitro de espécies vegetais e prejudica a formação de plantas completas e saudáveis. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diferença na expressão gênica em embriões somáticos normais e hiperhídricos de palma de óleo, os quais foram submetidos a um tratamento de diferenciação com ácido giberélico. Um total de 19 genes potencialmente envolvidos na hiperhidricidade foram selecionados a partir da literatura e primers foram desenhados utilizando o software Primer3plus. Três réplicas biológicas de cada condição foram utilizadas para extração do RNA por meio de Trizol (Invitrogen) e purificado em coluna RNAeasy. Após a purificação, foi feita a síntese do cDNA utilizado para análise de RT-qPCR em termociclador 7300 96-well Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Os resultados revelaram que dos 19 genes, 17 apresentaram expressão gênica diferencial nos embriões hiperhídricos. Os genes envolvidos na resposta de estresse, metabolismo energético, defesa, transporte por membrana, regulação hormonal e desenvolvimento apresentaram-se regulados positivamente, com destaque para a síntese e transporte de etileno. O acúmulo de etileno e EROs demonstram ter um papel fundamental na hiperhidricidade de tecidos vegetais, porém o mecanismo inicial que gera a anormalidade ainda não está claro. No presente estudo, o aumento do metabolismo energético pode influenciar na produção de açúcares solúveis que puxam água para dentro da célula. Com isso, o conhecimento obtido neste trabalho pode contribuir para uma maior eficácia no protocolo de embriogênese somática, ao diminuir as condições que podem gerar a hiperhidricidade em embriões somáticos de palma de óleo e em estudos acerca da anormalidade na cultura de tecidos vegetais.

Palavras chave: Areaceae, vitrificação, regeneração, expressão de genes

1. INTRODUÇÃO

Os dendezeiros são palmeiras de regiões tropicais, com folhas perenes e grande produção de óleo vegetal no mundo (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020). Existem duas espécies do gênero que pertencem à família *Arecaceae*: o Africano, *Elaeis guineensis* Jacq. e o dendezeiro americano, *Elaeis oleifera* (Kunth) (TOW et al., 2021). Ambas as espécies atualmente são utilizadas para produção de óleo vegetal, sendo que o dendezeiro africano é o principal na produção de óleo de palma (TOW et al., 2021).

Não obstante, o maior produtor de óleo de palma mundial é o híbrido entre as duas espécies *Elaeis*, que gera uma variedade de fruto denominado *tenera* (BABU et al., 2017). Para multiplicação deste genótipo superior, a técnica mais utilizada é a embriogênese somática, visto que a propagação por sementes pode causar perdas de características de interesse (ALMEIDA et al., 2020; BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; BARCELOS et al., 2015; ZANG et al., 2021).

A técnica da embriogênese somática permite a clonagem de plantas a partir de tecidos não reprodutivos, mantendo as características necessárias do indivíduo (HORSTMAN et al., 2017). Apesar das vantagens, o protocolo de embriogênese somática é custoso (GOMES et al., 2016) e pode produzir anormalidades no processo de desenvolvimento da planta (GARCIA et al., 2019). Dentre os tipos de anormalidades, podemos citar que na embriogênese somática um dos mais comuns é a variação somaclonal (GARCIA et al., 2019), e no cultivo *in vitro*, a hiperhidricidade (GAO et al., 2017; KEVERS et al., 2004).

Ao analisar a anormalidade da hiperhidricidade, as plantas apresentam aspecto translúcido, com grandes quantidades de água, causando problemas fisiológicos, anatômicos e morfológicos para as plantas (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022). A hiperhidricidade também pode causar alterações nos níveis protéicos como aumento dos canais de absorção de água (GAO et al., 2022), aumento de proteínas antioxidantes (BAKIR et al., 2016; MUNEER et al., 2017). Alguns estudos de embriogênese somática em palmeiras relataram que a oxidação dos explantes pode ser um indicativo para formação de calos (FERREIRA et al., 2022; RIBEIRO et al., 2019), porém pode também ocasionar a hiperhidricidade.

Além do problema da oxidação na embriogênese somática em relação a hiperhidricidade, outro ponto a ser debatido é a variação somaclonal que ocorre nas etapas da técnica de propagação (GARCIA et al., 2019). No estudo de Gao e colaboradores (2022), foram identificadas modificações epigenéticas nas plantas que apresentaram hiperhidricidade, como alteração nos genes transportadores de etileno.

Neste contexto, é necessário estudar as variações de expressões gênicas em embriões somáticos de palma de óleo normais e hiperhídricos para identificar os possíveis responsáveis pela hiperhidricidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica diferencial de genes potencialmente envolvidos na hiperhidricidade em embriões somáticos de palma de óleo submetidos ao tratamento com AG₃.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de embriões

Os embriões foram submetidos ao tratamento com o regulador de crescimento AG₃, adicionado a uma concentração de 1 mg/L no meio de cultura de diferenciação, conforme descrito no Capítulo 1. Foram coletadas três amostras biológicas de embriões de palma de óleo, incluindo embriões normais e hiperhídricos, e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, os explantes foram macerados e armazenados a -80°C.

2.2 Seleção de genes candidatos e desenho de *primers*

Um total de 19 genes potencialmente envolvidos na hiperhidricidade foram selecionados a partir da literatura, além de 2 genes referência (Tabela 1). Após a seleção dos genes, os acessos das sequências dos genes foram utilizados para a obtenção das sequências *FASTA* no banco de dados NCBI. Posteriormente, estas sequências foram utilizadas para buscar no NCBI os genes ortólogos para a palma de óleo 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.

O software *Primer3plus* foi usado para desenhar os *primers*. Os parâmetros utilizados para o desenho dos *primers* foram: temperatura média de 57°C a 63°C para cada *primer*, tamanho dos *primers* de 20 nucleotídeos e tamanho do *amplicon* entre 110-150 pb. A ausência de amplificação e produtos inespecíficos foram avaliados utilizando o software *OligoAnalyzer* 3.1.

Tabela 1. Informações gerais sobre os genes selecionados para análise de expressão gênica nos embriões de palma de óleo.

Gene	GenBank Access	Gene name	Forward Primer (5' to 3')	TM °C	Reverse Primer (5' to 3')	TM °C	Amplicon	Primer Efficiency (%)
<i>RAB18</i>	XM_010913239.3	Ras-related protein RABC1	CCAACCTTGCTGATGTATGG	59.0	GTCAATGCCCTCCTTCTTTG	59.7	131	85
<i>PIP2</i>	XM_010921795.3	Aquaporin PIP2-6	TCCAGTCACAGAACGACCAG	59.9	AATATGACCCCCAGAGATGC	58.8	116	84
<i>NADHU2</i>	XM_010936925.2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 2	TACAACGGGTACACCATCCA C	60.5	ACGCCAACCCAAAACCTACAG	60.0	129	84
<i>ENO1</i>	XM_010909626.2	Enolase-like	GTCAGCGAGTACCCCATTTGT	60.0	TCGTCTCCAACAATCTGCAC	59.8	113	87
<i>ETR1</i>	XM_010923296.3	ethylene response sensor 1	AATGGGCTTGATACGGACAC	59.8	AGTGCACATTCTCCAAACC	60.0	147	87
<i>ETR2</i>	XM_010934797.3	ethylene receptor 2	TTTGGTCATGAGACCCTTCC	59.8	TCAGGCACTGCATTGTCAAC	60.9	120	91
<i>ERF014</i>	XM_010941081.3	ethylene-responsive transcription factor	AATGACCCAGCCATAACAG	59.8	TGGTTTGGTGCTCTGATCTC	58.8	119	86
<i>ERF113</i>	XM_010932645.3	ethylene-responsive transcription factor ABR1	TGCCGAACACTTCTTCACTG	60.0	CCCCCTAAAGGATAATGCAG	58.5	124	87
<i>SAM</i>	XM_010923038.2	S-adenosylmethionine synthase	TGATGAGATTGCTGCTGACC	60.0	ACCGATGACAAAACGACCAG	61.0	115	86
<i>PRB13L1</i>	LOC105061570	pathogenesis-related protein PRB1-3-like	CCCCAAAACCTCCCAACAAGA	60.9	ATTCTGCTGGTTGGCGTAGT	60.7	124	79
<i>RGA3</i>	XM_010933512.1	putative disease resistance protein RGA3	AACCCCTCACGAAGTGATTG	60.0	AGGACAACAAAACCCGAAGC	61.4	111	87
<i>SERK2</i>	XP_010916943.1	Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1+	GCATCACCTTCCGAGTTAGC	55.8	TCGTATGGATCTGGGGAGAC	55.6	153	588
<i>EIF4A</i>	GAJH01015579.1	Eukaryotic Initiation factor 4 ^a *	ATTAGGATGTTGTGCTGGA T	81,72	CTCAGGAGGCATTGTGGC	81.7	132	80
<i>ANN1</i>	XM_010941329.2	Annexin D1	GTCATAGCCACTCGTGCTGA	60.0	CTCCAGAAGTGTCGCCCTTA	60.4	106	81
<i>CAT1</i>	XM_010919942.3	Catalase isozyme 1	CCCGTTTGAACAACAACCTC	60.4	CCTCTTGATGAACAACACG	60.3	134	85
<i>LOC105037251</i>	XM_010912937.2	superoxide dismutase [Cu-Zn]	GCTTCATGGCTTCCATGTTT	60.6	AGTCGCATCCCAAGATCAC	60.1	142	53
<i>LOC105039936</i>	XM_019847951.2	cytochrome c oxidase subunit 5C-1	CAGTGTGTTGTGCTGTAAG	58.2	CGATGGTCCAACCACAAAAC	61.2	114	84
<i>CAT2</i>	NM_001319913.1	Catalase isozyme 2	ATTGGGATCTCTGGGAAAC	60.1	ACTCCTGGATGTGGGACTTG	60.0	111	88
<i>PER12</i>	XM_010912689.3	peroxidase 12-like	ATAGCCTCACCTTCGCCTCT	60.4	GGTGGTGTGAGGTTGATCT	60.0	110	85
<i>PD00380</i>	EY397675	Predict 40S ribosomal protein S27-2 *	GATGGTCTTCCGAACGATA TTGA	63.0	TCACATCCATGAAGAATGAGTTC G	63.0	113	82
<i>PD00569</i>	EL682210	Manganese superoxide dismutase *	ACCACCAGACGTACATCACA AA	60.0	CGATATGACCTCCGCCATTGAACT	60.0	129	80

*genes referência para normalização dos resultados

2.3 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi conduzida utilizando o método Trizol (Invitrogen), conforme descrito por Santos e colaboradores (2018) com algumas modificações. Aproximadamente 0,1 g de material vegetal foi utilizado, ao qual foi adicionado 1 mL de reagente Trizol, complementado com 1% de β -mercaptoetanol (mantido a 4°C). As amostras foram homogeneizadas durante 1 minuto usando um agitador de tubos tipo vortex. Após a homogeneização, os tubos foram mantidos em gelo por 5 min e, em seguida, centrifugados a $16128 \times g$ por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 2 mL e 300 μ L de clorofórmio foram adicionados para a separação de fases. As amostras foram incubadas novamente em gelo por 3 min e homogeneizadas por 1 min em um vortex. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 15 min a $16128 \times g$ a 4°C. Em seguida, a fase aquosa foi coletada e foram adicionados 500 μ L de isopropanol (mantido a 4°C) para precipitar os ácidos nucleicos. Posteriormente, a amostra foi adicionada na coluna *mini spin RNAeasy* (rosa) e centrifugada por 15 segundos a $16128 \times g$. Em seguida, foram adicionados 350 μ L de tampão RW1 na coluna rosa. Após aguardar por 1 min, houve a centrifugação a $16128 \times g$ por 15 s e a transferência da coluna para um novo tubo de 2 mL presente no kit.

Em seguida, mais 350 μ L de tampão RW1 foram inseridos na coluna rosa e deixados descansar por 1 minuto. Em seguida, nova centrifugação a $16128 \times g$ por 15 segundos e nova transferência da coluna para um novo tubo de 2 mL presente no kit. Após a transferência, adicionaram-se 500 μ L de tampão RPE na coluna e centrifugou-se as amostras a $16128 \times g$ por 15 segundos, descartando o líquido passado pela coluna. Em seguida, 500 μ L de tampão RPE foram adicionados à coluna e centrifugados a $16128 \times g$ por 2 minutos, e o líquido foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL presente no kit da *RNAeasy*.

Por fim, foram adicionados 60 μ L de água *RNAse free* e aguardaram-se 30 minutos à temperatura ambiente para centrifugar a $16128 \times g$ por 1 minuto. A quantificação do RNA isolado foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis - Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a integridade do RNA isolado, as amostras foram analisadas em gel de agarose (agarose 1%; tampão TAE 1X), pré-corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL). Foram aplicados no gel 1 μ L de RNA acrescido de 2 μ L de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) (Invitrogen). Como marcador molecular, foi utilizado o 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 minutos. Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

2.4 Tratamento de RNA total e Síntese de cDNA

Após a purificação do RNA total, realizou-se o tratamento com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. Foi adicionado 4 µg de RNA total, 2 µL de tampão 10x *reaction buffer*, 1 µL da enzima Turbo™ DNase (Applied Biosystems/Ambion) e completado o volume final com água livre de RNase para 20 µL. As amostras foram incubadas por 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.

O cDNA foi sintetizado usando o Kit GO script™ reverse transcription (Kit promega). Para cada reação, foram utilizados 10 µL do RNA tratado (2 µg), 1 µL de oligo (DT), 1 µL de dNTPs, seguido de incubação a 65°C por 5 minutos e em gelo por 5 minutos. 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 a 50°C por 60 minutos para a reação de transcrição reversa (RT) e a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. O cDNA fita simples foi armazenado a -20°C e utilizado para RT-qPCR.

2.5 RT-qPCR

O RT-PCR semi-quantitativo foi utilizado para avaliar os cDNAs sintetizados. As reações foram conduzidas com cDNA diluído 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 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos 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.

A análise da expressão relativa por RT-qPCR baseada na detecção de *SYBR Green* foi projetada para as análises da expressão de 19 genes candidatos com possível envolvimento na aquisição de competência para causar hiperhidrose. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados no termociclador 7300 96-well Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems).

Todas as reações foram compostas por 5 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µL de cada primer 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 minutos para ativação da enzima Taq DNA polimerase (*hot start*), 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos repetidos por 40 ciclos. Para verificar a 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 segundos, 60°C por 60 segundos, aumentando 0,3°C a cada ciclo até atingir 95°C. Todos os experimentos foram realizados utilizando três réplicas biológicas, e para cada réplica biológica, foram utilizadas três réplicas técnicas. Todas as reações de RT-qPCR foram feitas em placas de 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 contaminação com DNA genômico.

Os dados brutos de fluorescência de todas as corridas foram importados para o software Real-time PCR Miner para determinação da eficiência da PCR. Em seguida, foi calculada a média e o coeficiente de variação da eficiência para cada gene, e a expressão gênica foi analisada pelo software Rest. 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 referência. Os valores de Cq, obtidos pelo software Real time PCR Miner, foram convertidos em quantidade relativa não normalizada pelo software REST, comparando os tratamentos hiperidróticos e normais. Os valores de expressão obtidos no REST, onde foi informada a eficiência dos *primers*, os genes normalizadores (*PD005692* e *PD00380*) e as amostras controle. Na análise da expressão relativa de cada gene, o controle utilizado foram os embriões normais sob as mesmas condições dos embriões hiperidróticos. Para determinar as expressões relativas foi realizada análise estatística ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

Neste trabalho, foi realizada a análise da expressão gênica de embriões normais e hiperidróticos visando a identificação de genes potencialmente envolvidas no processo de hiperhidricidade. Um total de 19 genes potencialmente envolvidos na hiperhidricidade foram selecionados da literatura, incluindo *RAB18*, *LOC105037251*, *RGA3* (MUNEER et al., 2017), *PIP2*, *ETR1*, *ETR2*, *ERF014*, *ERF113* (GAO et al., 2022), *NADHU2*, *SAM*, *LOC105039936*

(BAKIR et al., 2016) *ENO1*, *ANN1*, *CAT2*, *SERK2* (SANTOS et al., 2018), *PRB13L1*, *EIF4A*, *PER12* (RIBEIRO et al., 2018) e *CAT2* (SOUNDARARAJAN et al., 2017) (Tabela 1), bem como os genes de referência *PD00380* e *PD00569* (SANTOS et al., 2018) (Tabela 1). A Figura 1 apresenta a expressão gênica relativa de cada um dos genes analisados de embriões hiperhídricos em relação ao grupo controle.

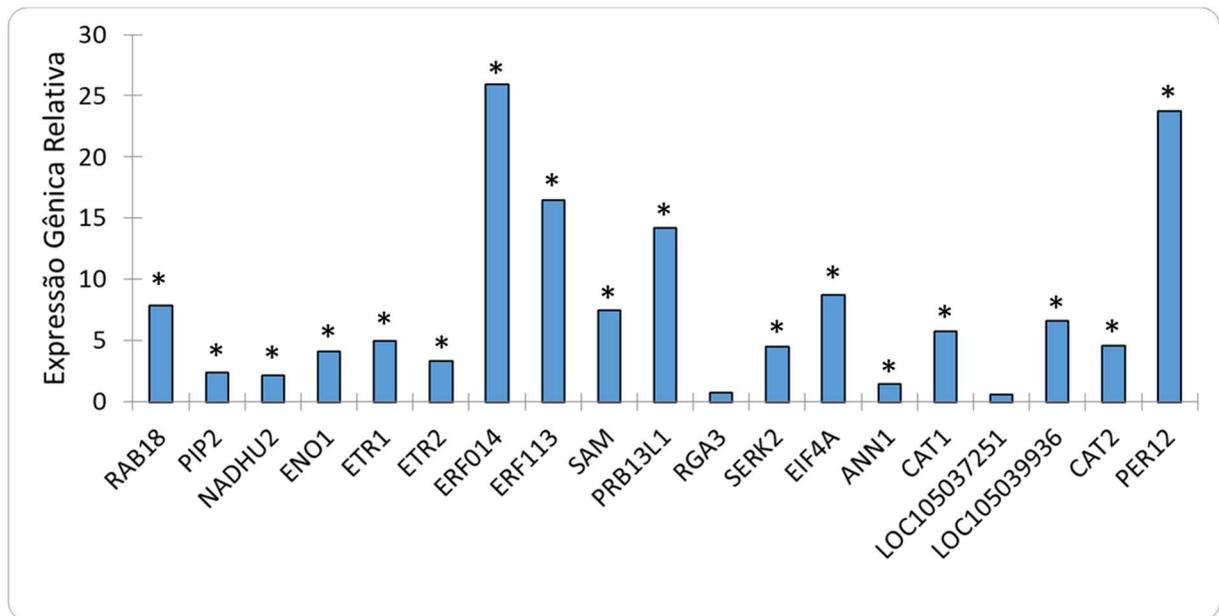


Figura 1. Expressão gênica relativa de genes potencialmente relacionados à hiperhidricidade. *Expressão diferencial estatisticamente significativa.

Ao analisar o gráfico, a expressão de apenas dois genes não foi significativamente diferente: *LOC105037251* e *RGA3*. Dentre os genes com expressão diferencial, todos apresentaram-se regulados positivamente em relação ao grupo controle, demonstrando que estes genes podem ser potenciais genes envolvidos no processo de hiperhidricidade durante a embriogênese somática de palma de óleo. Os genes analisados foram categorizados de acordo com a função biológica que produzem. A função de cada gene foi encontrada no programa QuickGO com base nas análises de Bakir e colaboradores (2016). As categorias foram: Transporte por membrana; Metabolismo energético; Regulação do etileno; Resposta de defesa; Desenvolvimento; Resposta ao estresse. As possíveis funções destes genes no processo de hiperhidricidade serão discutidas abaixo de acordo com seu processo biológico nas vias metabólicas das plantas.

3.1 Resposta de Estresse e Defesa

Sabe-se que os genes antioxidantes são importantes tanto na competência para formação de calos embriogênicos (SANTOS et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019), como no combate ao estresse hídrico, visto que a hiperhidricidade gera muitas espécies reativas de oxigênio (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022). As ERO's diminuem a formação de ATP e as atividades metabólicas das plantas, e, em casos graves, podem prejudicar seriamente o desenvolvimento da planta (TAN; MILLAR; TAYLOR, 2012).

Os genes relacionados ao estresse e defesa de plantas foram regulados positivamente, exceto o gene *LOC105037251* (superoxide dismutase (SOD) [Cu-Zn]), responsável pelo combate ao estresse oxidativo e o *RGA3* (*putative disease resistance protein RGA3*) no combate ao estresse por patógeno. Nos estudos acerca da presença de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo em plantas hiperhídricas, as enzimas *SOD*, *CAT* (catalase) e *GTX* (peroxidases) apresentam-se regulados positivamente (MUNEER et al., 2017; SOUNDARARAJAN et al., 2017).

Na literatura científica, há um consenso de que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são responsáveis, em parte, pela indução de hiperhidricidade da cultura de tecidos vegetais (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022). Para combate ao estresse, as plantas liberam o hormônio do etileno como resposta primária e, posteriormente, há um acúmulo de EROs, no qual estes dois processos se retroalimentam (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022). O acúmulo de água nos tecidos pode levar a hipóxia dos tecidos da planta e aumentar o estresse, com isso, um aumento da produção de EROs, o que leva a danos mais graves às estruturas celulares, que se manifestam como sintomas de hiperhidricidade (JASPERS; KANGASJÄRVI, 2013; TIAN et al., 2017). A grande quantidade de proteínas antioxidantes provavelmente está relacionado com a grande quantidade de EROs nas plantas vítreas.

3.2 Transporte por membrana

A hiperhidricidade é caracterizada pela grande quantidade de água nos tecidos vegetais, e os transportadores de membrana, principalmente as aquaporinas, auxiliam na aquisição desta anormalidade (GAO et al., 2022). Na hiperhidricidade, a ativação e transdução de sinal ativada por hormônios desencadeia a formação de proteínas antioxidantes, como catalase, peroxidase e superóxido dismutase (MUNEER et al., 2017). Para que ocorra o transporte de proteínas em resposta ao estresse, algumas GTPases podem auxiliar no tráfego

para local determinado (CUI et al., 2021). Na embriogênese somática, a utilização de regulares de crescimento altera as transduções de sinais em prol de uma resposta desejada, porém, uma alteração na rede de transporte e sinalização pode prejudicar as via metabólicas de desenvolvimento vegetal (RUGGIERO et al., 2004; ZANG et al., 2021).

Entre os genes categorizados em transporte por membrana destacam-se o *PIP2* (aquaporina) e o *RAB18* (*Ras-related protein RABCI*), com a expressão gênica relativa regulada positivamente (*fold change* de 2 e 7, respectivamente) nos embriões hiperhídricos. As aquaporinas são proteínas relacionadas ao transporte de água e, na anormalidade da hiperhidricidade, as células vegetais apresentam grandes espaços intercelulares e células com grande quantidade de água nos vacúolos (GAO et al., 2018). No estudo de Gao e colaboradores (2022), os pesquisadores demonstraram em *Arabidopsis* a presença de hipometilação de genes ligados a etileno que ativam os canais de água e, conseqüentemente, aumentam a probabilidade do surgimento da anormalidade. Porém, no estudo de Bakir e colaboradores (2016), genes com funções de transporte, dentre eles a aquaporina apresentaram regulação negativa em folhas hiperhídricas de pessegueiro. A hipótese é de que na aquisição da anormalidade os tecidos vegetais abrem os canais de água e a hiperhidricidade ocorre. Em decorrência deste estresse, as enzimas antioxidantes e o hormônios podem regular a transcrição das aquaporinas para baixo para diminuir os danos causados pelo estresse hídrico.

As proteínas Rab são pequenas proteínas GTPases que desempenham um papel crucial no tráfego intracelular de vesículas e no direcionamento de proteínas para locais específicos dentro da célula (CUI et al., 2021). Em um trabalho com objetivo de reduzir a hiperhidricidade com introdução exógena de Silício (Si), as plantas hiperhídricas apresentaram genes relacionados ao transporte e transdução de sinal, dentre elas, proteínas da família Rab, regulados positivamente (MUNEER et al., 2017). Pelo estresse causado pela hiperhidricidade, as plantas começam a produção de enzimas antioxidantes para combate à formação de espécies reativas de oxigênio (TIAN et al., 2017). Portanto, a ativação de proteínas de transdução de sinal que aumentam o transporte de proteínas pode ser é um importante fator para combate ao estresse oxidativo, visto que as EROs deveriam diminuir a função energética e da maquinaria celular.

3.3 Regulação de etileno

O etileno é um hormônio atividade sob condições de estresse, incluindo o estresse hídrico (HATTORI et al., 2009; BAILEY-SERRES et al., 2011). Com isso, na anormalidade

da hiperhidricidade o etileno promove a formação de espécies reativas de oxigênio, um dos principais causadores da condição aquosa de plantas anormais (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022).

Na Figura 1, os genes relacionados à biossíntese e transporte de etileno foram regulados positivamente, com destaque para dois genes: *ERF014* com expressão aumentada em 25x, e *ERF113* que teve um aumento de 16x. Os dois genes estão relacionados ao aumento transcricional de genes que fazem a produção de etileno, um hormônio importante para plantas que estão sob estresse (NAKANO et al., 2006). Além deles, os genes *ETR1* e *ETR2*, receptores de membrana que aumentam a sensibilidade ao etileno (CHEN et al., 2022), também foram regulados positivamente.

Em plantas alagadas ou sob estresse por acúmulo de água, genes de produção de etileno são ativados para promover o fator de alongamento e permite um crescimento maior das células para escapar desta zona aquosa e com baixa quantidade de oxigênio (HATTORI et al., 2009; BAILEY-SERRES et al., 2011). Ao analisar o gene relacionado ao fator de alongamento em palma de óleo (*EIF4A*) nos embriões somáticos hiperhídricos, observou-se que este gene também foi positivamente regulado (*fold change* de 8) em relação aos embriões normais (Figura 1). Outro hormônio importante para o alongamento celular são as giberelinas, que, em conjunto com etileno, são ativadas em resposta ao alagamento (CHEN et al., 2022). No presente estudo (Ver capítulos 1 e 2), o AG₃ pode estar relacionado a uma diminuição na formação de plantas hiperhídricas e, possivelmente, promover uma recuperação de plantas que estejam com a anormalidade presente.

Ao analisar a metilação em genes envolvidos na síntese de etileno, Gao e colaboradores (2022) perceberam que plantas hiperhídricas apresentaram hipometilação de genes ligados ao etileno. Os autores afirmaram, que o etileno resultava em uma maior expressão de aquaporinas e permitia um acúmulo de água nos tecidos vegetais, o que é característico de plantas que sofrem pela anormalidade da hiperhidricidade. Para Polivanova e Bedarev (2022), o etileno é, provavelmente, o primeiro sinal para modificação fisiológica de plantas para gerar a anormalidade da hiperhidricidade, pois ativa as espécies reativas de oxigênio, pode aumentar a produção de aquaporinas e, com isso, retroalimentar o sistema transcricional da planta para aumento da produção de mais etileno. No trabalho de Hassanein e colaboradores (2017), o uso de compostos que inibem a síntese de etileno promoveram uma menor formação de plantas hiperhídricas. Pelo visto acima, o etileno provavelmente apresenta

um papel importante na formação da hiperhidricidade por aumentar as EROs e ativar canais de aquaporina.

3.4 Desenvolvimento de planta

Em plantas hiperhídricas, genes relacionados ao desenvolvimento de plantas são pouco expressos para dar prioridade à ativação de genes relacionados à defesa de plantas (MUNEER et al., 2017). Entretanto, na embriogênese somática, genes com função de desenvolvimento da plantas foram regulados positivamente em genótipos responsivos de palma de óleo (SANTOS et al., 2018).

Acerca dos genes envolvidos no desenvolvimento da planta, *EIF4A* (fator de alongamento) e *SERK2* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1+*) foram regulados positivamente nos embriões hiperhídricos. Um dos fatores atingidos pela anormalidade da hiperhidricidade é o problema no desenvolvimento normal e completo dos tecidos vegetais, prejudicando a planta anatomicamente, fisiologicamente e morfológicamente (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022).

O fator de alongamento pode estar associado a introdução exógena de AG₃ no meio de cultivo e ao aumento da expressão gênica de genes relacionado à síntese e transporte de etileno, já que estes hormônios estão relacionados ao crescimento das plantas em condições de estresse hídrico (CHEN et al., 2022). Além disso, os autores afirmam que, potencialmente, fatores de alongamento são fundamentais para produção de proteínas e transcritos para plantas sob estresse. Devido ao alto número de genes com expressão aumentada no presente trabalho, o fator de alongamento é um dos possíveis responsáveis pelo aumento dos transcritos e, com isso, aumento do metabolismo energético visto nas plantas hiperhídricas.

O *SERK2* é um gene relacionado à competência embriogênica na indução de calos em palmeiras (SANTOS et al., 2018; MEIRA et al., 2023), ativando rotas energéticas para produção de calos embriogênicos. Sob estresse, as plantas tendem a diminuir o metabolismo energético, ciclo celular e formação de parede celular secundária de lignina (PRIEST et al., 2014). Visto acima que os embriões hiperhídricos estão com um aumento transcricional de genes relacionados ao metabolismo energético, a não diminuição do gene de competência embriogênica pode levar a maior taxa de respiração celular, levando a perda de oxigênio, aumento de água e aumento das EROs, sintomas importantes para surgimento da anormalidade estudada (TIAN et al., 2017, POLIVANOVA; BEDAREV, 2022). Entender o

funcionamento de vias metabólicas correlacionados ajudará a entender as vias metabólicas que levam a produção de condições das plantas, como a hiperhidricidade (RUPRECHT et al., 2017).

3.5 Metabolismo energético

Na embriogênese somática, genes relacionados ao metabolismo energético são expressos em maior quantidade para suprir a demanda energética da alta taxa de multiplicação celular (RIBEIRO et al., 2019). Entretanto, nenhum artigo relacionou que os genes de metabolismo energético podem estar envolvidos em uma potencial aquisição da anormalidade hiperhídrica.

No presente estudo, genes relacionados ao metabolismo energético foram regulados positivamente como o *NADHU2* (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 2), *ENO1* (Enolase), *LOC105039936* (cytochrome c oxidase subunit 5C-1) e *SAM* (S-adenosylmethionine synthase). Em comparação ao embrião normal, no hiperhídrico *NADHU2* apresentou uma taxa de aumento de expressão de 2, *ENO1* de 4, *SAM* de 7 e *LOC105039936* de 6.

Os genes ligados a via metabólica de produção de ATP na etapa da fosforilação oxidativa com regulação aumentada nos embriões hiperhídricos pode significar um alto metabolismo celular. O processo de fosforilação oxidativa envolve reações dentro da mitocôndria utilizando principalmente carboidratos para produção de ATP na célula. Porém, os estresses podem promover uma interrupção da cadeia transportadora de elétrons e diminuir a produção de ATP e gerar EROs (TAN; MILLAR; TAYLOR, 2012). Os embriões que não conseguiram desativar as rotas metabólicas de utilização de energia, visto que a embriogênese somática induz a produção de ATP (SANTOS et al., 2018), podem continuar com alto metabolismo energético.

Devido à alta produção energética e com auxílio das proteínas do citocromo c oxidase, o oxigênio é transformado em água, podendo levar a hipóxia dos tecidos e aumento da água na região intracelular, características fundamentais para o surgimento da anormalidade hiperhídrica (JASPERS; KANGASJÄRVI, 2013). Os autores afirmam que com o aumento das EROs, há uma maior produção de O_2^- nos tecidos vegetais, principalmente nos cloroplastos, citoplasma e mitocôndria, local de produção de energia. Com abundância de O_2^- , as enzimas da fosforilação oxidativa utilizam o oxigênio como produto para formação de

água. Dentre as enzimas antioxidantes do estudo, a única que o gene não foi superexpresso é a superóxido dismutase, que converte O₂⁻ em peróxido de hidrogênio.

Além disso, com o aumento de proteínas no combate ao estresse, a demanda energética para produção de mais compostos anti-estresse pode estar aumentando. Os genes das vias metabólicas são importantes para construção de carboidratos nas plantas (ROLLAND; MOORE; SHEEN, 2002), e o acúmulo de açúcares solúveis para produção de energia pode levar a um aumento da hiperhidricidade, visto que alguns monossacarídeos são agentes que captam água para dentro da célula (ŽIVANOVIĆ et al., 2020).

No trabalho de Gantait e Mahanta (2022), percebe-se que os reguladores de crescimento tem um efeito aumentado na produção de plantas hiperhídricas, dentre eles, as citocininas são as principais. Os reguladores de crescimento são importantes para ativar rotas metabólicas para aumentar a divisão celular e aumentar o metabolismo celular, porém, na maioria dos casos de diferenciação de calos para embriões, retira-se o regulador que promoveu a indução de calos embriogênicos (BALZON; LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2013; ALMEIDA et al., 2020). A manutenção dos efeitos dos reguladores de crescimento ainda podem fazer efeito mesmo após sua retirada, podendo ocasionar embriogênese somática secundária (MONTERO-CÓRTEZ et al., 2010) e, com isso, promover um aumento da taxa metabólica, indo em contraposição às reações que tentam inibir o metabolismo energético durante estresse. Por causa desses efeitos, as plantas podem não estar lidando bem com o estresse oxidativo, aumentando a produção de etileno e promovendo o surgimento da anormalidade vítrea. Entretanto, genes relacionando a hiperhidricidade e aumento da taxa energética ainda não foram discutidos em trabalhos científicos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os genes relacionados ao estresse, defesa, metabolismo, transporte, produção de etileno e desenvolvimento podem ser genes que parecem ter um papel importante na hiperhidricidade de embriões somáticos de palma de óleo. Com isso, é possível que a embriogênese somática cause um grande estresse nos tecidos vegetais, aumentando a produção das EROs e etileno. Com o aumento destes compostos, as aquaporinas são ativadas e a célula fica vacuolada, diminuindo o oxigênio o que leva a mais produção de etileno e EROs. Para diminuir os danos celulares, as enzimas antioxidantes são ativadas para combater o estresse oxidativo causado pelas EROs. Porém, as plantas hiperhídricas que não conseguem diminuir a produção de etileno e mantêm um alto

metabolismo energético tem mais dificuldade para combater a anormalidade. Com a alta taxa energética, açúcares solúveis podem estar sendo produzidos e aumentando a absorção de água das plantas pelo aumento do potencial osmótico. Entretanto, a produção de açúcares solúveis totais também pode ser o gatilho inicial para formação da anormalidade hiperhídrica, desencadeando toda a sinalização por meio das EROs e etileno.

Este trabalho apresenta uma visão inovadora acerca dos possíveis genes relacionados à hiperhidricidade, relacionando-os à embriogênese somática e às anormalidades que promovem a não formação de plantas ao final do processo. Com isso, os resultados podem proporcionar um maior entendimento acerca da hiperhidricidade na embriogênese e contribuir para otimizar os protocolos que visam a propagação *in vitro* de genótipos superiores de palma de óleo. Todavia, mais pesquisas precisam ser feitas sobre as causas da hiperhidricidade e como revertê-las, visto que o gatilho inicial para formação da anormalidade ainda é incerto na embriogênese somática

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R. F.; MEIRA, F. S.; GOMES H. T.; BALZON, T. A.; BARTOS, P. M. C.; MEIRA, R. O.; CUNHA; R. N. V.; LOPES, R. L.; METHA, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA J. E. Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. *Pisifera*) from immature leaf tissues. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 229-239, 2020.
- BABU, B. K.; MATHUR, R. K.; KUMAR, P. N.; RAMAJAYAM, D.; VENU, M. V. B.; BABU, S. S. Development, identification and validation of CAPS marker for SHELL trait which governs dura, pisifera and tenera fruit forms in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171933, 2017.
- BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 1, p. 41-50, 2013.
- BAKIR, Y.; ELDEM, V.; ZARARSIZ, G.; UNVER, T.. Global transcriptome analysis reveals differences in gene expression patterns between nonhyperhydric and hyperhydric peach leaves. **The plant genome**, v. 9, n. 2, p. plantgenome2015.09.0080, 2016.
- BAILEY-SERRES, J.; FUKAO, T.; GIBBS, D. J.; HOLDSWORTH, M. J.; LEE, S. C.; LICAUSI, F.; PERATA, P.; VOESENEK, L. A. C. J.; DONGEN, J. T. Making sense of low oxygen sensing. **Trends in plant science**, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012.
- BARCELOS, E.; RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; MOTOIKE, S. Y.; BABIYCHUK, E.; SKIRYCH, A., KUSHNIR, S. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 190, 2015.

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

CUI, G.; WANG, C.; LIN, Z.; FENG, X.; WEI, M.; MIAO, Z.; SUN, Z.; WEI, F. Prognostic and immunological role of Ras-related protein Rap1b in pan-cancer. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 4828-4840, 2021.

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA-SCHERWINSKI, J. E. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, p. 1-19, 2022.

GAO, H.; XIA, X.; AN, L.; XIN, X.; LIANG, Y. Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during in vitro culture. **Plant Science**, v. 254, p. 1-11, 2017.

GAO, H.; XIA, X.; AN, L. Critical roles of the activation of ethylene pathway genes mediated by DNA demethylation in Arabidopsis hyperhydricity. **The Plant Genome**, p. 1-16, 2022.

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

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

HASSANEIN, A. M.; SALEM, J. M.; FAHEED, F. A.; EL-NAGISH, A. Effect of anti-ethylene compounds on isoenzyme patterns and genome stability during long term culture of *Moringa oleifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, p. 201-212, 2018.

HATTORI, Y.; NAGAI, K.; FURUKAWA, S.; SONG, X. J.; KAWANO, R.; SAKAKIBARA, H.; WU, J.; MATSUMOTO, T.; YOSHIMURA, A.; KITANO, H.; MATSUOKA, M.; MORI, H.; ASHIKARI, M. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. **Nature**, v. 460, n. 7258, p. 1026-1030, 2009.

HORSTMAN, A.; LI, M.; HEIDMANN, I.; WEEMEN, M.; CHEN, B.; MUINO, J. M.; ANGENENT, G. C.; BOUTILIER, K. The BABY BOOM Transcription Factor Activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 Network to Induce Somatic Embryogenesis. **Plant Physiology**, v.175, n. 2, p. 848-857, 2017.

JAN, T.; GUL, S.; KHAN, A.; PERVEZ, S.; NOOR, A.; AMIN H.; BIBI, S.; NAWAZ, M. A.; RAHIM, A.; AHMAD, M. S.; AZAM, R.; ULLAH, H. Range of factors in the reduction of hyperhydricity associated with in vitro shoots of *Salvia santolinifolia* Bioss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

JASPERS, P.; KANGASJÄRVI, J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 405-413, 2010.

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

MEIRA, F. S.; RIBEIRO, D. G.; CAMPOS, S. S.; FALCÃO, L. L.; GOMES, A. C. M. M. G.; DUSI, D. M. A.; MARCELLINO, L. H.; MEHTA, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential expression of genes potentially related to the callogenesis and in situ hybridization of SERK gene in macaw palm (*Acrocomia aculeata* Jacq.) Lodd. ex Mart. **Protoplasma**, p. 1-13, 2023.

MONTERO-CORTÉS, M.; SÁENZ, L.; CORDOVA, I.; QUIROZ, A.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. GA 3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). **Plant cell reports**, v. 29, p. 1049-1059, 2010.

MUNEER, S.; WEI, H.; PARK, Y. G.; JEONG, H. K.; JEONG, B. R. Proteomic analysis reveals the dynamic role of silicon in alleviation of hyperhydricity in carnation grown in vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 50, 2017.

NIKAM, T. D., Mulye, K. V., CHAMBHARE, M. R.; NIKULE, H. A.; AHIRE, M. L. Reduction in hyperhydricity and improvement in in vitro propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *Agave sisalana* Perr. ex Engelm by NaCl and polyethylene glycol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 138, p. 67-78, 2019.

RIBEIRO, D. G.; ALMEIDA, R. F.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; SOUSA, M. V.; RICARTO, C. A. O. R.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. **Journal of proteômica**, v. 192, p. 137-146, 2019.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants. **The plant cell**, v. 14, n. suppl_1, p. S185-S205, 2002.

RUGGIERO, B.; KOIWA, H.; MANABE, Y.; QUIST, T. M.; INAN, G.; SACCARDO, F.; JOLY, R. J.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; MAGGIO, A. Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 136, n. 2, p. 3134-3147, 2004.

SANTOS, I. R.; MAXIMIANO, M. R.; ALMEIDA, R. F.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Genotype-dependent changes of gene expression during somatic embryogenesis in oil palm hybrids (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*). **Plos one**, v. 13, n. 12, p. e0209445, 2018.

SEO, P. J.; LEE, A. K.; XIANG, F.; PARK, C. M. Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 3, p. 334-344, 2008.

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020.

SOUNDARARAJAN, P.; MANIVANNAN, A.; CHO, Y. S.; JEONG, B. R. Exogenous supplementation of silicon improved the recovery of hyperhydric shoots in *Dianthus caryophyllus* L. by stabilizing the physiology and protein expression. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 738, 2017.

POLIVANOVA, O. B.; BEDAREV, V. A. Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3313, 2022.

PRIEST, H. D.; FOX, S. E.; ROWLEY, E. R.; MURRAY, J. R.; MICHAEL, T. P.; MOCKLER, T. C. Analysis of global gene expression in *Brachypodium distachyon* reveals extensive network plasticity in response to abiotic stress. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87499, 2014.

RIBEIRO, D. G.; ALMEIDA, R. F.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; SOUSA, M. V.; RICARTO, C. A. O. R.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MEHTA, A. Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. **Journal of proteômica**, v. 192, p. 137-146, 2019.

RUPRECHT, C.; VAID, N.; PROOST, S.; PERSSON, S.; MUTWIL, M. Beyond genomics: studying evolution with gene coexpression networks. **Trends in plant science**, v. 22, n. 4, p. 298-307, 2017.

TAN, Y.; MILLAR, A. H.; TAYLOR, N. L. Components of mitochondrial oxidative phosphorylation vary in abundance following exposure to cold and chemical stresses. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 7, p. 3860-3879, 2012.

TIAN, J.; CHENG, Y.; KONG, X.; LIU, M.; JIANG, F.; WU, Z. Induction of reactive oxygen species and the potential role of NADPH oxidase in hyperhydricity of garlic plantlets in vitro. **Protoplasma**, v. 254, p. 379-388, 2017.

TOW, W. K., GOH, A. P. T.; SUNDRALINGAM, U.; PALANISAMY, U. D.; SIVASOTHY, Y. Flavonoid composition and pharmacological properties of *Elaeis guineensis* Jacq. leaf extracts: A systematic review. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 10, p. 961, 2021.

ZANG, D.; SHI, P.; HTWE, Y. M.; LI, Z.; IHASE, L. O.; MASON, A. S.; SUN, X.; XIAO, Y.; WANG, Y. Caffeate may play an important role in the somatic embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Industrial Crops & Products**, v. 174, p. 114143, 2021.

ŽIVANOVIĆ, B.; MILIĆ-KOMIĆ, S.; TOSTI, T.; VIDOVIĆ, M.; PROKIĆ, L.; VELJOVIĆ JOVANOVIĆ, S. Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid—Mediated drought response in tomato. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1147, 2020.