



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

RENNAN OLIVEIRA MEIRA

Embriogênese somática em sistema bifásico, respostas ao estresse
oxidativo e biobalística em palma de óleo

Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Brasília – DF

Abril/2023

RENNAN OLIVEIRA MEIRA

Embriogênese somática em sistema bifásico, respostas ao estresse
oxidativo e biobalística em palma de óleo

Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Botânica do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Doutor em Botânica.

Brasília – DF
Abril/2023

“O questionamento é o primeiro passo para qualquer descoberta.”
L.Seabra

Dedico esse trabalho ao meu querido amigo, pai e avô Luis da Conceição Costa (*in memoriam*), que me apoiou e me aconselhou o quanto pôde durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus e ao universo, que me deu saúde, paz e sabedoria para continuar nessa jornada.

Aos meus queridos pais Sebastião e Cirlei, e a minha irmã Rayssa, que nunca hesitaram em me amparar e ajudar em todos os momentos que eu precisava, pelo apoio e pela dedicação ao se preocuparem e cuidar de mim.

À minha família do quadradinho, minha família do coração, como costume dizer, a Mirane, Flaviane, titia Adayl e Seu Lulu, meus conterrâneos sul-matogrossense, que me receberam e me acolheram em seu lar, aqui no DF, me amparando e cuidando de mim, como se fosse um filho, um irmão, um amigo, um sobrinho e um neto.

Ao meu orientador Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira pela confiança e pela oportunidade de fazer parte da equipe, além de acreditar no potencial do meu trabalho.

Ao Professor Dr. Thomas Christopher Rhys Williams e à Professora Dra. Christina Cleo Vinson Williams, pela amizade, apoio e orientação na realização das análises bioquímicas e moleculares, e as trocas durante as aulas e os estágios supervisionados.

Às minhas amigas e amigos, que me deram apoio nos momentos mais difíceis dessa jornada nada fácil, ainda mais com uma pandemia no meio.

A todos os meus professores, diretos e indiretos, desde a Agronomia, Engenharia Florestal e Biologia Molecular, pois cada um deles me influenciaram de uma forma especial e contribuíram de maneira única pelo meu sucesso profissional.

Aos meus amigos e companheiros dos laboratórios: Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (LCT II), que sempre estiveram à disposição quando as dúvidas surgiram e aos momentos de cafés, que são e foram essenciais.

Ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília – UnB, pelas oportunidades de trocas pessoais e de conhecimento adquiridos em todos os aspectos;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e à UnB, pela estrutura física e custeio financeiro fornecidos para a realização da Tese;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão de bolsa e pelo apoio financeiro ao projeto;

MUITO OBRIGADO...

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
RESUMO GERAL	11
ABSTRACT	13
1. – INTRODUÇÃO GERAL	15
2. - REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 - Aspectos botânicos e importância econômica da palma de óleo	19
2.2 - Cultura de Tecidos e Suspensão Celular	21
2.3 - Embriogênese Somática.....	23
2.4 - Transformação genética.....	27
2.5 - Transformação genética mediada por biobalística	28
2.6 - Estresse oxidativo e respostas antioxidantes	25
3.0 - REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 1	46
Desenvolvimento e aperfeiçoamento da embriogênese somática e regeneração de plantas de palma de óleo (<i>Elaeis oleifera</i> x <i>E. guineensis</i>) em sistema bifásico	46
RESUMO.....	46
ABSTRACT	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
2.1 Preparo de explantes e indução de calos	49
2.2 Estabelecimento e multiplicação de agregados e células em suspensão	50
2.2.1 Estabelecimento inicial de calos embriogênicos em meio líquido	50
2.2.2 Efeito do seccionamento e dissociação de calos no estabelecimento e multiplicação de agregados celulares e células em suspensão.....	52
2.3 Diferenciação e maturação dos embriões somáticos	54
2.4 Germinação dos embriões somáticos	54
2.5 Aclimatização das plantas clonadas	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.1 Estabelecimento e multiplicação de agregados e células em suspensão	56
3.1.1 Estabelecimento inicial de calos em meio líquido	56
3.1.2 Efeito do seccionamento e dissociação de calos no estabelecimento e multiplicação de agregados celulares e células em suspensão.....	58
3.2 Diferenciação e maturação dos embriões somáticos	61
3.3 Germinação dos embriões somáticos e aclimatização das plantas	65
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO 2	76
Respostas ao estresse oxidativo de genitores de palma de óleo (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq. Var. Pisifera) contrastantes à capacidade de aquisição da competência embriogênica..	76
RESUMO.....	76
ABSTRACT	77
1. INTRODUÇÃO.....	78
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1. Material vegetal e condições de cultivo	79

2.2. Indução da embriogênese somática.....	81
2.3. Análises bioquímicas/enzimáticas	82
2.4. Extração de proteínas solúveis totais e enzimas antioxidantes	82
2.5. Determinação da atividade da enzima POD (Peroxidase)	83
2.6. Determinação da atividade da enzima CAT (catalase)	83
2.6. Determinação da atividade da enzima APx (ascorbato peroxidase)	83
2.7. Análises estatísticas	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4. CONCLUSÃO.....	92
5. REFERÊNCIAS	93
CAPÍTULO 3	97
Transformação genética mediado por bombardeamento de partículas em calos embriogênicos de palma de óleo (<i>Elaeis spp.</i>)	97
RESUMO.....	97
ABSTRACT	98
1. INTRODUÇÃO.....	99
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	100
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	100
2.2 Transformação genética: plasmídeo – vetor de transformação	101
2.3 Biobalística: bombardeamento de partículas	103
2.4 Diferenciação e maturação dos embriões somáticos após bombardeamento de partículas	104
2.5 Regeneração dos embriões somáticos que passaram pela pressão de seleção .	105
2.6 Identificação das plantas transformadas por imunocromatografia com tira de fluxo lateral e análise PCR.....	105
2.7 Análises estatísticas	106
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
5. REFERÊNCIAS	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bombardeador ou acelerador de partículas. Esquema representando a biobalística, método de transferência direta de genes mais usado para transformar células vegetais. Fonte: google imagens (2017).	30
Figura 2. Caracterização morfológica dos calos embriogênicos (calos globulares, com consistência friável e coloração variando entre amarelo e bege – Fig. 1A-F) e calos primários (sem formato definido ou alongados, com consistência hidratada e coloração bege – Fig. 1G-L) do híbrido interespecífico – B351733 (<i>Elaeis guineensis</i> x <i>E. oleífera</i>) oriundos de explantes foliares em meio líquido sob agitação.	51
Figura 3. Aspectos gerais sobre o estabelecimento dos agregados celulares do híbrido interespecífico – B351733 (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>E. guineensis</i>) em meio líquido. A. Calos oriundos de explantes foliares em meio líquido sob agitação. B-C. Agregados celulares em meio líquido em Erlenmeyer e em tubo <i>Falcon</i> (após sedimentação). D. Aspecto morfológico de calo oriundo do meio líquido. Abreviação: cg, calo globular. Barra: D = 1 mm.	53
Figura 4. Caracterização morfoanatômica de calos embriogênicos do híbrido interespecífico – B351733 (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>E. guineensis</i>) oriundos do meio líquido. A. Calo embriogênico globular. B. Secção anatômica de calo embriogênico oriundo do meio líquido; notar indício de protoderme (seta – possível embrião somático globular) e proembriões. C. Detalhe do calo embriogênico da letra B com células meristemáticas. D. Detalhe da letra B com proembriões periféricos (pontilhado preto) e células meristemáticas localizadas internamente (pontilhado vermelho – célula em anáfase); notar mucilagem arroxçada (seta). Abreviações: ce, calo embriogênico; cg, calo globular; cm, células meristemáticas; pe, proembrião. Barras: A, B = 1 mm; C = 0,025 mm e D = 0,5 mm.	57
Figura 5. Características morfológicas dos calos do híbrido interespecífico – B351733 (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>E. guineensis</i>) em diferentes tratamentos para estabelecimento e multiplicação em meio líquido. A. Calos seccionados/picotados, tratamento 1. B. Agregados celulares e células em suspensão após 90 dias em meio líquido, oriundos de explantes seccionados. C. Calos dissociados, tratamento 2. D. Agregados celulares e células em suspensão após 90 dias em meio líquido, oriundos de explantes dissociados.	59
Figura 6. Análise do crescimento celular, no cultivo em meio líquido dos agregados e células em suspensão do híbrido interespecífico – B351733 (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>E.</i>	

guineensis), pelo método do volume celular sedimentado (VCS) até 90 dias de cultivo em meio líquido. Barras representam o erro padrão..... 60

Figura 7. Porcentagem de oxidação (A) e porcentagem de formação de embriões somáticos (B) a partir de agregados celulares, oriundos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*), cultivados em diferentes meios de diferenciação de embriões somáticos. Barras representam o erro padrão. 62

Figura 8. Diferenciação de embriões somáticos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) a partir de calos embriogênicos multiplicados em meio líquido. A. Calos globulares embriogênicos oriundos do meio líquido cultivados em meio de diferenciação. B. Calos embriogênicos com embriões somáticos (seta) após 30 dias em meio de diferenciação $\frac{1}{2}$ MS com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado. C. Embriões somáticos em estágio similar ao torpedo após 90 dias em meio de diferenciação mencionado na letra B. D. Calos embriogênicos após 30 dias em meio de diferenciação de $12,3 \text{ }\mu\text{M}$ de 2-isopenteniladenina e $0,54 \text{ }\mu\text{M}$ de ácido naftalenoacético. E. Calos embriogênicos após 90 dias em meio de diferenciação mencionado na letra D, com indícios de diferenciação de embriões somáticos (seta). F. Calos embriogênicos com embriões somáticos após 30 dias em meio de diferenciação $1000 \text{ }\mu\text{M}$ Putrescina. G. Calos embriogênicos com embriões somáticos globulares (seta) após 90 dias em meio de diferenciação mencionado na letra F. Abreviações: cg, calo globular; et, embrião somático torpedo. Barras: A, B, D-G = 2 mm e C = 1 mm. 64

Figura 9. Germinação de embriões somáticos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) a partir de calos embriogênicos multiplicados em meio líquido. A. Cluster de embriões somáticos colocado em meio de germinação, após 150 dias em meio de diferenciação $\frac{1}{2}$ MS com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado. B. Embriões somáticos individualizados oriundos do tratamento de diferenciação $\frac{1}{2}$ MS com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado. C. Emissão de parte aérea. D. Planta completa, após 120 dias em meio de germinação. E. Plantas aclimatizadas. Barras: A = 2 mm; C, D = 1 mm. 66

Figura 10. Palmitos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*), genótipos A26.50.6 e A25.58.17, utilizados para obtenção de folhas imatura. 80

Figura 11. A - Preparo dos palmitos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*). B – Remoção das folhas externas do palmito. C - Palmito em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo. 81

Figura 12. Porcentagem de contaminação e oxidação dos genótipos de palma de óleo contrastantes à indução de calos. A - Avaliação entre os genótipos A26.50.06 e

A25.58.17. B - Avaliação ao longo do tempo, até 360 dias após a indução. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Barra: erro padrão. 86

Figura 13. Concentração de proteínas solúveis totais ($\mu\text{g Prot./mg de MF}$) de explantes foliares (palmito) de dois genótipos A.26.50.6 (genótipo responsivo - GRe) e A25.58.17 (genótipo não responsivo - GNRe) de palma de óleo contrastante à indução de calo. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Letras minúsculas comparando entre os genótipos e letras maiúsculas ao longo do tempo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. 87

Figura 14. Atividade específica da enzima peroxidase (POD) de explantes foliares jovens (palmito) de genótipos de palma de óleo A.26.50.6 (genótipo responsivo - GRe) e A25.58.17 (genótipo não responsivo - GNRe), durante a indução da embriogênese somática. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Letras minúsculas comparando entre os genótipos e letras maiúsculas ao longo do tempo. * não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. 88

Figura 15. Atividade específica da enzima catalase (CAT) de explantes foliares jovens (palmito) de genótipos de palma de óleo A.26.50.6 (genótipo responsivo - GRe) e A25.58.17 (genótipo não responsivo - GNRe), durante a indução de calo. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Letras maiúsculas comparando ao longo do tempo e letras minúsculas entre os genótipos. * não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. 90

Figura 16. Atividade específica da enzima Ascorbato peroxidase (APx) de explantes foliares jovens (palmito) de genótipos de palma de óleo A.26.50.6 (genótipo responsivo - GRe) e A25.58.17 (genótipo não responsivo - GNRe), durante a indução da embriogênese somática. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Letras maiúsculas comparando ao longo do tempo e letras minúsculas entre os genótipos. * não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. 91

RESUMO GERAL

A palma de óleo é uma cultura de grande valor econômico devido ao óleo extraído de seus frutos. A técnica de embriogênese somática tem sido desenvolvida e aprimorada na multiplicação vegetativa dessa espécie, e o cultivo em meio líquido parece ser determinante para contribuir para a produção em larga escala de clones. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: 1) desenvolver a embriogênese somática em palma de óleo a partir de sistema bifásico, de modo a aperfeiçoar a multiplicação de agregados celulares e a regeneração de plantas clonais desta espécie; 2) avaliar as respostas ao estresse oxidativo, mediada pela atividade de enzimas antioxidantes de genótipos de palma de óleo (*E. guineensis* Jacq. var. *Pisifera*), durante a indução da embriogênese somática e; 3) avaliar a eficiência de um protocolo de transformação genética de calos embriogênicos de palma de óleo, por meio de biobalística. Para tanto, calos foram inicialmente estabelecidos sob cultivos em suspensão, sendo avaliados quanto à multiplicação e crescimento a partir do seccionamento ou dissociação deles em meio de multiplicação específico. O material foi mantido sob agitação constante e, após 90 dias, avaliações referentes ao volume celular sedimentado (VCS) e curva de crescimento foram realizadas. A partir destes materiais multiplicados, experimentos para otimizar a diferenciação e maturação de embriões somáticos foram realizados, avaliando-se a porcentagem de oxidação, formação de embriões somáticos (ESs), além do número de plantas regeneradas. Nas respostas ao estresse oxidativo durante a indução da embriogênese somática, explantes foliares oriundos de duas plantas adultas de *Elaeis guineensis* Jacq. var. *Pisifera* foram utilizadas. A indução de calos foi realizada em meio de MS suplementado com 450 μM de Picloram, sendo os materiais cultivados por dois subcultivos de 45 dias cada. Aos 90 dias de indução foram avaliadas as porcentagens de formação de calo e oxidação dos explantes, além da porcentagem de contaminação dos materiais. Para as análises bioquímicas e enzimáticas, amostras de ambos os genótipos foram coletadas aos 7, 15, 30, 90 e 180 dias após o início do cultivo, sendo analisadas as proteínas solúveis totais e a atividade das enzimas peroxidase (POD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APx). Com relação ao processo de transformação genética de palma de óleo, os experimentos foram realizados utilizando-se o plasmídeo pMONORNAiBAR-FAD. O processo utilizado para a transformação de calos embriogênicos foi por biobalística e o agente de seleção utilizado foi o glufosinato de amônio (4 mg.L^{-1}). Os resultados indicaram alta eficiência no processo de

estabelecimento e multiplicação de agregados celulares em meio líquido, embora não tenha sido observado diferenças significativas na multiplicação dos materiais em razão de se usar a forma de dissociação ou seccionamento dos calos em cultivo. Na fase de diferenciação de ESs, o tratamento com $\frac{1}{2}$ MS + 20 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado + 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel® foi o que proporcionou os melhores resultados quanto à porcentagem de formação de embriões somáticos (46% dos calos), taxa de germinação de ESs e plantas formadas. Quanto avaliou-se as respostas ao estresse oxidativo durante a indução, verificou-se genótipo-dependência nos resultados, com um dos genótipos não apresentando formação de calos. Os teores de proteínas solúveis totais mostraram-se estatisticamente diferentes entre os genótipos, embora o mais responsivo tenha sido o que apresentou os maiores valores para a enzima POD. A atividade das enzimas CAT e APx não apresentou o mesmo comportamento que a POD, com níveis altos apenas aos 180 dias para o genótipo não responsivo. Por fim, no experimento de transformação genética obtiveram-se 21 plantas regeneradas nos diversos tratamentos de transformação. No entanto, em nenhum dos regenerantes foi possível detectar eventos de transformação.

Palavras-chave: Arecaceae, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, embriogênese somática, meio líquido, cultivos em suspensão, sistema antioxidante, biobalística.

ABSTRACT

Oil palm is a crop of great economic value due to the oil extracted from its fruits. The somatic embryogenesis technique has been developed and improved in the vegetative multiplication of this species, and cultivation in a liquid medium seems to be decisive in contributing to the large-scale production of clones. In this context, the present work aimed to: 1) develop somatic embryogenesis in oil palm from a two-phase system, in order to improve the multiplication of cell aggregates and the regeneration of clonal plants of this species; 2) evaluate the responses to oxidative stress, mediated by the activity of antioxidant enzymes of oil palm genotypes (*E. guineensis* Jacq. var. *Pisifera*), during the induction of somatic embryogenesis; and 3) evaluate the efficiency of a genetic transformation protocol of embryogenic callus of oil palm, using biolistics. To do so, calluses were initially established under suspension cultures, being evaluated for multiplication and growth by sectioning or dissociating them in a specific multiplication medium. The material was kept under constant agitation and, after 90 days, evaluations referring to the sedimented cell volume (SCV) and growth curve were performed. From these multiplied materials, experiments to optimize the differentiation and maturation of somatic embryos were carried out, evaluating the percentage of oxidation, formation of somatic embryos (SEs), as well as the number of regenerated plants. In the responses to oxidative stress during the induction of somatic embryogenesis, leaf explants from two adult plants of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *Pisifera* were used. The induction of calluses was performed in MS medium supplemented with 450 μ M Picloram, with the materials cultured for two subcultures of 45 days each. At 90 days of induction, the percentages of callus formation and explant oxidation, in addition to the percentage of contamination of the materials, were evaluated. For the biochemical and enzymatic analyses, samples of both genotypes were collected at 7, 15, 30, 90, and 180 days after the start of cultivation, and the total soluble proteins and the activity of the peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APx) enzymes were analyzed. Regarding the process of genetic transformation of oil palm, the experiments were carried out using the pMONORNAiBAR-FAD plasmid. The process used for the transformation of embryogenic calluses was by biolistics, and the selection agent used was ammonium glufosinate (4 mg.L⁻¹). The results indicated high efficiency in the process of establishment and multiplication of cell aggregates in liquid medium, although no

significant differences were observed in the multiplication of the materials due to the use of the dissociation or sectioning form of calluses in culture. In the SE differentiation phase, the treatment with $\frac{1}{2}$ MS + 20 g.L⁻¹ sucrose + 0.50 g.L⁻¹ glutamine + 1.5 g.L⁻¹ activated charcoal + 2.3 g.L⁻¹ Phytigel® provided the best results in terms of the percentage of somatic embryo formation (46% of calluses), SE germination rate, and formed plants. When evaluating the responses to oxidative stress during induction, genotype-dependence was observed in the results, with one of the genotypes not presenting callus formation. The total soluble protein levels were statistically different between the genotypes, although the most responsive was the one that showed the highest values for the POD enzyme. The activity of the CAT and APx enzymes did not show the same behavior as POD, with high levels only at 180 days for the non-responsive genotype. Finally, in the genetic transformation experiment, 21 regenerated plants were obtained in the various transformation treatments. However, in none of the regenerants was it possible to detect transformation events.

Keywords: Arecaceae, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, somatic embryogenesis, liquid medium, suspension cultures, antioxidant system, biolistics.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), também conhecida como dendezeiro ou dendê, é considerada uma das espécies de maior importância entre as palmeiras domesticadas. É uma espécie monocotiledônea, perene e de longo ciclo de vida (CORLEY; TINKER, 2016). O cultivo da palma de óleo se destaca na agricultura mundial pela alta produtividade em óleo vegetal, com rendimentos anuais de 4-6 toneladas de óleo por hectare/ano (MURPHY, 2014). O óleo de alta qualidade e seus derivados são utilizados na indústria alimentícia (MAY; NESARETNAM, 2014; MBA; DUMONT; NGADI, 2015), de cosméticos (KENG et al., 2009; MARTINEZ et al., 2017) e, farmacêutica (ODIA; OFORI; MADUKA, 2015), além de ser uma importante fonte de energia como biocombustível (MUKHERJEE; SOVACOOOL, 2014; KURNIA et al., 2016).

Por se tratar de uma espécie monocotiledônea, a palma de óleo possui único ápice crescente, sem perfilhamento, impedindo a propagação vegetativa por métodos convencionais (MARTINE et al., 2009; CHANPRASERT et al., 2012; FERREIRA et al., 2012; MONTOYA et al., 2014). Como alternativa, a cultura de tecidos surge como uma alternativa para a multiplicação clonal da espécie. A fim de aumentar a produção de mudas de palma de óleo, a micropropagação por embriogênese somática (ES) é uma alternativa para a multiplicação clonal de genótipos elite desta espécie, por poder propiciar a produção de mudas em larga escala, em condições assépticas e em espaço físico reduzido (DUVAL et al., 1988; DURAND-GASSELIN et al., 1990; RIVAL et al., 1997; GUERRA; TORRES; TEXEIRA, 1998; KONAN et al., 2006; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; OOI et al., 2013; PALANYANDY et al., 2013). Esta técnica já foi testada a partir de diferentes explantes nesta espécie (RAJESH et al., 2003; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; THUZAR et al., 2011; BALZON et al., 2013). No entanto, é considerada laboriosa e seu sucesso é genótipo-dependente (OOI et al., 2013).

Corroborando a isso, o uso de meios de consistência líquida para a multiplicação e regeneração de plantas por embriogênese somática tem sido um método altamente eficiente para algumas espécies, devido as vantagens como crescimento rápido e homogêneo, seleção de linhagens e possibilidades de produção de metabólitos secundários (JHANKARE et al., 2011; UPADHYAY et al., 2020; MISHRA et al., 2021), além de permitir a produção automatizada (RUFFONI; SAVONA, 2005).

Segundo Brondani et al. (2020), o cultivo em meio líquido permite uma maior eficiência na produção de biomassa, com maior controle das condições de cultura, facilitando o monitoramento do crescimento celular, a troca de nutrientes e a remoção de produtos metabólicos, além de possibilitar a produção em larga escala. Esta técnica tem sido utilizada na micropropagação de árvores coníferas (GUPTA; TIMMIS, 2005; KLIMASZEWSKA et al., 2015), *Medicago truncatula* (DUOUE et al., 2006), cana-de-açúcar (ANDIBRISIBE et al., 1994), banana (GÓMEZ KOSKY et al., 2002) e também da palma de óleo (KARYANTI et al., 2021), embora os resultados sejam pouco confiáveis em razão dos inúmeros fatores envolvidos no processo..

Apesar de promissora, a indução da ES em plantas é geralmente um processo complexo, afetado por muitos fatores, bioquímicos e moleculares, bem como pelo envolvimento de genes relacionados ao estresse (NAMASIVAYAM, 2007; ROSE, 2019; PRUDENTE et al., 2020). De fato, estudos mostram que fatores de estresse desempenham um papel determinante durante a ES (KARAMI; SAIDI, 2010; JIN et al., 2014; PRUDENTE et al., 2020), sugerindo que esta via seja uma resposta ao estresse de células cultivadas *in vitro*.

O estresse oxidativo é um componente do estresse abiótico causado pelo cultivo *in vitro*, que pode ser definido como um desequilíbrio na relação entre a produção de compostos antioxidantes *versus* compostos oxidantes (BARBOSA, et al., 2014). Como resultado do estresse oxidativo, a formação imediata de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species – ROS, em inglês) tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radicais livres de hidroxila ($HO^{\cdot}$), que desencadeiam os sistemas de sinalização da planta (MØLLER et al., 2007). Quando em excesso, as ROS podem resultar em oxidação de proteínas, ácidos graxos insaturados e DNA, causando danos celulares e, eventualmente, morte celular (MITTLER, 2002; BARREIROS et al., 2006; BARBOSA, et al., 2014; HUANG et al., 2019; TRIPATHI et al., 2020).

Para impedir as consequências nocivas do estresse, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa antioxidante que resulta na eliminação das ROS, para reajustar o equilíbrio redox celular (MITTLER, 2002; BARBOSA, et al., 2014; HUANG et al., 2019). Uma delas é a regulação da expressão de genes codificantes para enzimas antioxidantes, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas ROS (CYRNE et al., 2003; HUANG et al., 2019; KHAN et al., 2023).

Adicionalmente, alguns autores têm correlacionado o aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante, com a resposta embriogênica dos tecidos, sugerindo que

o estresse oxidativo favorece o processo de ES (GAJ, 2004; NIEVES et al., 2003; BLAZQUEZ et al., 2009; ROSE, 2019; PRUDENTE et al., 2020).

As ROS apresentam dupla função, tanto em eventos fisiológicos, quanto fitopatológicos. Em eventos fisiológicos, atuam em muitos processos de desenvolvimento da planta, como sinalizadores fundamentais do crescimento (OBERT et al., 2005; SWANSON; GILROY, 2010; MITTLER, et al., 2011), essas funções dependem do nível e da distribuição intracelular dessas moléculas (KOCSY, et al., 2013). De acordo com Fehér e colaboradores (2003), a interação entre auxinas e a sinalização do estresse resulta na aquisição da competência embriogênica de células somáticas por meio da reprogramação celular.

A transformação genética aumenta a possibilidade de obtenção de plantas com características agrônomicas desejáveis, pois permite a transferência de genes exógenos, para o genoma de uma planta, independente de haver compatibilidade sexual (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998). A introdução de genes exógenos em plantas via transformação genética pode ser efetuada por métodos indiretos (via *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*) ou direto, como a biobalística (ARAGÃO et al., 1996; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PURKAYASTHA et al., 2010).

No caso de palma de óleo, a transformação genética foi iniciada por um grupo de pesquisa da Malásia desde 1987, pelo programa de engenharia genética da palma de óleo (Malaysian Palm Oil Board - MPOB), do Instituto de Pesquisa de Palma de Óleo da Malásia (Palm Oil Research Institute of Malaysia - PORIM) (CHEAH et al., 1995), inicialmente, visando à produção de óleo menos saturado, com maior teor de ácido palmítico e oleico (CHEAH et al., 1995).

No entanto, o principal gargalo para a engenharia genética dessa planta monocotiledônea, arbórea e de respostas lentas é a disponibilidade de um método de transformação genética rotineira e confiável (Parveez et al., 1994). Um desses métodos é por biobalística que foi relatado pela primeira vez por Sanford et al. (1987). Esse é o método mais bem-sucedido para a transformação de monocotiledôneas e culturas agronomicamente importantes (Potrykus, 1991), sendo inicialmente escolhido como um método eficaz para a transformação de palma de óleo (Parveez, 2000).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: 1) desenvolver a embriogênese somática em palma de óleo a partir de sistema bifásico, de modo a aperfeiçoar a multiplicação de agregados celulares e a regeneração de plantas clonais desta espécie; 2) avaliar as respostas ao estresse oxidativo, mediada pela atividade de

enzimas antioxidantes de genótipos de palma de óleo (*E. guineensis* Jacq. var. *Pisifera*), durante a indução da embriogênese somática e; 3) avaliar a eficiência de um protocolo de transformação genética de calos embriogênicos de palma de óleo, por meio de biobalística.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Aspectos botânicos e importância econômica da palma de óleo

A palma de óleo é uma palmeira monocotiledônea perene, oleaginosa e de ciclo de vida longo (HARTLEY, 1988; BABU; MATHUR, 2022). De acordo com a classificação atual, o gênero *Elaeis* é pertencente à classe Liliopsida, tribo Cocoseae, subtribo Elaeidinae, família Arecaceae e subfamília Arecoideae (LORENZI et al., 2010). É uma espécie que existe em estado silvestre, semissilvestre ou cultivado em áreas de zonas equatoriais ou intertropicais úmidas da África, Ásia e América do Sul e Central, porém, grande parte dessa distribuição geográfica foi resultado de domesticação (DRANSFIELD et al., 2008).

A denominação da espécie foi proposta pelo botânico Nicholas Joseph Jacquin (1763), sendo *Elaeis* derivado da palavra grega *elaion*, que significa óleo, e o nome específico *guineensis* demonstra que Jacquin atribuía sua origem à Guiné-Bissau, costa do continente africano (TAN et al., 2009).

O exemplar americano de palma de óleo é a espécie conhecida por caiaué (*Elaeis oleífera*), nativa da América Latina, muito usada em programas de melhoramento genético e que por meio do cruzamento com a espécie africana do mesmo gênero gera descendentes híbridos férteis e com resistência a pragas (CUNHA, et al., 2009).

No Brasil, a palma de óleo foi provavelmente introduzida pelos escravos no século XVI, por ocasião do tráfico negreiro (SAVIN, 1965; VEIGA et al., 2001). Na época, os escravos oriundos, principalmente, de Angola, Benin e Moçambique transportavam sementes dentro dos navios, as quais deram origem possivelmente aos primeiros dendezais no litoral do Estado da Bahia (CHAVEZ, 1984).

A palma de óleo é uma planta monoica, apresentando flores masculinas e femininas em inflorescências separadas nas axilas das folhas da mesma planta (RUTTAJORN et al., 2016, APICHATMETA et al., 2017). O fruto da palma de óleo se desenvolve em cachos ovais, que podem atingir um comprimento médio de 50 cm, com largura de cerca de 35 cm e pesando de 20 a 30 kg. Cada cacho é composto por aproximadamente 1500 frutos. O fruto é uma drupa sésil, com formato esférico e alongado, medindo de 2 a 5 cm de comprimento e entre 3 e 30 g de peso (ADAM et al., 2005).

Esse fruto é o que lhe confere o título de cultura de rendimento importante nos trópicos (ZHENG et al., 2017), pois produz dois óleos de importância econômica conhecidos como, óleo de palma ou de dendê, e o óleo de palmiste, obtidos a partir do

mesocarpo e do endosperma, respectivamente (SINGH et al., 2013). O mesocarpo é espesso e corresponde a 92% do fruto, e contém de 20 a 50% de óleo de dendê ou de palma, em sua camada interna são encontradas amêndoas que produzem o óleo de palmiste, com características físico-químicas distintas das encontradas no óleo de dendê (SUMATHI et al., 2008).

Destacando-se na agricultura mundial devido à sua produtividade alta, a palma de óleo tem alcançando rendimentos anuais de 4-5 toneladas de óleo por ano (Palm Oil Research, 2017). Seu óleo tem muitas aplicações na indústria de alimentos e como fonte de energia (CARTER et al., 2007; CORLEY, 2009; MEKHILEF et al., 2011). O óleo de palma é utilizado principalmente para cozinhar, preparar margarina e também para aplicações não-alimentares (sabão, detergente, cosméticos, etc.) (BERGER; IDRIS, 2005; CARTER et al., 2007). Já o óleo de palmiste é utilizado na alimentação animal e em adubos vegetais, como também, pela indústria na fabricação de batons e perfumes, além disso, vêm compondo um importante insumo para a produção de bicompostíveis (Sundram et al., 2003; Hameed et al., 2009; Mukherjee & Sovacool, 2014; Oosterveer, 2015).

A alta produtividade de palma de óleo deve-se aos híbridos interespecíficos melhorados que possuem potencial para produção de uma grande quantidade de óleo por cacho (VALLEJO; CASSALETT 1975; CUNHA et al., 2009). Entre eles destaca-se o híbrido resultante do cruzamento entre o caiaué (*E. oleifera*) e a palma de óleo de origem africana (*E. guineensis*), e geralmente apresentam características intermediárias aos dois parentais, revelando a ação predominantemente aditiva dos genes e possibilidades de progresso com seleção (BARCELOS et al., 2001).

No Brasil, as cultivares de palma de óleo utilizadas para plantio comercial são principalmente genótipos da variedade Tenera. Os híbridos apresentam alta variabilidade no rendimento de óleo, com as melhores plantas rendendo entre 20 e 30% acima da média (BAKOUMÉ; LOUISE, 2007; LOW et al. 2008).

O Brasil ocupa a 9ª posição na produção de óleo de palma mundial sendo responsável por 395,000 ton /ano. O Estado brasileiro que apresenta a maior produção é o Pará, responsável por aproximadamente 98,47% do óleo produzido, uma produção anual de 3,200.000 t/ cacho de fruto fresco (CFF) e uma área plantada de 231.669 hectares e área colhida de 200.000 hectares, sendo 40 mil hectares em áreas de agricultores familiares, dados do Panorama Agrícola do Pará 2015/2019, da Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e da Pesca do Pará (SEDAP, 2020). A Bahia vem em

segundo lugar, com cerca de 1,47% e em terceiro o Estado de Roraima com 0,05% (IBGE/PAM 2020 – ano de referência 2019).

Apesar disso, um problema a ser solucionado na produção de palma de óleo é a multiplicação dos genótipos elites, pois a produção de mudas por sementes torna-se praticamente inviável a obtenção de culturas uniformes e a perpetuação das características de indivíduos de alto valor genético e agrônômico, por consequência dos genitores serem plantas alógamas com alta heterozigose (Martine et al., 2009; Myint et al., 2010; Chanprasert et al., 2012). Diante disso, metodologias que possibilitem a clonagem são de grande importância, propiciando a produção de indivíduos elite para o agronegócio, ou ainda, com o propósito de apoiar os programas de melhoramento genético da cultura, a partir da produção de mudas de alta qualidade geneticamente certificadas (Duval et al., 1988; DURAND-GASSELIN et al., 1990; RIVAL et al., 1997a; KHAW; NG, 1998; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; BALZON et al., 2013, ALMEIDA et al., 2020).

Contudo, por tratar-se de uma espécie monocotiledônea que não perfilha, a palma de óleo possui impedimentos para ser multiplicada vegetativamente utilizando-se métodos convencionais (JOUANNIC et al., 2011). Diante disso, a micropropagação via embriogênese somática surge como uma das únicas alternativas para a multiplicação clonal da espécie (STARITSKY, 1970; PANNETIER et al., 1981; TEIXEIRA et al., 1995; SILVA et al., 2012; CONSTANTIN et al., 2015).

2.2 - Cultura de Tecidos e Suspensão Celular

Constitui um conjunto de técnicas, mediante as quais explantes são isolados e cultivados assepticamente em um meio nutritivo previamente definido, sob condições ambientais controladas. O fundamento da cultura de tecidos é a totipotência celular, segundo a qual, qualquer célula viva no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (FÉHER et al., 2003; VERDEIL et al., 2007).

As principais técnicas da cultura de tecidos vegetais são constituídas da propagação clonal de mudas em larga escala (micropropagação), da regeneração de plantas livres de vírus e patógenos (limpeza clonal), da conservação de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma) e da produção de plantas transgênicas (ABDULLAH et al., 2005; SOH et al., 2011; GANTAIT et al., 2015). Além disso, a cultura de tecidos é indispensável para a regeneração de plantas melhoradas a partir da

transformação gênica, e parte do pressuposto de que as células possuem a capacidade de se regenerarem integralmente formando um indivíduo novo (Kerbaux, 1999).

Nesse sentido, os meios de cultivo podem ser semissólidos (adicionando-se ágar ou outro agente para gelificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo. Na micropropagação o meio de cultura de consistência semissólido é o mais utilizado, composto por água, macro e micronutrientes e um agente solidificante que pode ser ágar, Phytigel, ou algum derivado de amido ou algas (CALDAS *et al.*, 1998). No entanto, existem fatores limitantes para o cultivo em meio de cultura de consistência semissólido: o elevado custo do gel; alta demanda por mão-de-obra, devido à elevada frequência de subcultivos; formação de um gradiente de nutrientes à medida que o tecido absorve o nutriente; acúmulo de substâncias fitoalelopáticas e de exsudados radiculares que podem prejudicar a absorção de nutrientes e o desenvolvimento e crescimento dos explantes (LEVIN *et al.*, 1997; BARRUETO CID *et al.*, 2002; TEIXEIRA, 2002).

O meio de cultivo em suspensão consiste na multiplicação e manutenção de células e/ou agregados em forma de suspensão em meio líquido. Trata-se de uma ferramenta útil para a micropropagação, melhoramento genético e conservação de recursos genéticos (TOUCHET *et al.*, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1995; KANCHANAPOOM; CHOURYKAEW, 1998; SANÉ *et al.*, 2006; ROOWI *et al.*, 2010; PALANYANDY *et al.*, 2013). As suspensões celulares exibem maior taxa de divisão celular, permitindo um crescimento mais acelerado devido ao contato direto das células com os nutrientes do meio, sendo um prerequisite para que haja a transformação genética. Por meio da suspensão de células é possível obter uma propagação clonal em larga escala utilizando pouco espaço e livre de patógenos, e também favorecem a transformação genética (STEWART *et al.*, 1958; DE VRIES *et al.*, 1988; FELLERS *et al.*, 1995; LAMEIRA *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2020).

Em geral, essas suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis em meio líquido e sob agitação. A agitação permite a desagregação das células que podem se dividir formando pequenos aglomerados celulares ou apenas células isoladas, as quais apresentam taxas de divisão mais elevadas do que as cultivadas de maneira convencional. Para se obter uma suspensão celular onde as células tenham competência para se desenvolver em embriões é necessário que ocorra divisões e multiplicações ativas, formando agregados celulares (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Protocolos para cultura de células e agregados em suspensão e a regeneração dessas já foram relatados para a palma de óleo, embora as diferentes etapas do processo ainda não estejam completamente dominadas (TOUCHET et al., 1991; TEIXEIRA et al., 1995; KANCHANAPOOM; CHOURYKAEW, 1998; ROOWI et al., 2010; PALANYANDY et al., 2013).

2.3 - Embriogênese Somática

No ano de 2005, a *Science* publicou uma edição celebrando os seus 125 anos, na qual apresentou grandes questionamentos científicos que a humanidade ainda não alcançou respostas concisas. No total foram 125 questões selecionadas, e dentre estas as 25 perguntas mais importantes foram discutidas e publicadas na edição comemorativa. Uma destas questões foi: “Como uma única célula somática vegetal consegue se transformar numa planta completa?” (KENNEDY, NORMAN, 2005). De acordo com Vogel (2005), essa indagação figura entre as questões de maior relevância científica que ainda se encontram sem resposta clara e objetiva. Isso se deve ao fato de que os diversos mecanismos: bioquímicos, genéticos e moleculares que envolvem a embriogênese somática, ainda não estão totalmente elucidados.

A embriogênese somática (ES) consiste no desenvolvimento de embriões, partindo de células que não sofreram fusão gamética. Este fenômeno é natural em citrus, ocorrendo a partir de células nucleares. No entanto, células de qualquer planta tem o potencial de entrar nesse processo desde que recebam o estímulo e as condições adequadas (AMMIRATO, 1983). Como resultado desse processo, é possível originar milhares de mudas idênticas à planta matriz em espaços físicos relativamente reduzidos e em qualquer época do ano (REINERT, 1958; WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986; SOH et al., 2011).

A embriogênese somática pode ocorrer de duas formas: direta - quando os embriões se originam diretamente dos tecidos, e indireta, quando ocorre a indução da formação e proliferação de calos antes do desenvolvimento dos embriões (TISSERAT et al., 1979). Entretanto, o embrião somático, quando em desenvolvimento, passa geralmente por estádios característicos da embriogênese zigótica: globular, codiforme, torpedo, cotiledonar e maduro, num processo ontogênico, no qual ao final ocorre a formação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular (ZIMMERMAN, 1993; GUERRA et al., 1999).

A indução da embriogênese somática é o desencadeamento de um processo morfogênético, devido a um estresse físico e/ou químico sofrido pelo explante, sendo a etapa mais crítica para o estabelecimento das culturas embriogênicas *in vitro* (FEHÉR et al., 2002). Já se sabe que o estresse celular desempenha um papel fundamental na mudança de destino da célula, levando à diferenciação celular e formação do embrião (OBERT et al., 2005; BLAZQUEZ et al., 2009; MERATAN et al., 2009). Contudo, não se sabe como e nem a razão que as células vegetais diferenciadas readquirem totipotência e porque esse fenômeno restringe-se a certos genótipos (FEHÉR et al., 2015).

Após a indução de calos primários e embriogênicos, é realizada a multiplicação das culturas embriogênicas, que consiste geralmente da redução nos níveis dos reguladores de crescimento do meio de cultura. Essa redução permite ciclos repetitivos de divisão celular e o controle dos processos de diferenciação (TARMIZI et al., 2004; CHOI et al., 2008; MARBUN et al., 2015). É nessa fase que geralmente suspensões celulares são estabelecidas (GORRET et al., 2004).

Nas fases de diferenciação celular e maturação dos embriões somáticos é necessário fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e induzir o início da diferenciação, e obtenção de embriões somáticos maduros (GUERRA et al., 1999). Após obtenção desses embriões, a germinação é usualmente realizada em meio de cultura livre de reguladores de crescimento (SWATI et al., 2001).

A ES tem sido reconhecida como um caminho eficiente para a regeneração de palmeiras (ZIMMERMAN, 1993). Descrita pela primeira vez em palma de óleo por Staritsky (1970) e Rabechault et al. (1970), cujo objetivo principal era produzir os embriões somáticos advindos de explantes do meristema apical e embrião zigótico, respectivamente. Esse material em contato com o meio e concentrações elevadas de auxinas, reorganiza suas propriedades epigenéticas e ciclo celular para a formação de tecidos em etapas morfológicas semelhantes à embriogênese zigótica (EZ) (REE; GUERRA, 2015).

A embriogênese somática vem sendo amplamente estudada em palma de óleo, utilizando-se como explantes folhas jovens, inflorescências imaturas (TEIXEIRA et al., 1994; GUERRA; HANDRO, 1998; KARUN et al., 2004; KONAN et al., 2010; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010; GUEDES et al., 2011), embriões zigóticos (TEIXEIRA et al., 1993; THUZAR et al., 2011; BALZON et al., 2013; BONETTI et al., 2016).

Todavia, a regeneração das plantas via embriogênese somática não está livre de problemas, observando-se dificuldades em otimizaras metodologias, a ocorrência de plantas anormais fenotipicamente, e a formação de calos não embriogênicos, sendo estes não funcionais na embriogênese somática; os mecanismos que envolvem a embriogênese somática são complexos, assim como a reativação celular, divisão, reprogramação do metabolismo e desenvolvimento (FEHÉR et al., 2003; FLOH et al., 2007), bem como fatores de estresse que desempenham um papel determinante durante a ES (KARAMI; SAIDI, 2010; JIN et al., 2014).

2.4 - Estresse oxidativo e respostas antioxidantes

2.4.1 – Espécies reativas de oxigênio (EROS) e estresse oxidativo

O estresse *in vitro* reflete-se geralmente em estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes *versus* compostos oxidantes, culminando com a elevada formação de ROS (CASSELLS et al., 2001). O papel das ROS durante a morfogênese vem sendo investigado, sugerindo que essas moléculas não são apenas simples sinalizadoras do estresse, mas apresentam também importância na sinalização do crescimento e desenvolvimento das plantas (OBERT et al., 2005; MERATAN et al., 2009; BASKAR et al, 2018; CHAKI et al, 2020).

As ROS são reconhecidas como reguladores fundamentais do crescimento e desenvolvimento de plantas (ARORA et al., 2002; SWANSON; GILROY, 2010; MITTLER, et al, 2011). As ROS exibem uma função dupla em muitos processos de desenvolvimento, que dependem do nível e da distribuição intracelular dessas moléculas (KOCSY, 2013). As altas concentrações de ROS são geralmente tóxicas, levando a danos oxidativos. No entanto, em concentrações apropriadas, as ROS também atuam como moléculas de sinalização que regulam muitas respostas fisiológicas e de desenvolvimento (VRANOVA, et al, 2002; MITTLER, et al, 2011).

As espécies reativas de oxigênio apresentam-se em sua maioria na forma de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e ânion superóxido (O_2^-) e constituem subprodutos do metabolismo celular. Tais subprodutos têm como sítios/locais de produção os peroxissomos, as mitocôndrias e os cloroplastos, assim como podem ser gerados na maturação de sementes (PRUDENTE et al, 2020). Além disso, estresses abióticos e bióticos intensificam a produção de ROS, e isso pode funcionar não só como uma espécie de sinalização a múltiplas respostas de defesa, como também, quando em níveis elevados de produção, causar danos a diversas classes de

biomoléculas, como proteínas, DNA e lipídios (MULLINEAUX et al., 2000; MITTLER, 2002; SOARES; MACHADO, 2007; GUPTA et al, 2018).

Espécies reativas de oxigênio induzem mudanças no padrão de expressão gênica, metabolismo celular e totipotência, importantes para a competência embriogênica em células somáticas (SINGH et al, 2019; CASTRO et al, 2021; SIES et al, 2022). Portanto, acredita-se que um certo nível de estresse oxidativo é requerido para promover a formação de células embriogênicas e desencadear uma rota morfogênica específica (BLAZQUEZ et al., 2009).

2.4.2 – Metabolismo antioxidante

A evolução de um mecanismo altamente eficiente das células das plantas possibilitou a superação da toxicidade das espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua utilização como sinalizadoras moleculares (BAILEY-SERRES; MITTLER, 2006).

Incluída na resposta ao estresse oxidativo celular está a regulação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, as quais reduzem os danos potenciais causados pelas ROS (CAO et al, 2020; RAZA et al, 2022). Enzimas e substâncias antioxidantes podem ser mobilizadas a fim de proteger a célula contra o excesso ou a produção inapropriada de espécies reativas de oxigênio, formadas em decorrência de danos oxidativos (BULBOVAS et al., 2005).

Os danos oxidativos em células e compartimentos subcelulares podem ser evitados pela ativação de mecanismos de defesa enzimáticos, e não enzimáticos (MAGER et al., 2000; AGARWAL; SHAHENN, 2007; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Dentre os mecanismos de defesa enzimáticos, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) (ARORA et al., 2002; BARBOSA et al., 2014; HASANUZZAMAN et al, 2020).

A catalase (CAT) tem função de converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio estável. É a única entre as enzimas que degradam o H_2O_2 que não consome equivalentes redutores da célula e que possui mecanismo muito eficiente para a remoção do peróxido de hidrogênio formado sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000; MHAMDI, et al, 2010; SOFO et al, 2015; PALMA et al, 2020). Isto ocorre desde que a concentração de H_2O_2 esteja em níveis elevados, caracterizando um estresse severo (ARORA et al., 2002; SHARMA; AHMAD, 2014; ANJUM et al, 2016). A CAT é uma enzima tetramérica Fe porfirina, abundante nos peroxissomos. Além disso, apresenta uma classe específica que está localizada nos tecidos vasculares, onde, provavelmente, está

envolvida na proteção contra estresses ambientais (WILLEKENS et al., 1995; MHAMDI, et al, 2010; SHARMA; AHMAD, 2014; SOFO et al, 2015).

As peroxidases (POD) convertem o H_2O_2 em água, além de estarem envolvidas em ligações de polissacarídeos e lignificação da parede celular e na diminuição do processo peroxidativo dos lipídios de membrana (PASTERNAK et al., 2002; LIBIK et al., 2005; BELA et al, 2015; WU et al, 2019). São hemoproteínas que também catalisam a oxidação de compostos fenólicos e estão envolvidas na oxidação do ácido indol-3-acético (AIA), na lignificação, na cicatrização de ferimentos, na defesa contra patógenos, entre outros processos fisiológicos (GASPAR et al., 1982; KAO, 2003; POURCEL et al., 2006; BELA et al, 2015; WU et al, 2019). Além de participar do mecanismo antioxidante, a peroxidase também atua na morfogênese pela oxidação de AIA, e pode, portanto, ser usada como um marcador bioquímico na elucidação e acompanhamento de processos morfogênicos em plantas (ANDERSEN, 1986; LIMA et al, 2002; JAIN et al 2014; WU et al, 2019).

A identificação da oxidação fenólica em tecidos cultivados *in vitro* pode ser avaliada com maior profundidade a partir de estudos correlacionados à atividade de enzimas antioxidativas (BASKARAN et al, 2015; MANQUIÁN-CERDA et al, 2016). A utilização de marcadores bioquímicos, como a peroxidase, pode transpor a subjetividade da identificação visual da morfogênese *in vitro* e auxiliar na identificação precoce de tais processos (PIZA et al., 2003; BASKARAN et al, 2015; ISAH, 2019).

2.5 - Transformação genética

A transformação genética é uma das técnicas de melhoramento genético por inserir o gene de interesse, além de reduzir o tempo de obtenção da planta com a característica de interesse (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 1998). Sendo de grande potencial como ferramenta para auxiliar os programas de melhoramento genético e por tornar possível a introdução de genes de interesse agrônômico, mantendo-se as características genéticas originais da variedade e evitando-se a transferência de características deletérias (BARBOSA, 2002; PEÑA et al., 1995), permitindo assim, o encurtamento do tempo para a obtenção de uma nova variedade de ciclo longo como a palma de óleo.

De maneira geral, a introdução de genes exógenos em plantas via transformação genética é realizada por métodos indiretos (via *Agrobacterium tumefaciens* ou

Agrobacterium rhizogenes) ou direto, como a biobalística (PURKAYASTHA et al., 2010).

Assim sendo, a transformação genética mediada pelo bombardeamento de partículas favorece a transformação genética de culturas recalcitrantes e perenes, como a palma de óleo, pois a técnica permite a transferência de qualquer gene para praticamente qualquer tipo de tecido ou célula (PARVEEZ, 1998; ABDULLAH et al., 2005).

Os trabalhos de transformação genética de palma de óleo visam objetivos como: aumentar o ácido esteárico, o ácido palmitoleico, o ácido ricinoleico, o licopeno (carotenóide) e os plásticos biodegradáveis (Parveez, 2000; Rasid et al., 2014; Parveez, 2015). Murphy et al, (2014) propõem os seguintes três alvos para a modificação genética de palma de óleo: (a) aumento do rendimento de óleo, (b) modificação da composição do óleo, e (c) desenvolvimento de palma de óleo com tolerância a pragas e doenças. Esses três objetivos são as prioridades mais importantes para o aumento da produção global da indústria de óleo de dendê e para a expansão em novos mercados.

2.6 - Transformação genética mediada por biobalística

O processo de biobalística foi inicialmente proposto por SANFORD et al. (1987), com o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de plantas superiores. Desde então, a universalidade de aplicações tem sido avaliada, demonstrando ser um processo também efetivo e simples para a introdução e expressão de genes em bactérias, fungos, protozoários, algas, insetos e tecidos animais (KLEIN et al., 1992; SANFORD et al., 1993 e ARAGÃO et al., 1992). Segundo Sanford (1988), a biobalística abrangeria as três condições principais que compõem um mecanismo ideal de transferência de genes: permitiria a transformação de células, tecidos e espécies mais direta, simples e rapidamente; seria aplicável para a transferência de genes em grandes quantidades de células, tecidos e espécies, para as quais os outros métodos são falhos, e seria de fácil manuseio, podendo transformar eucariotos e procariotos.

A biobalística utiliza microprojéteis impulsionados em alta velocidade para projetar o DNA dentro das células. Este bombardeamento é feito em equipamento apropriado capaz de acelerar as partículas (de 0,2 – 4 µm de diâmetro) cobertas com sequência de DNA a velocidades maiores de 1500 Km/h. Foi demonstrado que estes microprojéteis (de ouro ou tungstênio) penetram a parede e a membrana celular de maneira não letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Posteriormente, o

DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular e integrado no genoma nuclear do organismo receptor (ARAGÃO et al., 1992).

Muitos equipamentos foram desenvolvidos para a aceleração de micropartículas, utilizando sistemas de onda de choque gerados por uma explosão química; de pressão de gás hélio, ou descarga elétrica (PEREIRA; VIEIRA, 2006). O equipamento (acelerador de micropartículas ou bombardeador) é composto basicamente por uma câmara de pressão, solenóide, agulha e regulador de pressão do gás hélio. Esse conjunto é conectado a uma bomba de vácuo e ao cilindro de gás hélio. Durante o processo de bombardeamento, as micropartículas são depositadas em uma membrana carreadora e na câmara pressurizada do acelerador de partículas (*gun*) há liberação de uma onda de choque sob alta pressão de gás hélio, ocorrendo a formação de uma onda de choque, a solenóide é ativada fazendo com que haja a energização e deslocamento da agulha que rompe a membrana de ruptura e impulsionando a membrana carreadora contendo as micropartículas envoltas no DNA. Essas, por sua vez, são carreadas na direção do tecido vegetal a ser transformado. Dessa maneira, as micropartículas penetram a parede e a membrana celular de maneira não-letal, alojando-se nas organelas celulares. Posteriormente o líquido celular separa as micropartículas do DNA recém introduzido (RECH; ARAGÃO, 1998) (Figura 1).



Figura 1. Bombardeador ou acelerador de partículas. Esquema representando a biobalística, método de transferência direta de genes mais usado para transformar células vegetais. Fonte: google imagens (2017).

O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para a recuperação *in vitro* eficiente de plantas transgênicas. O marcador de seleção confere caráter dominante às células transformadas, resultantes da incorporação de nova característica, que não está presente nas células não transformadas. Essa nova característica permite a sobrevivência da célula vegetal transformada na presença de um agente de seleção que é, geralmente, um antibiótico ou um herbicida (BOWEN, 1993).

Diferentes fontes de explantes de palma de óleo influenciam a porcentagem de transformação. De acordo com Ismail et al. (2010), verificaram que calos apresentaram uma maior taxa de transformação (78% - 100%), que é muito maior em comparação com as plântulas derivadas de embriões imaturas (10 - 32%), pela expressão do gene *gus* (ISMAIL et al., 2010).

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, R.; ZAINAL, A.; HENG, W. Y.; LI, L. C.; BENG, Y. C.; PHING, L. M.; SIRAJUDDIN, S. A.; PING, W. Y. S.; JOSEPH, J. L.; JUSOH, S. A. Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.8, p.24-34, 2005.

ABDULLAH, Ruslan et al. Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 24-34, 2005.

ABRAPALMA. Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma. A palma no Brasil e no mundo. Disponível em: < <http://www.abrapalma.org/pt/a-palma-no-brasil-e-no-mundo> >. Acesso em 30 de junho de 2017.

ADAM, H.; JOUANNIC, S.; ESCOUTE, J.; DUVAL, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGGAR, J. W. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). **American Journal of Botany**, v. 92, n. 11, p. 1836-1852, 2005.

AGARWAL, S.; SHAHEEN, R. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.2, p.149-161, 2007.

ALI, M.B.; SINGH, N.; SHOAEL, A.M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. **Plant Science**, v.171, p.147-154, 2006.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In **Handbook of plant cell culture** (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds.). Macmilan Publisher Co. New York, p.82-123. 1983.

ANDERSEN, W.C.A. A revised medium for shoot multiplication of Rhododendron. **Journal American American Society Horticultural Science**, v.109, p.343-347, 1986.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

APICHAHMETTA, Kingkaew; SUDSIRI, Chadapust J.; RITCHIE, Raymond J. Photosynthesis of Oil Palm (*Elaeis guineensis*). **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 34-40, 2017.

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, p. 142-50, 1996.

ARAGÃO, F.J.L.; SÁ, M.F.G.D.; ALMEIDA, E.R.; GANDER, E.S.; RECH, E.L. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Molecular Biology**, v.20, p.357-359, 1992.

ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current science**, p. 1227-1238, 2002.

ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50 p.601–639, 1999.

AZEVEDO, R.A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998.

BADAWY, E. M.; HABIB, A. M., EL-BANNA, A. A., & YOUSRY, G. M.. Effect of some factors on somatic embryos formation from callus suspensions cultures in *Phoenix dactylifera* L.

cv. Sakoty. In: **4th Conference on Recent Technologies in Agriculture**. Giza, Egipto. 2009. p. 593-599.

BAILEY-SERRES, J.; MITTLER R. The roles of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, p. 311, 2006. DOI /10.1104/pp.104.900191.

BAKOUMÉ, Claude; LOUISE, Claude. Breeding for oil yield and short oil palms in the second cycle of selection at La Dibamba (Cameroon). **Euphytica**, v. 156, n. 1-2, p. 195-202, 2007.

BALZON, T. A.; LUIZ, 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.

BARBOSA, J. **Estudo de fatores que influenciam o processo de transformação genética em citros via *Agrobacterium tumefaciens***. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 51p. 2002.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; RANGEL CAMARA, T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.

BARCELOS, E.; CUNHA, R. N. V. e NOUY, B. Recursos genéticos de Dendê (*Elaeis guineensis*, Jacq. e *E. oleifera* (Kunth) Cortés) disponíveis na Embrapa e sua utilização. In: MULLER, A.; FURLAN, J. (Eds.). **Agronegócio do Dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia**. 1. ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 131-143. 2001.

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.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARRUETO CID, P.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. Biorreatores de imersão permanente. **Biотecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 25, p. 50-53. 2002.

Baskaran, P., Kumari, A., Naidoo, D., & Van Staden, J. In vitro propagation and biochemical changes in Aloe pruinosa. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 51-58, 2015.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase improved as says and as say applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, p. 276-287, 1971.

Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., & Csiszár, J.. Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. **Journal of Plant Physiology**, v. 176, p. 192-201, 2015.

BERGER, K. G.; IDRIS, Nor Aini. Formulation of zero-trans acid shortenings and margarines and other food fats with products of the oil palm. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 11, p. 775-782, 2005.

BHASKARAN, Shyamala; SMITH, Roberta H. Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of Phoenix dactylifera cv. Barhee. **Plant cell reports**, v. 12, n. 1, p. 22-25, 1992.

BHORE, S. J.; SHAH, F. H. Genetic transformation of the American oil palm (*Elaeis oleifera*) immature zygotic embryos with antisense palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase (PATE) gene. **World Applied Sciences Journal**, Deira, v. 16, n.3, p. 362-369, 2012.

BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 97, n. 1, p. 49-57, 2009.

- BONETTI, K. A. P. et al. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineenses* × *Elaeis oleifera*). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 37, p. 2028-2037, 2016.
- BORÉM, A.; VIEIRA, M.L.C. **Glossário de Biotecnologia**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 126p. 2005.
- BOUFIS, N., KHELIFI-SLAOUI, M., DJILLALI, Z., ZAOUI, D., MORSLI, A., BERNARDS, M. A., KHELIFI, L. Effects of growth regulators and types of culture media on somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Degla Beida). **Scientia Horticulturae**, v. 172, p. 135-142, 2014.
- BOWEN, B.A. Markers for plant gene transfer. In: KUNG, S.; WU, R. (Eds.). **Transgenic plants**. San Diego: Academic Press, v.1, p. 89-123. 1993.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BULBOVAS, P.; RINALDI, M.C.S.; DELITTI, W.B.C.; DOMINGOS, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.4, p.687-698, out.-dez. 2005.
- CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.87-132.
- CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P. DA; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.
- CARNEIRO, Andréa Almeida; CARNEIRO, Newton Portilho; PAIVA, Edilson. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Embrapa Milho e Sorgo, 2004.
- CARTER, C.; FINLEY, W.; FRY, J.; JACKSON, D.; WILLIS, L. Palm oil markets and future supply. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 4, p. 307-314, 2007.
- CASELLS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.145-157, 2001.
- 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, p. 1227-1234, 2012.
- CHAVEZ, C. **Menjoramiento genético**. Curso de palma aceitera. Palm Research Program. Golfito, Coto 54, Costa Rica, 1984.
- CHEAH, S. C.; SAMBANTHAMURTHI, R.; SITI NOR AKMAR, A.; ABRIZAH, O.; MANAF, M. A. A.; UMI SALAMAH, R.; PARVEEZ, G. K. A. Towards Genetic Engineering of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In KADER, J.C.; MAZLIAK, P. (Eds.). **Plant Lipid Metabolism**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 570-572, 1995.
- CHEHMALEE, S.; TE-CHATTO, S. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **Journal of Agricultural Technology**, v.4, p.137-146, 2008.
- CHOI, D. S.; ANDRADE, M. H. C.; WILLIS, L. B.; CHO, C. W.; SCHOENHEIT, J.; BOCCAZZI, P.; SAMBANTHANMURTHI, R.; SINSKEY, A. J.; RHA, C. K. Effect of agitation and aeration on yield optimization of oil palm suspension culture. **Journal of Oil Palm Research**, v. 1, p. 23, 2008.

- CHRISTOU, Paul. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. **Euphytica**, v. 85, n. 1, p. 13-27, 1995.
- CONSTANTIN, M.; NCHU, W. A.; GODSWILL, N. N.; WIENDI, N. M. A.; WACHJAR, A.; FRANK, N. E. G. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *Tenera*) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. **Journal of Applied Biology & Biotechnology** Vol, v. 3, n. 04, p. 004-010, 2015.
- CORLEY, R. H. V. How much palm oil do we need?. **Environmental Science & Policy**, v. 12, n. 2, p. 134-139, 2009.
- CORLEY, R. V. H.; BARRET, J. N.; JONES, L. H. Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. **Oil Palm News**, n. 22, p. 2-7, 1977.
- CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. **The oil palm**: Fifth. United State America: The Atrium, Southern Gate, 2016.
- CORRÊA, Thais Roseli et al. Estimation of genetic parameters for in vitro oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil yield. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 1033-1038, 2015.
- CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; ROCHA, R. N. C. da; LIMA, W. A. A. de; TEIXEIRA, P. C.; BARCELOS, E.; R Domesticação e Melhoramento do Caiaué Domestication and breeding of the American oil palm. In: BOREM, A.; LOPES, M.T.G.; CLEMENT, C.R.; NODA, H. (Ed.). **Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas**. Viçosa, MG: Suprema Editora Ltda., v. 1, p. 275-296, 2009.
- CYRNE, L.; MARTINS, L.; FERNANDES, L.; MARINHO, H. S. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 3, p. 385-393, 2003.
- DE VRIES, Sacco C. et al. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. **Planta**, v. 176, n. 2, p. 196-204, 1988.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus, vol. 12, no. 1, p. 13-15. 1990.
- DRANSFIELD, J.; UHL, N. W. *Palmae*. In: **Flowering Plants• Monocotyledons**. Springer Berlin Heidelberg, p. 306-389. 1998.
- DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. **Genera Palmarum – the evolution and classification of palms**, 2nd edn. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK. p.732. 2008.
- DURAND-GASSELIN, T.; GUEN, V. L.; KONAN, E.; DUVAL, Y. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantations in Cote d'Ivoire obtained through in vitro culture. First results. **Oléagineux**, v. 45, n. 1, p. 1-11, 1990.
- DURZAN, D. J. Applications of cell and tissue culture in tree improvement. In: Applications of **Plant Cell and Tissue Culture**. Ciba Foundation Symposium 137. Wiley, Chichester, p. 36-58, 1988.
- DUVAL, Y.; DURAND-GASSELIN, T.; KONAN, K.; Pannetier, C. Vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by in vitro culture. Strategy and results. **Oleagineux**, v. 43, n. 2, p. 39-47, 1988.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa Amazônia Ocidental para a cultura do dendezeiro**. Brasília, 2013. 76 p. (Documentos,102).
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa SOC - software científico: versão 2.1**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **USDA.gov - United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<https://www.usda.gov/>> Acesso em: 25 jun. 2017.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; OTVOS, K.; MISKKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Section Botany**, v.57, p.5-12, 2002.

FEHÉR, Attila. 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.

FEHÉR, Attila; PASTERNAK, Taras P.; DUDITS, Denes. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FERGUSON I.B., WATKINS C.B., HARMAN J.E., 1983 - Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons. - **Plant. Physiol.** 71: 182-186.

FERREIRA, C. B. B.; LOPES, M. T. G.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; MOREIRA, D. A.; BARROS, W. S.; MATIELLO, R. R. Molecular genetic diversity of oil palm progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 378-384, 2012.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, v. 1, n. 1, p. 1-9. 2011.

FILONOVA, L. H.; BOZHKROV, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. V. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, 2000.

FINER, John J. Generation of Transgenic Soybean (*Glycine max*) via Particle Bombardment of Embryogenic Cultures. **Current Protocols in Plant Biology**, p. 592-603, 2016.

FKI, L., MASMOUDI, R., DRIRA, N., & RIVAL, A. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 6, p. 517-524, 2003.

FLOH, Eny Iochevet Segal; SANTA-CATARINA, Claudete; SILVEIRA, Vanildo. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 1992-2001, 2007.

FURLAN JÚNIOR, J. **Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, p. 41-66. 2001.

GAJ, Malgorzata D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, n. 1, p. 27-47, 2004.

GANTAIT, S.; SINIAH, U. R.; SURANTHRAN, P.; PALANYANDY, S. R.; SUBRAMANIAM, S. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. **Protoplasma**, v.252, p.89-101, 2015.

GASPAR, T. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, v.37, p.263-285, 2002.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. **Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève: Université de Genève, 324p. 1982.

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. Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.51, p.111-117, 2015.
- 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, n. 4, p. 857-874, 2011.
- GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W. G.; RICE, T. B. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **The Plant Cell Online**, v. 2, n. 7, p. 603-618, 1990.
- GORRET, N.; ROSLI, S. K. B.; OPPENHEIM, S. F.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P.A.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculums size, and conditioned medium on biomass production. **Journal of Biotechnology**, v. 108, p. 253-263, 2004.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, p.183-260, 1998.
- GUEDES, R., DA SILVA, T. L., LUIS, Z. G., & SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 52, p. 10774-10780, 2011.
- GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.111, p.65-71, 1998.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ads.). **Culturas de tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB. v.2, p.533-568, 1999.
- HAMEED, H. B.; LAI, L. F.; CHIN, L. H. Production of biodiesel from palm oil (*Elaeis guineensis*) using heterogeneous catalyst: An optimized process. **Fuel Processing Technology**, v.90, p.606-610, 2009.
- HARTLEY, C.W.S., **The oil palm (*Elaeis guineensis*)**, 3rd Edn, Longman, London. 806p. 1988.
- HUANG, H., ULLAH, F., ZHOU, D. X., YI, M., & ZHAO, Y.. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 800, 2019.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.
- ISAH, Tasiu. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, v. 52, 2019.
- ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 745-750, 1996.
- ISMAIL, I.; ISKANDAR, N. F.; CHEE, G. M.; ABDULLAH, R. Genetic transformation and molecular analysis of polyhydroxybutyrate biosynthetic gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var Tenera) tissues. **Plant Omics Journal** 3:18-27. 2010.
- JAIN, P., KACHHWAHA, S., & KOTHARI, S. L. Chloroplast ultra structure, photosynthesis and enzyme activities in regenerated plants of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni as influenced by copper sulphate in the medium. 2014.
- JIN, F., HU, L., YUAN, D., XU, J., GAO, W., HE, L., YANG, X. and ZHANG, X. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence

for stress response functions in SE development. **Plant biotechnology journal**, v. 12, n. 2, p. 161-173, 2014.

JOUANNIC, S.; LARTAUD, M.; HERVÉ, J.; COLLIN, M.; ORIEUX, Y.; VERDEIL, J. L.; TREGGAR, J. W. The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; Arecaceae): developmental progression and dynamics. **Annals of botany**, v. 108, n. 8, p. 1477-1487, 2011.

KADIR, Ghulam; PARVEEZ, Ahmad. Production of transgenic oil palm (*Elaeis guineensis* JACQ.) using biolistic techniques. In: **Molecular biology of woody plants**. Springer Netherlands, 2000. p. 327-350.

KANCHANAPOOM, K.; CHOURYKAEW, B. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Science Society of Thailand**, p. 241-250, 1998.

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.

KAR, Manoranjan; MISHRA, Dinabandhu. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

KARAMI, Omid; SAIDI, Abbas. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 5, p. 2493-2507, 2010.

KARUN, Anitha et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, p. 1623-1628, 2004.

KENG, P. S.; BASRI, M.; ZAKARIA, M. R. S.; RAHMAN, M. A.; ARIFF, A. B.; RAHMAN, R. A.; SALLEH, A. B. Newly synthesized palm esters for cosmetics industry. **Industrial crops and products**, v. 29, n. 1, p. 37-44, 2009.

KENNEDY, Donald; NORMAN, Colin. What don't we know?. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 75-75, 2005.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, 1999. v. 2, p. 519-531.

KHAN, M., ALI, S., AL AZZAWI, T. N. I., SAQIB, S., ULLAH, F., AYAZ, A., & ZAMAN, W. The key roles of ROS and RNS as a signaling molecule in plant-microbe interactions. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 268, 2023.

KHAW, C. H.; NG, S. K. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantings in Malaysia. In: **International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Part 2 461**. 1997. p. 251-258.

KLEIN, T.M.; ARENTZEN, R.; LEWIS, P.A.; FITZPATRICK-McELLIGOTT, S.F. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. **Biotechnology**, New York, v.10, p. 286-291, 1992.

KOCSY, G.; TARI, I.; VANKOVÁ, R.; ZECHMANN, B.; GULYÁS, Z.; POÓR, P.; GALIBA, G. Redox control of plant growth and development. **Plant Science**, v. 211, p. 77-91, 2013.

KONAN, K. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, 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, 2010.

KONAN, K. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; RIVAL, A. A modeling approach of the *in vitro* conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 84, n. 1, p. 100-113, 2006.

- Kong, E. Y., Biddle, J., Foale, M., & Adkins, S. W.. Cell suspension culture: A potential in vitro culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112125, 2020.
- KURNIA, J. C.; JANGAM, S. V.; AKHTAR, S.; SASMITO, A. P.; MUJUMDAR, A. S. Advances in biofuel production from oil palm and palm oil processing wastes: a review. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 332-346, 2016.
- Lameira, O. A., Pinto, J. E. B. P., Cardoso, M. G., & Arrigoni-Blank, M. F.. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, p. 7-11, 2009.
- LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semiautomated micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 447, p. 659-663, 1997.
- LIBIK, Marta et al. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant cell reports**, v. 23, n. 12, p. 834-841, 2005.
- LIMA, G.P.P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I.M.T.; CEREDA, M.P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv MCOL 22) cultivada in vitro. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.2, p.107-110, mai-ago, 2002.
- LIU, Guoquan; CAMPBELL, Bradley C.; GODWIN, Ian D. Sorghum genetic transformation by particle bombardment. **Cereal Genomics: Methods and Protocols**, p. 219-234, 2014.
- LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras)**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. Nova Odessa, 368p. 2010.
- LOW, E. T. L.; ALIAS, H.; BOON, S. H.; SHARIFF, E. M.; TAN, C. Y. A.; OOI, L. C.; 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.
- MAGER, W.H; BOER, A.H.; SIDERLUS, M.H.; VOSS, H.P. Cellular responses to oxidative and osmotic stress. **Cell Stress & Chaperones**, v.5, n.2, p.73- 75, 2000.
- MALIKE, A. F.; ABDULAH, N.; AMIRUDDIN, Mohd Din. **Selection of oil palm clones with high bunch index for Recloning at Malaysian Palm Oil Board (MPOB)**. In: International Annual Symposium on Sustainability Science and Management, in Terengganu, Malaysia. 2012.
- MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response to alga cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.
- Manquían-Cerda, K., Escudey, M., Zúñiga, G., Arancibia-Miranda, N., Molina, M., & Cruces, E. . Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 133, p. 316-326, 2016.
- MARBUN, C. L. M.; TORUAN-MATHIUSA, N.; REFLINIA; UTOMOA, C.; LIWANG, T. Micropropagation of embryogenic callus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using temporary immersion system. **Procedia Chemistry**, v.14, p.122-129, 2015.
- MARTINE, B. M.; LAURENT, K. K.; PIERRE, B. J.; EUGÈNE, K. K.; HILAIRE, K. T.; JUSTIN, K. Y. Effect of storage and heat treatments on the germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seed. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 931-937, 2009.
- MARTINEZ, S.; BESSOU, C.; HURE, L.; GUILBOT, J.; HELIAS, A. The impact of palm oil feedstock within the LCA of a bio-sourced cosmetic cream. **Journal of Cleaner Production**, 2017.
- MAY, Choo Yuen; NESARETNAM, Kalanithi. Research advancements in palm oil nutrition. **European journal of lipid science and technology**, v. 116, n. 10, p. 1301-1315, 2014.

- MBA, Ogan I.; DUMONT, Marie-Josée; NGADI, Michael. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry—A review. **Food bioscience**, v. 10, p. 26-41, 2015.
- MEKHILEF, S.; SIGA, S.; SAIDUR, R. A review on palm oil biodiesel as a source of renewable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 4, p. 1937-1949, 2011.
- MERATAN, A.A.; GHAFARI, S.M.; NIKNAM, V. In vitro organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. **Biologia Plantarum**, v.53, n.1, p.5-10, 2009.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; 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.
- MØLLER, I. M., JENSEN, P. E. & HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p. 459-481, 2007.
- MØLLER, Ian M.; JENSEN, Poul Erik; HANSSON, Andreas. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 459-481, 2007.
- MONTOYA, C.; COCHARD, B.; FLORI, A.; CROS, D.; LOPES, R.; CUELLAR, T.; ESPEOUT, S.; SYAPUTRA, I.; VILLENEUVE, P.; PINA, M.; RITTER, E.; LEROY, T.; BILLOTTE, N. Genetic architecture of palm oil fatty acid composition in cultivated oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) compared to its wild relative *E. oleifera* (HBK) Cortés. **Plos One**, v. 9, p. 95412-95412, 2014.
- MORCILLO, F., GALLARD, A., PILLOT, M., JOUANNIC, S., ABERLENC-BERTOSSI, F., COLLIN, M.; TREGAR, J. W. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. **Planta**, v. 226, n. 6, p. 1353-1362, 2007.
- MUKHERJEE, I.; SOVACOO, 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.
- MUKHERJEE, Ishani; SOVACOO, Benjamin 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.
- MULLINEAUX, P.; BALL, L.; ESCOBAR, C.; KARPINSKA, B.; CREISSEN, G.; KARPINSKI, S. Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of Arabidopsis antioxidant defense gene expression in response to excess excitation energy? **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.355, p.1531–1540, 2000.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURPHY, Denis J. The future of oil palm as a major global crop: opportunities and challenges. **J Oil Palm Res**, v. 26, n. 1, p. 1-24, 2014.
- MYINT, T.; CHANPRASERT, W.; SRIKUL, S. Germination of seed of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as affected by different mechanical scarification methods. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 635-645, 2010.
- NAIK, Poornananda M.; AL-KHAYRI, Jameel M. Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Through Cell Suspension Culture. **Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition**, p. 357-366, 2016.
- NAMASIVAYAM, Parameswari. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 1, p. 1-8, 2007.

- NIEVES, N.; SEGURA-NETO, M.; BLANCO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J.L.; CASTILLO, R. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 3, p. 343-345, 2003.
- OBERT, B.; BENSON, E. E.; MILLAM, S.; PRET'OVÁ, A.; BREMNER, D. H. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax in vitro cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of plant physiology**, v. 162, n. 5, p. 537-547, 2005.
- ODIA, Osaretin J.; OFORI, Sandra; MADUKA, Omosivie. Palm oil and the heart: a review. **World journal of cardiology**, v. 7, n. 3, p. 144, 2015.
- Okuley J, Lightner J, Feldmann K, Yadav N, Lark E, Browse J.. Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. **Plant Cell** 6:147–158. 1994.
- OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 381, p. 291-301, 2003.
- OOI, S.E.; NOVAK, O.; DOLEZAL, K.; ISHAK, Z.; ONG-ABDULLAH, M.O. Cytokinin differences in in vitro cultures and inflorescences from normal and mantled oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of plant growth regulation**, v. 32, n. 4, p. 865-874, 2013.
- OOSTERVEER, P. Promoting sustainable palm oil: viewed from a global networks and flows perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 107, p.146-153, 2015.
- PALANYANDY, S. R.; SURANTHRAN P.; GANTAIT, S.; SINNIHA, U. R.; SUBRAMANIAM, S.; AZIZ, M. A.; ALWEE, S. S. R. S.; ROOWI, S. H. In vitro developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 5, p. 1727-1733, 2013.
- Palm Oil Research. Statistics. Disponível em: <<http://www.palmoilresearch.org/statistics.html>>. Acessado em 25 de julho de 2017.
- PANNETIER, Catherine; ARTHUIS, P.; LIEVOUX, D. Néoformation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. **Oléagineux**, v. 36, n. 3, p. 119-122, 1981.
- PARVEEZ, G. K. A.; CHOWDHURY, M. K. U.; SALEH, N. M. Current status of genetic engineering of oil bearing crops. **Asia-Pacific Journal on Molecular Biology and Biotechnology** 3, 174-192, 1994.
- PARVEEZ, G. K. A.; CHRISTOU, P. Biolistic-mediated DNA delivery and isolation of transgenic oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryogenic callus cultures. **Journal of Oil Palm Research**, v. 10, n. 2, p. 29-38, 1998.
- PARVEEZ, G. K. A.; MASRI, M. M.; ZAINAL, A.; MAJID, N. A.; YUNUS, A. M. M.; FADILAH, H. H.; RASID, O.; CHEAH, S. C. Transgenic oil palm: production and projection. **Biochem. Soc. Trans.** 28, 969–972, 2000.
- PARVEEZ, G.K.A. Production of transgenic oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using biolistic techniques. In: JAIN, S.M. and MINOCHA, S.C. eds. **Molecular Biology of Woody Plants**. Kluwer Academic Publishers, vol. 2, p. 327-335, 2000.
- PARVEEZ, Ghulam Kadir Ahmad et al. Biotechnology of oil palm: strategies towards manipulation of lipid content and composition. **Plant cell reports**, v. 34, n. 4, p. 533-543, 2015.
- PASTERNAK, T.P.; AYAYDIN, E.P.F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; ONCKELEN, H.A.V.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, 2002.

- PEÑA, L., et al. High efficiency Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v. 104, p. 183–191, 1995.
- PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Transformação de plantas. In: PÍPOLO, V. C.; GARCIA, J. E. **Biotecnologia na agricultura: aplicações e biossegurança**. 1ª Ed :Cascavel-PR, p. 59-83, 2006.
- PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 361-366, 2003.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. **Annual review of plant biology**, v. 42, n. 1, p. 205-225, 1991.
- POURCEL, L.; ROUTABOUL, J.; CHEYNIER, V.; LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Plant Science**, v. 12, n.1, 2006.
- PRUDENTE, D. O; SOUZA, L.; PAIVA, R. Embriogênese somática vegetal: papel modulador do estresse oxidativo. **Proc. Nacional Acad. Sci., Índia, sec. B Biol. ciência** 90 , 483–487, 2020.
- PURKAYASTHA, J.; SUGLA, T.; PAUL, A.; SOLLETI S, K.; MAZUMDAR, P.; BASU, A.; MOHOMMAD, A.; AHMED, Z.; SAHOO, L. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 13-20, 2010.
- R Development Core Team (2016) **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- RABÉCHAULT, H.; MARTIN, J. P. Multiplication végétative du palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) a l'aide de cultures de tissus foliaires. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences. Serie D (France)** v. 285 (16) p. 1735-1737, 1976.
- RABECHAULT, Henri; AHÉE, Jeanne; GUENIN, Gilbert. Colonies cellulaires et formes embryoides obtenues in vitro a partir de cultures d'embryons de Palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). **Acad Sci Compt Rend Ser D**, 1970.
- RAJESH, M. K.; RADHA, E.; KARUN, A.; PARTHASARATHY, V. A. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm—the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, n. 1, p. 41-47, 2003.
- RASID, O. A. et al. Molecular cloning and regulation of oil palm (*E. guineensis* Jacq.) phytoene desaturase in developing mesocarp tissues. **Journal of Oil Palm Research**, v. 26, n. 1, p. 37-46, 2014.
- RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação genética de plantas**. 1ª Ed: Brasília-DF, Ed Embrapa-SPI, p. 51-64, 1998.
- RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGAO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature protocols**, v. 3, n. 3, p. 410, 2008.
- REE, Joseph Francis; GUERRA, Miguel Pedro. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 6, p. 589-602, 2015.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.
- RIVAL, A.; ABERLENC, F.; MORCILLO, F.; TREGGAR, J.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y. Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 74-82, 1997.

ROOWI, S. H.; HO, C. L.; ALWEE, S. S. R. S.; ABDULLAH, M. O.; NAPIS, S. Isolation and characterization of differentially expressed transcripts from the suspension cells of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxins. **Molecular Biotechnology**, v. 46, p.1–19, 2010.

ROSE, Ray J. Somatic embryogenesis in the *Medicago truncatula* model: cellular and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 267, 2019.

RUTTAJORN, K.; NAKKAEW, A.; PANRAT, T.; VANICHANON, A.; PHONGDARA, A. Isolation, expression analysis and characterization of EgNDL, a NDR-like protein in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 38, n. 3, 2016.

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

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

SANFORD, J. C. **The biolistic process. A new concept in gene transfer and biological delivery**. TIBTech, v. 6, p. 299-302, 1988.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27-37, 1987.

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSEL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. IN: WU, R. (ed.). *Recombinant DNA – Part H*. San Diego: Academic Press, p. 483-510, 1993.

SAVIN, G. **O dendezeiro no Estado da Bahia**. Ministério da Agricultura/Instituto de óleos, Brasília. 1965.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E; GUEDES, R. S.; SILVA T. L.; FERMINO, J. R. P. C. P; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, n. 4, p. 378-385, 2010.

SCHLUETER J, VASYLENKO-SANDERS I, DESHPANDE S, YI J, SIEGFRIED M, ROE B, SCHLUETER S, SCHEFFLER B, SHOEMAKER R..The FAD2 gene family of soybean: Insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. **Crop Sci** 47:S14–S26. 2007.

SILVA NETO, S. P.; ANDRADE, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. *Biotechnology estado da arte e aplicações na agropecuária*. 1ª Ed: Planaltina-DF, Embrapa-Cerrados, p. 411-434, 2011.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n. 1, p. 59-67, 2012.

SINGH, R.; ONG-ABDULLAH, M.; LOW, E. T. L.; MANAF, M. A. A.; ROSLI, R.; NOOKIAH, R.; AZIZI, N. Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 335, 2013.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

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

SRISAWAT, Theera; KANCHANAPOOM, Kamnoon. The influence of physical conditions on embryo and protoplast culture in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **ScienceAsia**, v. 31, p. 23-28, 2005.

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

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

STEWART, F. C.; MAPES, Marion O.; MEARS, Kathryn. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, p. 705-708, 1958.

SUMATHI, S.; CHAI, S. P.; MOHAMED, A. R. Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 9, p. 2404-2421, 2008.

SUNDRAM, K.; SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Y. Palm fruit chemistry and nutrition. Asia Pacific **Journal of Clinical Nutrition**, v.12, p.355-362, 2003.

SWANSON, Sarah; GILROY, Simon. ROS in plant development. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 384-392, 2010.

SWATI, J.; ALOK, V; KOTHARY, S. L.; JAIN, S.; VARSHINEY, A. Cereal Research Communications, v. 19, p. 230-231, 2001.

TAN, K. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R.; Bhatia, S. Palm oil: addressing issues and towards sustainable development. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 13, n. 2, p. 420-427, 2009.

TARMIZI, A. H.; NORJIHAN, M. A.; ZAITON, R. Multiplication of oil palm suspension cultures in a bench-top (2 litre) bioreactor. **Journal of Oil Palm Research**, v.16, p.44-49, 2004.

TE-CHATO, Sompong et al. Improve callus induction and embryogenic callus formation from cultured young leaves of oil palm seedling. **Thai Journal of Agricultural Science**, v. 35, n. 4, p. 407-413, 2002.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v. 153, n. 1, p. 65-72, 2000.

TEIXEIRA, J. B., SONDAHL, M. R., NAKAMURA, T.; KIRBY, E. G. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, n. 2, p. 105-111, 1995.

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, n. 3, p. 227-233, 1993.

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 247-250, 1994.

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores. **Biotechnologia – Ciência e Desenvolvimento**. Ano 4, n. 24, p. 36-41, 2002.

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, n. 1, p. 123-128, 2011.

- THUZAR, Mya et al. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. **Acta physiologiae plantarum**, v. 33, n. 1, p. 123-128, 2011.
- TISSERAT, B.; ESAN, E. B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Reviews**, Volume 1, p. 1-78, 1979.
- TOONEN, M. A., HENDRIKS, T., SCHMIDT, E. D., VERHOEVEN, H. A., van KAMMEN, A. B., & de VRIES, S. C. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. **Planta**, v. 194, n. 4, p. 565-572, 1994.
- TOONEN, M. A., SCHMIDT, E. D., HENDRIKS, T., VERHOEVEN, H. A., van KAMMEN, A., & de VRIES, S. C. Expression of the JIM8 cell wall epitope in carrot somatic embryogenesis. **Planta**, v. 200, n. 2, p. 167-173, 1997.
- TORRES, A. C., CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 252 - 264.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G. de; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. Glossário de biotecnologia vegetal. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.
- TORRES, E. A.; COLLANTES, H. D. C.; ALVES, C. T.; SANTOS, D. C.; CAMELIER, L. A. Biodiesel: o combustível para o novo século. *Bahia Análise e Dados*, v. 16, p. 89-95, 2006.
- TOUCHET, B.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 529-532, 1991.
- TREGEAR, J. W.; RIVAL, A.; PINTAUD, J. C. A family portrait: unravelling the complexities of palms. *Annals of Botany*, v.108, p.1387-1389, 2011.
- TRIPATHI, D., NAM, A., OLDENBURG, D. J., & BENDICH, A. J.. Reactive oxygen species, antioxidant agents, and DNA damage in developing maize mitochondria and plastids. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 596, 2020.
- VALLEJO, R. G. e CASSALETT, D. C. Perspectivas del cultivo de los híbridos interespecíficos de noli (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortez) x palma africana de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Colombia. **Revista Instituto Colombiano de Agricultura**, v. 10, n. 1, p. 19-35, 1975.
- VAN HENGEL, Arjon J.; TADESSE, Z., IMMERZEEL, P., SCHOLS, H., VAN KAMMEN, A. B., & de VRIES, S. C.. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1880-1890, 2001.
- VEIGA, A. S.; FURLAN JÚNIOR, J.; KALTNER, F. J. Situação atual e perspectivas futuras da dendecultura nas principais regiões produtoras: a experiência do Brasil. In: MÜLLER, A. A.;
- VERDEIL, J. L.; ALEMANN, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **TRENDS in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 245-252, 2007.
- VOGEL, Gretchen. How does a single somatic cell become a whole plant?. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 86-86, 2005.
- VRANOVA, E., INZE, D., and VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **J. Exp. Bot.** 53, 1227–1236. 2002.
- WILLEKENS, H., INZÉ, D., VAN MONTAGU, M. & VAN CAMP, W. Catalase in plants. **Molecular Breeding**. v.1 p.207-228,1995.
- WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic Embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.

Wu, C., Ding, X., Ding, Z., Tie, W., Yan, Y., Wang, Y., ... & Hu, W. . The class III peroxidase (POD) gene family in cassava: identification, phylogeny, duplication, and expression. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 11, p. 2730, 2019.

YASUDA, H., NAKAJIMA, M., MASUDA, H., & OHWADA, T. Direct formation of heart-shaped embryos from differentiated single carrot cells in culture. **Plant science**, v. 152, n. 1, p. 1-6, 2000.

ZHAO, Z.-Y., Gu, W., CAI, T., TAGLIANI, L.A., HONDRED, D., BOND, D., KRELL, S., RUDERT, M.L., BRUCE, W.B. and PIERCE, D.A. Molecular analysis of T₀ plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. **Maize Genet. Coop. Newsl.** 72: 34–37. 1998.

ZHENG, Y.; LI, Y.; ZHANG, Y.; RUAN, X.; ZHANG, R. Purification, characterization, synthesis, in vitro ACE inhibition and in vivo antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 28, p. 48-58, 2017.

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

ZOBAYED, S. M. A.; SAXENA, P. K. In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. **Plant science**, v. 165, n. 3, p. 463-470, 2003.

ZUPAN, J.; MUTH, T.R.; DRAPER, O.; ZAMBRYSKI, P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **The Plant Journal** , v. 23, p. 11-28, 2000.

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento e aperfeiçoamento da embriogênese somática e regeneração de plantas de palma de óleo (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) em sistema bifásico

RESUMO

A embriogênese somática em palma de óleo tem grande impacto na multiplicação de plantas de qualidade e o uso de meio líquido pode potencializar os resultados. O objetivo do trabalho foi desenvolver e aperfeiçoar a embriogênese somática e a regeneração de plantas de um híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* x *E. guineensis* (B351733) em sistema bifásico, pela combinação de meio semissólido e líquido em diferentes etapas do processo. Para tanto, visando compreender o potencial de estabelecimento e a multiplicação de calos embriogênicos, foram realizados experimentos seccionando e dissociando 300 mg calos embriogênicos depositando-os em meio líquido, composto por MS+30 g.L⁻¹ sacarose+0,5 g.L⁻¹ de glutamina+1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, na qual foi aferido ao longo de 90 dias o volume celular sedimentado (VCS) e realizada a curva de crescimento. Posteriormente, foi realizado um experimento para determinar o tratamento mais eficaz para a diferenciação e maturação dos embriões somáticos, no qual foi contabilizado a porcentagem de oxidação, a formação de embriões somáticos, a germinação e aclimatização das plantas clonadas. Na etapa de estabelecimento inicial de calos em meio líquido, bem como multiplicação, observou-se resultados satisfatório, tanto do método seccionado com 4 mL de VCS, quanto no método dissociado com 6 mL de VCS. Em relação a fase de diferenciação, o tratamento com ½MS + 20 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado + 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel®, apresentou maior taxa de oxidação (48%), no entanto não diferiu dos demais tratamento quanto à porcentagem de formação de embriões somáticos (46%), sendo também o tratamento com maior taxa de germinação e plantas formadas. O trabalho permitiu desenvolver uma metodologia robusta para otimizar a embriogênese somática em palma de óleo, com o uso de meio líquido proporcionando elevadas taxas de crescimento de agregados celulares embriogênicos, diferenciação de embriões somáticos e regeneração de plantas clonais. Com os resultados obtidos, conclui-se que o protocolo apresenta grande potencial de uso para produção em larga escala da espécie.

Palavras-chave: Arecaceae; meio líquido; embriões somáticos;

ABSTRACT

Somatic embryogenesis in oil palm has a great impact on the multiplication of quality plants, and the use of liquid medium can enhance the results. The objective of this work was to develop and improve somatic embryogenesis and plant regeneration of an interspecific hybrid of *Elaeis oleifera* x *E. guineensis* (B351733) in a biphasic system by combining semi-solid and liquid medium at different stages of the process. To understand the potential for the establishment and multiplication of embryogenic calli, experiments were performed by sectioning and dissociating 300 mg embryogenic calli and depositing them in liquid medium composed of MS+30 g.L⁻¹ sucrose+0.5 g.L⁻¹ glutamine+1.0 mg.L⁻¹ 2,4-D. The sedimented cell volume (SCV) was measured over 90 days, and a growth curve was plotted. Subsequently, an experiment was conducted to determine the most effective treatment for the differentiation and maturation of somatic embryos, in which the percentage of oxidation, formation of somatic embryos, germination, and acclimatization of cloned plants were recorded. Satisfactory results were observed in the initial establishment and multiplication stage of calli in liquid medium, using either the sectioned method with 4 mL of SCV or the dissociated method with 6 mL of SCV. Regarding the differentiation phase, the treatment with ½MS+20 g.L⁻¹ sucrose+0.50 g.L⁻¹ glutamine+1.5 g.L⁻¹ activated charcoal+2.3 g.L⁻¹ Phytigel[®] had the highest oxidation rate (48%), but did not differ from other treatments in terms of the percentage of somatic embryo formation (46%), and also had the highest germination and plant formation rate. The study allowed the development of a robust methodology to optimize somatic embryogenesis in oil palm, using liquid medium to provide high rates of growth of embryogenic cell aggregates, somatic embryo differentiation, and clonal plant regeneration. Based on the results obtained, it can be concluded that the protocol has great potential for large-scale production of this species.

Keywords: Arecaceae; liquid medium; somatic embryos;

1. INTRODUÇÃO

A produção de palma de óleo, popularmente conhecido como dendezeiro ou óleo de palma africano (BABU; MATHUR, 2022), é de grande importância econômica para vários países em desenvolvimento da África e da Ásia (BORGES et al., 2016). A palma de óleo é uma das principais fontes de óleo vegetal do mundo e é usada na fabricação de alimentos, produtos de higiene pessoal, cosméticos e biocombustíveis. Além disso, a produção de palma de óleo emprega milhões de pessoas em todo o mundo e é uma importante fonte de renda para os agricultores (AGROPALMA, 2015; YOKOYAMA, 2015; VIJAY et al., 2016).

Além do *Elaeis guineensis*, *E. oleifera*, popularmente conhecida, como óleo de palma americano (BABU; MATHUR, 2022) ou caiaué (MOZZON et al., 2018), destaca-se nesse cenário, sobretudo, por apresentar características economicamente importantes para programas de melhoramento genético, como baixa crescimento em altura, o que reduz os custos operacionais (BARCELOS et al., 2015; MONTÚFAR et al., 2018; MOZZON et al., 2018) e maior resistência ao Amarelecimento Letal ou *bud rot* (LUIS et al., 2010; BARCELOS et al., 2015). Nesse sentido, programas de melhoramento têm direcionado esforços para a obtenção de híbridos interespecíficos (*E. oleifera* x *E. guineensis*).

De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção mundial de óleo de palma atingiu cerca de 77 milhões de toneladas em 2020, com a Indonésia e a Malásia como os principais produtores. A produção de palma de óleo também tem crescido em outros países, como a Nigéria, a Tailândia e a Colômbia (MEDINA et al., 2019; RIVAL; LEVANG, 2014; Sayer et al., 2012), totalizando mais de 30 países produtores (BABU; MATHUR, 2022). Segundo esses últimos autores, com o aumento da área plantada de óleo de palma em diversos ambientes, é essencial o desenvolvimento de variedades de dendê com alto rendimento, crescimento vertical lento, alta taxa de extração de óleo e tolerância a regimes de baixa disponibilidade hídrica.

Nesse contexto, técnicas de propagação clonal *in vitro*, especialmente, a embriogênese somática, desempenha papel fundamental como ferramenta no desenvolvimento de variedades clonais com características de interesse, além de subsidiar a aplicação de outras técnicas, como a transformação genética e a edição gênica. Segundo MARDAN et al. (2018), a embriogênese somática tem sido utilizada na produção de mudas de *Elaeis guineensis* para fins comerciais desde a década de 1990, e sua eficácia

tem sido comprovada em várias pesquisas. Recentemente, Iserhienrhien et al. (2022), por exemplo, relataram um protocolo eficiente para a produção de embriões somáticos, de cerca de $86,7 \pm 17,6$ embriões somáticos de palma de óleo produzidos por calos. Esses autores descreveram o uso de diferentes tipos de explantes, concentrações de reguladores de crescimento e períodos de cultura para produzir embriões somáticos e regenerar plantas completas.

Vários outros estudos têm sido realizados para desenvolver protocolos eficazes para a produção de embriões somáticos a partir de agregados celulares cultivados em meio líquido e células em suspensão de palma de óleo. Por exemplo, Abdullah et al. (2015) descreveram um protocolo para a produção de células em suspensão de palma de óleo utilizando explantes de folhas jovens e reguladores de crescimento. Khairuddin et al. (2021) relataram a produção de embriões somáticos e a regeneração de plantas de palma de óleo a partir de células em suspensão, sugerindo que o uso de meio líquido proporciona vantagens para a micropropagação, como redução de custos de produção de mudas e automação, além de fornecer condições de cultivo mais uniformes, facilitar a substituição do meio e possibilitar a utilização de recipientes de cultivo maiores comparativamente ao cultivo em meio sólida (ETIENNE; BERTHOULY 2002; MARBUN et al., 2015; COSTA et al., 2021).

Esses estudos demonstram a importância da embriogênese somática e do cultivo de células ou agregados em suspensão para a produção de mudas de palma de óleo em larga escala. No entanto, ainda há muito a ser pesquisado e aprimorado em relação a essas técnicas para melhorar a eficiência e a produtividade da produção de mudas de palma de óleo. Diante disso, o objetivo do trabalho foi desenvolver a embriogênese somática e a regeneração de plantas de um híbrido interespecífico de *Elaeis oleifera* x *E. guineensis* (B351733) em sistema bifásico e utilização de meios de consistência líquida em diferentes etapas do processo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo de explantes e indução de calos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

Para a indução da embriogênese somática foram utilizadas como explantes, folhas imaturas aclorofiladas e ainda não expandidas (palmito), oriundas de palmitos coletados de plantas adultas do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*).

Inicialmente, os palmitos coletados em campo foram submetidos ao processo de assepsia em laboratório, onde folhas mais externas foram retiradas em fluxo laminar com auxílio de bisturi. Em seguida, o material foi submerso em solução de álcool (70%) por 3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) (solução comercial) por 20 minutos e três lavagens em água destilada e autoclavada.

Posteriormente, os explantes foliares do palmito foram retirados com auxílio de pinças e bisturis para inoculação em meio de cultura de indução de calos, formulado com sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®), conforme Balzon et al. (2013).

Seis segmentos de folhas de aproximadamente 1 cm², provenientes das regiões apical e basal dos palmitos, foram inoculados com a face adaxial em contato com o meio de cultura, em placas de Petri contendo 25 mL de meio de indução de calos. Todos os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C e, durante a obtenção de calos, acondicionados no escuro (BALZON et al., 2013).

Nessas condições de cultivo, os explantes foram mantidos por três subcultivos de 60 dias cada para a obtenção de calos primários e mais um subcultivo de 90 dias para a obtenção de calos embriogênicos.

2.2 Estabelecimento e multiplicação de agregados e células em suspensão

2.2.1 Estabelecimento inicial de calos embriogênicos em meio líquido

Inicialmente, visando compreender o potencial de estabelecimento de calos embriogênicos (calos globulares, com consistência friável e coloração variando entre amarelo e bege – Fig. 2A-F) e calos primários (sem formato definido ou alongados, com consistência hidratada e coloração bege – Fig. 2G-L) de *Elaeis guineensis* x *E. oleifera* em meio líquido, foram inoculados meio composto pelos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g.L⁻¹ sacarose, 0,5 g L⁻¹ de glutamina e 4,5 µM de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (MONTEIRO et al., 2018). O meio foi depositado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL de capacidade (Fig. 2D-F, J-L), com volume utilizado de 30 mL de meio de cultura e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da esterilização em

autoclave à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos, conforme Monteiro et al. (2018). Foram realizados subcultivos mensais e, aos 60 dias, avaliou-se o estabelecimento em meio líquido.

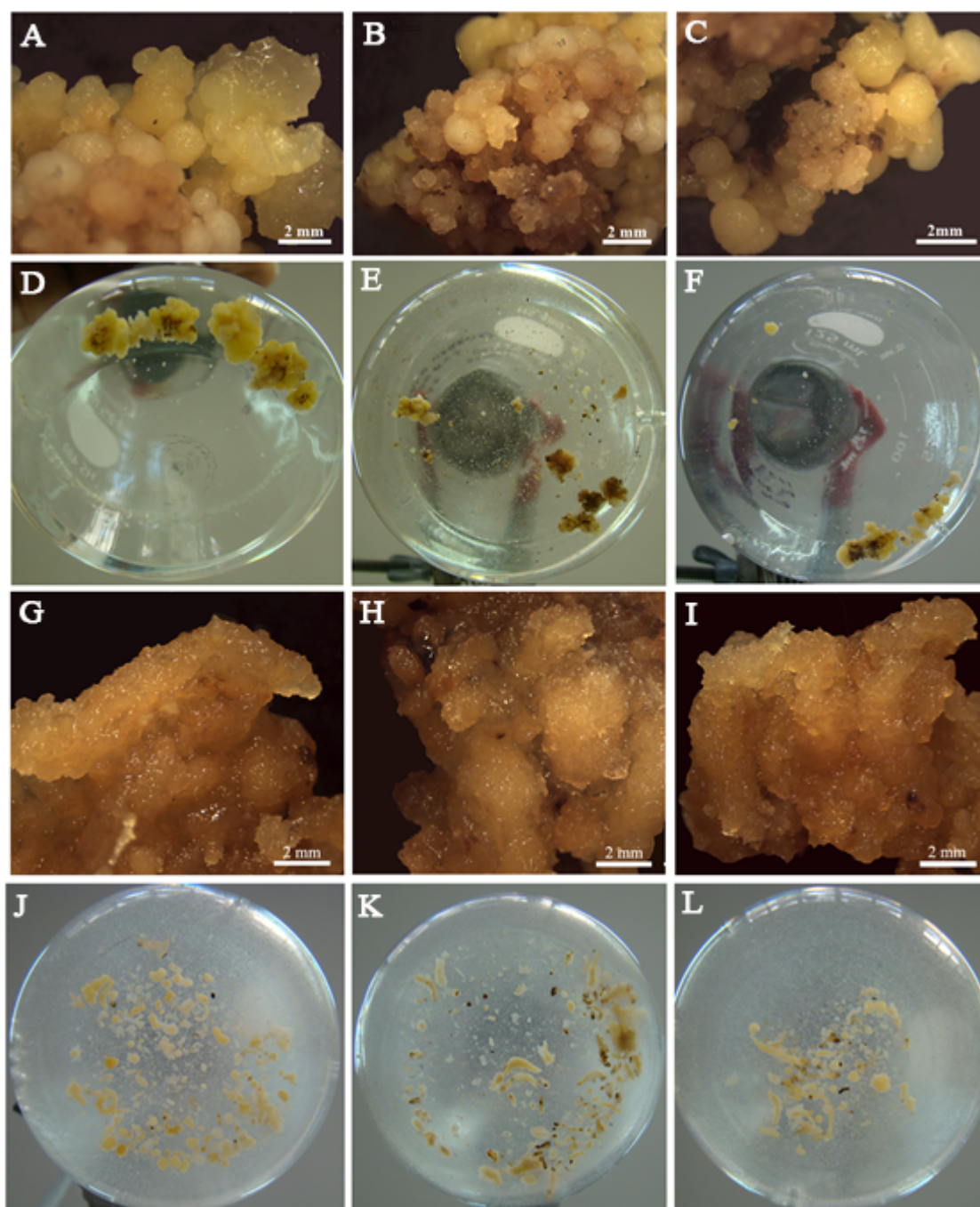


Figura 2. Caracterização morfológica dos calos embriogênicos (calos globulares, com consistência friável e coloração variando entre amarelo e bege – Fig. 2A-F) e calos primários (sem formato definido ou alongados, com consistência hidratada e coloração bege – Fig. 2G-L) do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis guineensis* x *E. oleífera*) oriundos de explantes foliares em meio líquido sob agitação.

Adicionalmente, amostras de agregados celulares oriundas do meio líquido foram submetidas às análises anatômicas para verificação do seu potencial embriogênico. As etapas de fixação, desidratação e emblocamento do material vegetal coletado foram realizadas de acordo com Silva-Cardoso et al. (2020). Secções longitudinais e transversais (3-7 μm) foram obtidas em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT) e foram distendidas e aderidas às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. Posteriormente, foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural (O'BRIEN; FEDER; MCCYLLY, 1964). A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

2.2.2 Efeito do seccionamento e dissociação de calos no estabelecimento e multiplicação de agregados celulares e células em suspensão

Os calos embriogênicos oriundos dos tecidos foliares foram transferidos para o meio de cultura de consistência líquida, conforme acima mencionado, depositados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL de capacidade e com volume utilizado de 30 mL de meio de cultura (Fig. 3A-C), para o estabelecimento e multiplicação de agregados celulares. Foram realizados dois tratamentos para a análise do crescimento dos agregados celulares e células em suspensão. No tratamento um (T1) foram adicionados 300 mg de massa de calos embriogênicos seccionados, já no tratamento dois (T2), foram adicionados a mesma quantidade de massa de calos embriogênicos, mas nesse tratamento os calos foram apenas dissociados. Ao longo de 90 dias, foram analisados o crescimento dos agregados celulares e células em suspensão, por meio do método do volume celular sedimentado (BLOM et al., 1992), com aferição do crescimento a cada 15 dias (Fig. 3B).

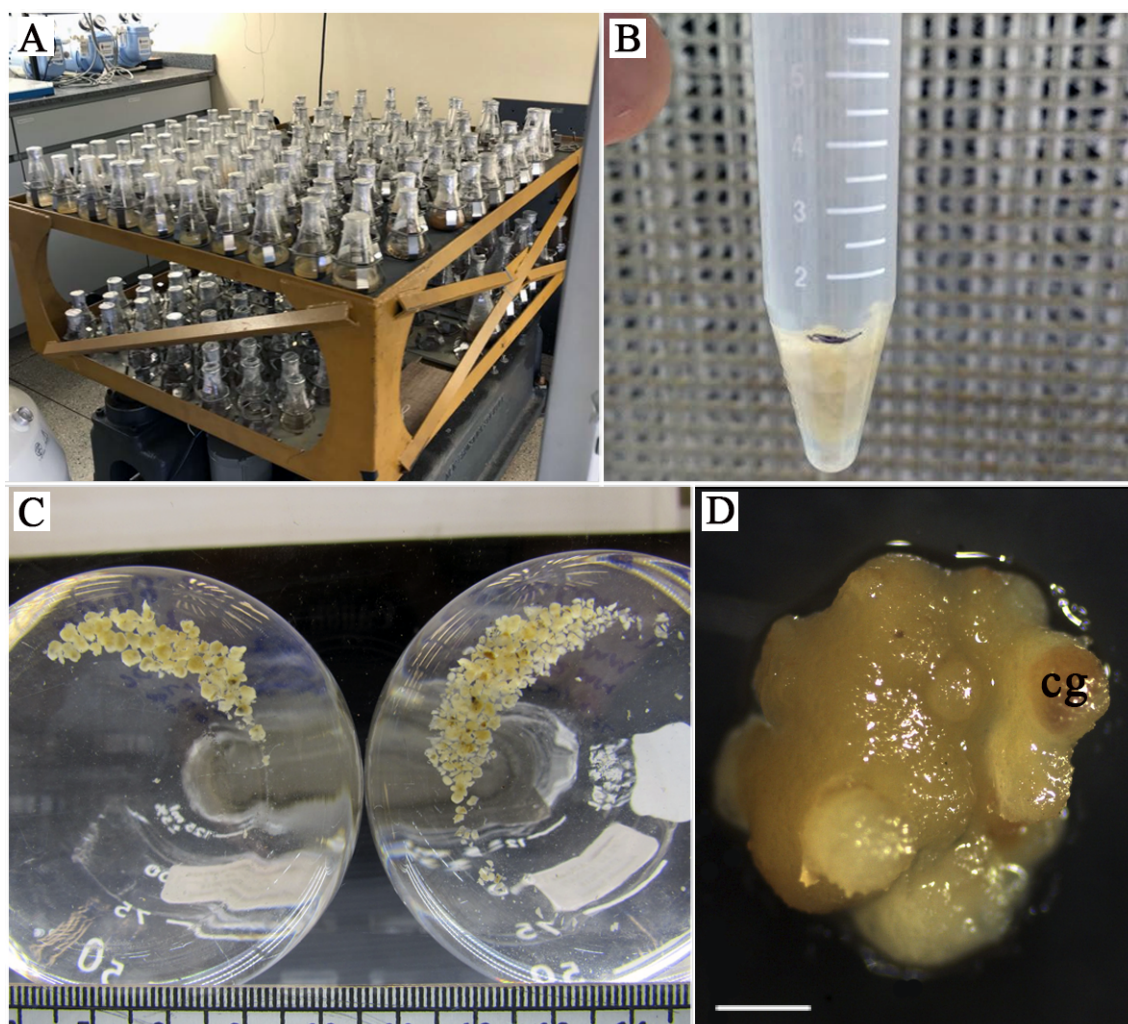


Figura 3. Aspectos gerais sobre o estabelecimento dos agregados celulares do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) em meio líquido. A. Calos oriundos de explantes foliares em meio líquido sob agitação. B-C. Agregados celulares em meio líquido em Erlenmeyer e em tubo *Falcon* (após sedimentação). D. Aspecto morfológico de calo oriundo do meio líquido. Abreviação: cg, calo globular. Barra: D = 1 mm.

Quanto às condições de cultivo, os experimentos foram acondicionados em agitadores orbitais a 100 rpm, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas tubulares tipo Led (Philips, mod. 920008431). Os meios de cultura foram renovados a cada 30 dias. Para tal, após a decantação dos agregados celulares e das células em suspensão, retiravam-se 15 mL do meio antigo, e, em seguida, adicionavam-se mais 15 mL de meio novo. Adicionalmente, a cada 15 dias, o Volume Celular Sedimentado (VCS) foi calculado conforme Queiroz et al. (2021).

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento representado por três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste *T-student* por meio do software estatístico *R*.

2.3 Diferenciação e maturação dos embriões somáticos

Os agregados celulares obtidos durante a etapa de multiplicação em fase líquida, após 90 dias foram transferidos para placas de Petri (15 x 90 mm), as quais continham 25 mL de meio de diferenciação e maturação dos embriões somáticos.

Para essa fase, foram realizados três tratamentos visando a diferenciação de embriões somáticos, com diferentes composições: $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) + 20 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado + 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®) (Tratamento 1); MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 12,3 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) + 0,54 µM de ácido naftalenoacético (ANA) + 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®) (Tratamento 2); MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 1000 µM de Putrescina + 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®) (Tratamento 3). O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da esterilização, realizada em autoclave à 121 °C durante 20 minutos, à 1,5 atm de pressão. Cada tratamento continha 10 placas e cada placa era composta por 6 agregados celulares provenientes da fase líquida de multiplicação, com subcultivos realizados a cada 30 dias.

Nesta etapa, o material foi mantido em sala de crescimento nas mesmas condições de temperatura e luminosidade descritas anteriormente, e, após 90 dias de cultivo, foram avaliadas a porcentagem de oxidação e a porcentagem de formação de embriões somáticos (embriões globulares e torpedos de diferentes tamanhos).

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento representado por 10 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* a nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), por meio do software estatístico *R*.

2.4 Germinação dos embriões somáticos

A germinação dos embriões somáticos foi realizada após 150 dias, a partir da transferência dos embriões somáticos em estágio de desenvolvimento similar ao torpedo, dispostos de forma agregada, como *clusters* com vários embriões somáticos unidos (Fig.

9A), ou isolados (Fig. 9B), provenientes da fase de diferenciação, em meio de germinação semissólido composto por sais e vitaminas de $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 0,1 g.L⁻¹ de arginina + 0,1 g.L⁻¹ de asparagina + 0,1 g.L⁻¹ de cisteína + 0,1 g.L⁻¹ de glutamina + 1 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada + 14,50 µM ácido indolbutírico (AIB) + 0,29 µM ácido giberélico (AG₃) + 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado + 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®) e pH ajustado para 5,7 + 0,1 esterilizado por autoclavagem à 121 °C durante 20 minutos, à 1,5 atm de pressão.

O material foi cultivado em tubos de ensaio, com aproximadamente 10 mL de meio de cultura por tubo de ensaio, seladas com filme PVC transparente, identificando a origem inicial de formação dos embriões e *clusters*. Nesse estágio, os explantes foram cultivados por três subcultivos de 30 dias cada, para a obtenção de plantas. Após esse período, avaliaram-se o número de plantas completas (raiz e parte aérea), plantas que formaram somente a parte aérea, plantas somente com raiz e número de embriões somáticos em estágio de desenvolvimento similar ao torpedo.

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento representado por 10 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* a nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), por meio do software estatístico *R*.

2.5 Aclimatização das plantas clonadas

Após a etapa de germinação dos embriões somáticos *in vitro*, as plantas clonadas tiveram suas raízes lavadas em água corrente para eliminação do excesso de meio nutritivo. Em seguida, as mudas foram cultivadas em copos descartáveis de 300 mL de capacidade, preenchidos com uma mistura de Bioplant® e areia na proporção 3:1 (v/v). Após o plantio, as mudas foram pré-aclimatizadas em câmaras tipo BOD (Percival, modelo I-30NL) com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 12 horas e radiação luminosa de 20 µmol.m⁻².s⁻¹. Durante as duas primeiras semanas desse processo, os propágulos foram mantidos cobertos por sacos de polietileno transparente, com pequenos furos na parte superior para realização de trocas gasosas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento e multiplicação de agregados e células em suspensão

3.1.1 Estabelecimento inicial de calos em meio líquido

Após 60 dias em meio líquido, verificou-se que os Erlenmeyers com calos primários apresentaram multiplicação dos calos e formação de suspensões celulares, o que não foi constatado nos Erlenmeyers com calos embriogênicos. Apesar do insucesso em termos de multiplicação, os calos embriogênicos mantiveram suas características embriogênicas, conforme as análises anatômicas descritas a seguir (Fig. 4). Visando a multiplicação das massas embriogênicas, elas foram submetidas a um processo de dissociação e seccionamento (ver tópico 3.1.2).

De acordo com as análises das secções anatômicas, os calos embriogênicos cultivados em meio líquido (Fig. 4A) apresentavam uma predominância de características meristemáticas, tais como formato predominantemente isodiamétrico, alta relação núcleo/citoplasma, citoplasma denso, núcleos volumosos, nucléolos proeminentes (variando entre um e dois), domínios de heterocromatina nas bordas do envelope nuclear, vacúolos pequenos e ausência de espaços intercelulares (Fig. 4B-D).

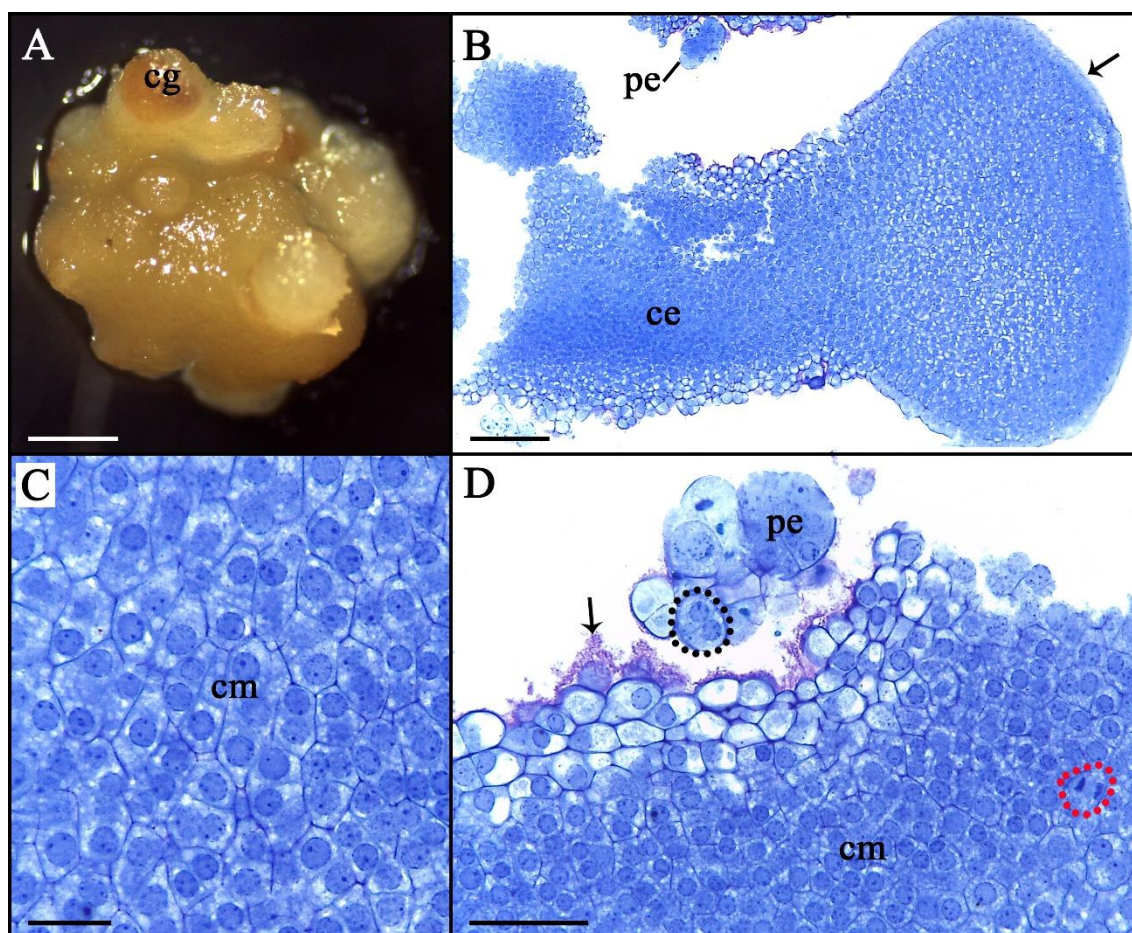


Figura 4. Caracterização morfoanatômica de calos embriogênicos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) oriundos do meio líquido. A. Calo embriogênico globular. B. Secção anatômica de calo embriogênico oriundo do meio líquido; notar indício de protoderme (seta – possível embrião somático globular) e proembriões. C. Detalhe do calo embriogênico da letra B com células meristemáticas. D. Detalhe da letra B com proembriões periféricos (pontilhado preto) e células meristemáticas localizadas internamente (pontilhado vermelho – célula em anáfase); notar mucilagem arroxçada (seta). Abreviações: ce, calo embriogênico; cg, calo globular; cm, células meristemáticas; pe, proembrião. Barras: A, B = 1 mm; C = 0,025 mm e D = 0,5 mm.

Verificou-se também células com paredes mais espessas nas regiões periféricas dos calos, das quais proembriões foram formados (Fig. 4B, D). Constatou-se, na região de descamação dessas células embriogênicas periféricas, a presença de material de natureza péctica (mucilagem arroxçada) (Fig. 4D), o que tem sido associado a modificações da lamela média e parede primária celular e considerado um reservatório de água e moléculas sinalizantes, em diferentes sistemas de regeneração *in vitro*, (POPIELARSKA-KONIECZNA et al., 2015).

Tais características confirmam, segundo Silva-Cardoso et al. (2020), a manutenção do potencial embriogênico dos calos estabelecidos no meio líquido. Características similares observadas em calos de outras espécies de palmeiras, como *Acrocomia aculeata* (MEIRA et al., 2020) e *Euterpe precatoria* (FERREIRA et al., 2022), têm sido comumente associadas com competência embriogênica.

O corte anatômico exibido na Fig. 4B além de evidenciar áreas meristemáticas/embriogênicas, evidencia a presença de uma protoderme incipiente envolvendo a massa calogênica globular, ou seja, as condições testadas conservaram o potencial embriogênicos dos calos, além de proporcionar a diferenciação de embriões somáticos no estágio globular.

3.1.2 Efeito do seccionamento e dissociação de calos no estabelecimento e multiplicação de agregados celulares e células em suspensão

O estabelecimento e multiplicação de agregados celulares e células em suspensão foram conduzidos com sucesso. Os explantes sobreviveram à mudança da consistência do meio de cultivo e da concentração regulador de crescimento (Fig. 4). Em ambos os tratamentos, os calos pré-selecionados possuíam características embriogênicas, como coloração amarelada e friabilidade. No tratamento 1, os calos foram seccionados (picotados), para expor a maior quantidade de células embriogênicas ao meio de cultura de consistência líquida (Fig. 5A), já no tratamento 2, os calos foram apenas dissociados, por conta de sua alta friabilidade (Fig. 5C).

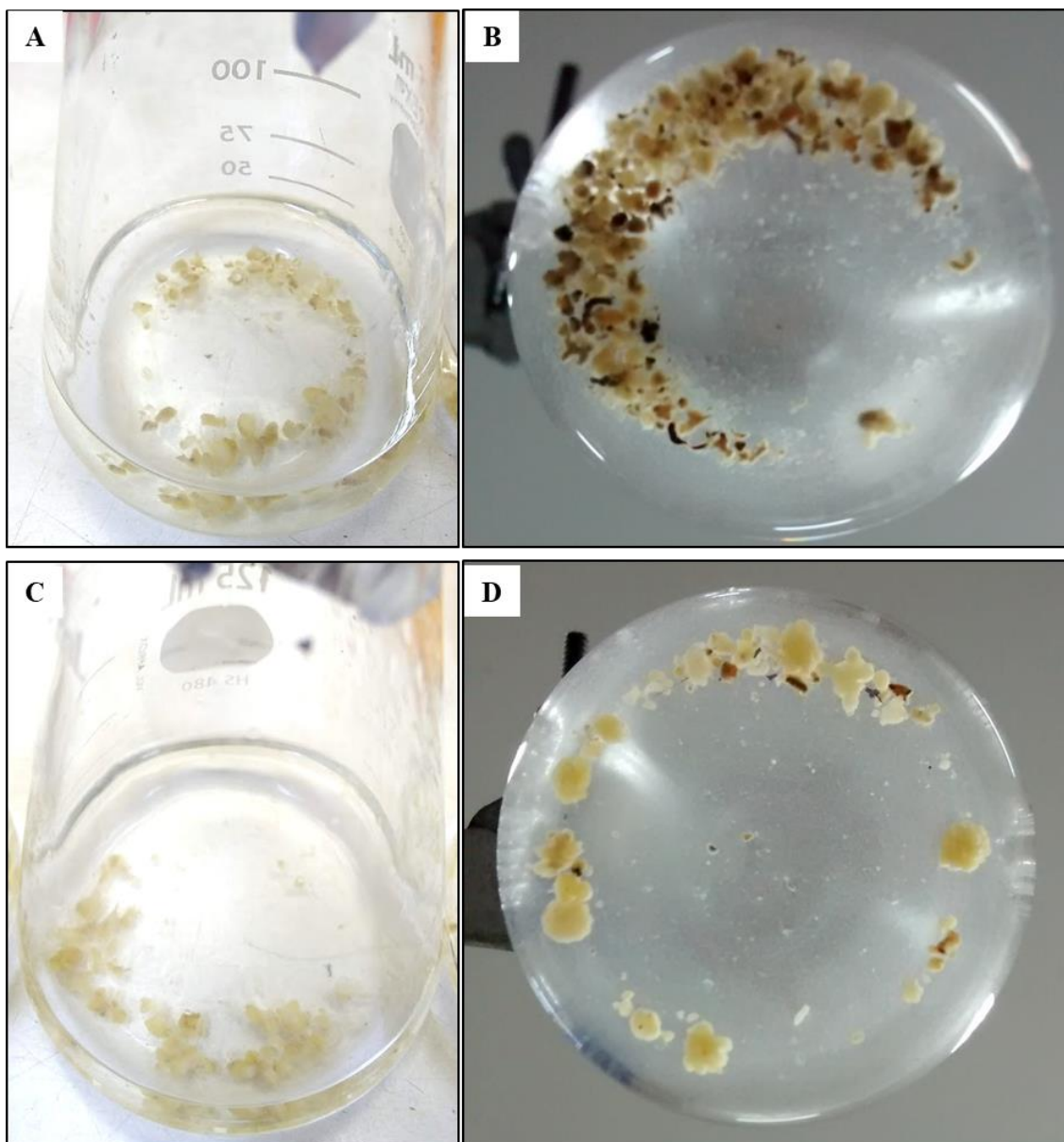


Figura 5. Características morfológicas dos calos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) em diferentes tratamentos para estabelecimento e multiplicação em meio líquido. A. Calos seccionados/picotados, tratamento 1. B. Agregados celulares e células em suspensão após 90 dias em meio líquido, oriundos de explantes seccionados. C. Calos dissociados, tratamento 2. D. Agregados celulares e células em suspensão após 90 dias em meio líquido, oriundos de explantes dissociados.

Salienta-se, todavia, que não foi possível observar diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, já que as células e os agregados celulares oriundos tanto dos calos seccionados/picotados (tratamento 1) quanto dos dissociados (tratamento 2) apresentaram o mesmo padrão de crescimento ao longo das medições (Fig. 6). No tratamento 1, observou-se uma leve oxidação (análise visual), que não comprometeu o

potencial embriogênico dos materiais multiplicados. Os agregados celulares provenientes desse tratamento exibiam coloração amarelada e friabilidade, mantendo as características embriogênicas (Fig. 4B). Em contrapartida, o tratamento 2 gerou agregados celulares mais volumosos, sem sinais de oxidação, com as mesmas características morfológicas iniciais, antes do estabelecimento (Fig. 5D). A separação física realizada provavelmente modificou as interações bioquímicas e fisiológicas intercelulares, tendo como consequências o isolamento celular e a produção de moléculas essenciais ao crescimento (OTHMANI et al., 2009). De acordo com Bettencourt *et al.* (2016), explantes com menores dimensões apresentam menor comunicação intercelular, o que facilita a entrada das células no ciclo mitótico.

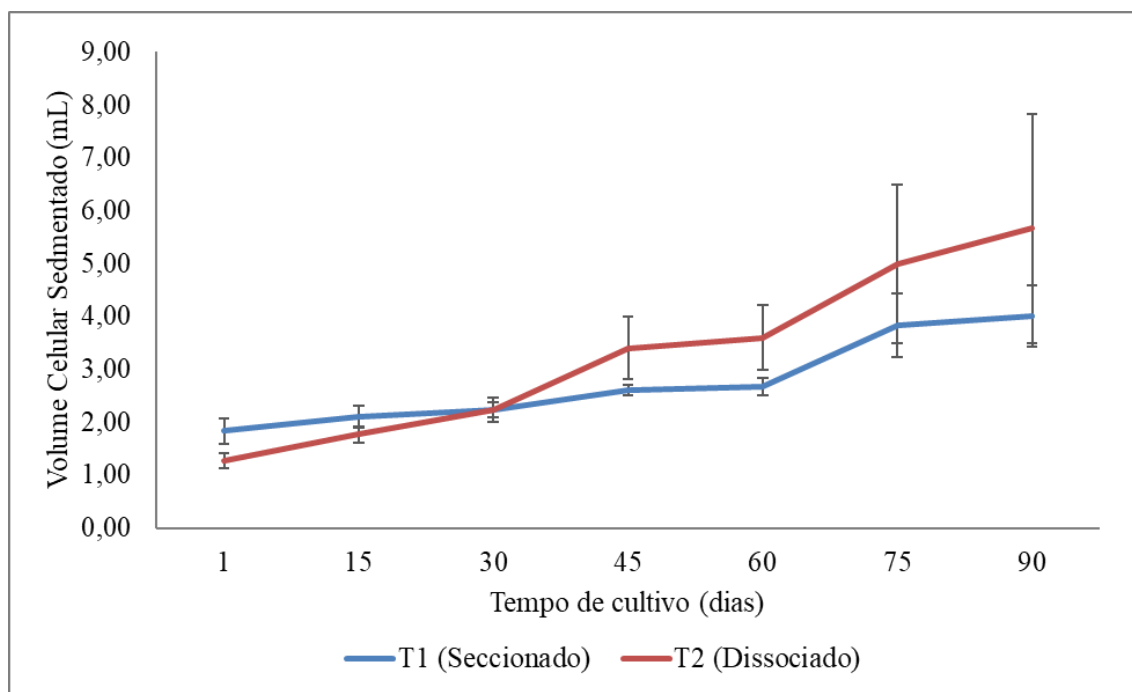


Figura 6. Análise do crescimento celular, no cultivo em meio líquido dos agregados e células em suspensão do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*), pelo método do volume celular sedimentado (VCS) até 90 dias de cultivo em meio líquido. Barras representam o erro padrão.

A análise do Volume Celular Sedimentado (VCS) revelou que a dissociação dos calos, sem realização de seccionamento, proporcionou uma produção maior de massa celular, após 90 dias de cultivo em meio líquido (Fig. 6). O seccionamento forçado embora não tenha comprometido o potencial embriogênico dos explantes, comprometeu o crescimento celular, provavelmente devido ao efeito negativo das injúrias consequentes

dos cortes. Como reportado anteriormente, visualizou-se o escurecimento de alguns explantes oriundos do tratamento 1 (seccionados) (Fig. 5B).

É sabido que a realização de cortes nos explantes provoca a liberação e exposição de compostos fenólicos endógenos ao ar e às diferentes enzimas que participam do processo oxidativo (LAUKKANEN et al., 1999), o que pode ocasionar no escurecimento dos explantes e do meio de cultivo (JONES; SAXENA, 2013; ABDALLA et al. 2022) e inibir o crescimento celular (NAZ et al., 2008).

3.2 Diferenciação e maturação dos embriões somáticos

Aos 90 dias, constatou-se também que o tratamento 1 do experimento de diferenciação ($\frac{1}{2}$ MS + 20 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado) apresentou cerca de 48% de oxidação, sendo a taxa mais alta entre os três tratamentos, já o tratamento 3 (MS + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 1000 µM Putrescina) foi o que apresentou a menor taxa de oxidação, apenas 5% de taxa de oxidação (Fig. 7A). Estatisticamente o tratamento 2 (MS + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 12,3 µM de 2iP + 0,54 µM de ANA) não diferiu dos demais tratamentos, com 35% de oxidação (Fig. 7B).

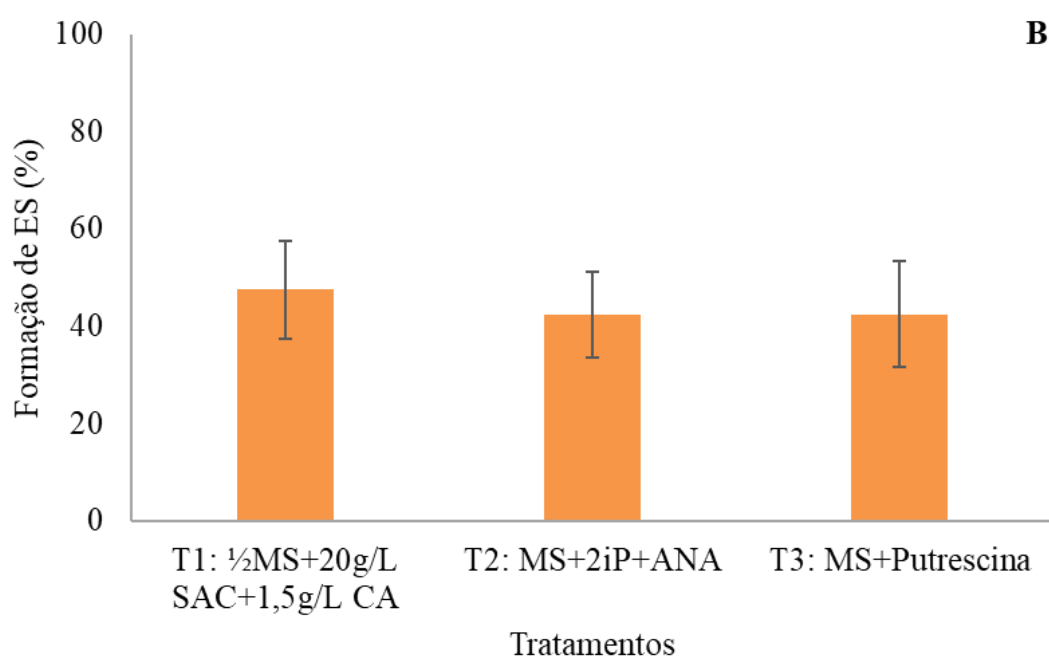
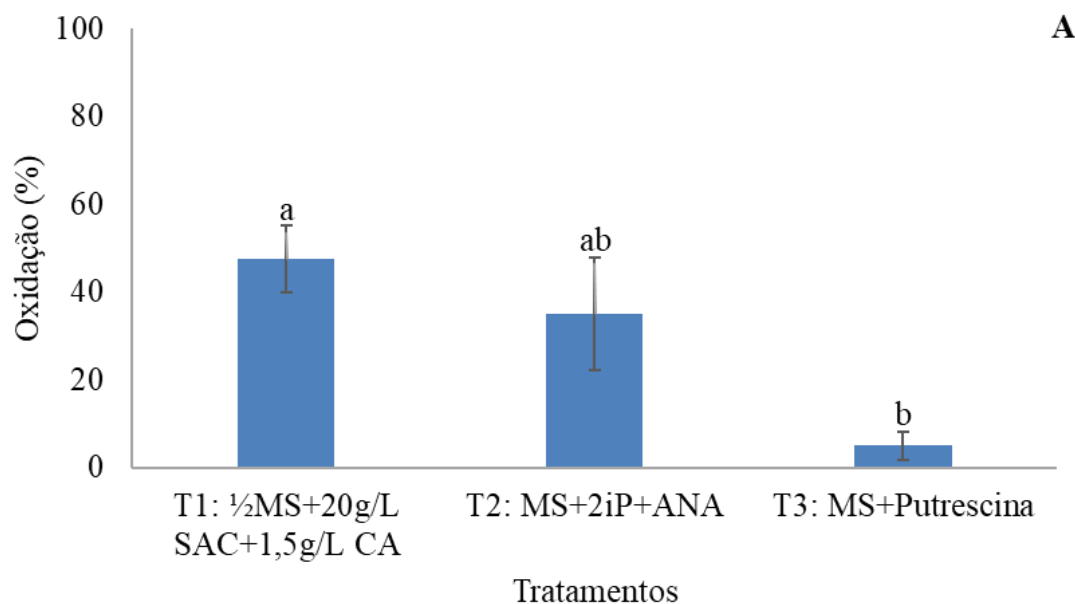


Figura 7. Porcentagem de oxidação (A) e porcentagem de formação de embriões somáticos (B) a partir de agregados celulares, oriundos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*), cultivados em diferentes meios de diferenciação de embriões somáticos. Barras representam o erro padrão.

Apesar da ocorrência de uma taxa razoável de oxidação (48%) observada em explantes cultivados sob efeito do tratamento 1, ela não comprometeu o processo de diferenciação de embriões somáticos, similar ao mencionado por Almeida et al. (2019a), em *E. oleifera* x *E. guineensis*, e Ferreira et al. (2022), em *E. precatoria*. Alguns autores,

inclusive, apontam um possível efeito positivo da oxidação de compostos fenólicos sobre as rotas de regeneração *in vitro* (RIBEIRO et al., 2019).

Quanto à formação de embriões somáticos, após os 90 dias em meio de diferenciação, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos testados, com valor médio de 46% de formação de embriões somáticos/calos embriogênico (Fig. 7B). Os calos que passaram pelo tratamento 1, com 30 dias apresentaram pequenas estruturas, semelhantes a embriões somáticos globulares e aos 90 dias foi observado embriões do tipo torpedo (Fig. 8B-C). Já os calos do tratamento 2, aos 30 dias apresentaram em sua maioria formações secundárias de calos embriogênicos globulares e aos 90 dias com indícios de embriões somáticos (Fig. 8D-E). No tratamento 3, com 30 dias o desenvolvimento dos calos foi visualmente mais lento, com massas embriogênicas com aspecto brilhoso, bastante hidratado, e apenas aos 90 dias que foi observado a formação de embriões globulares (Fig. 8F-G).

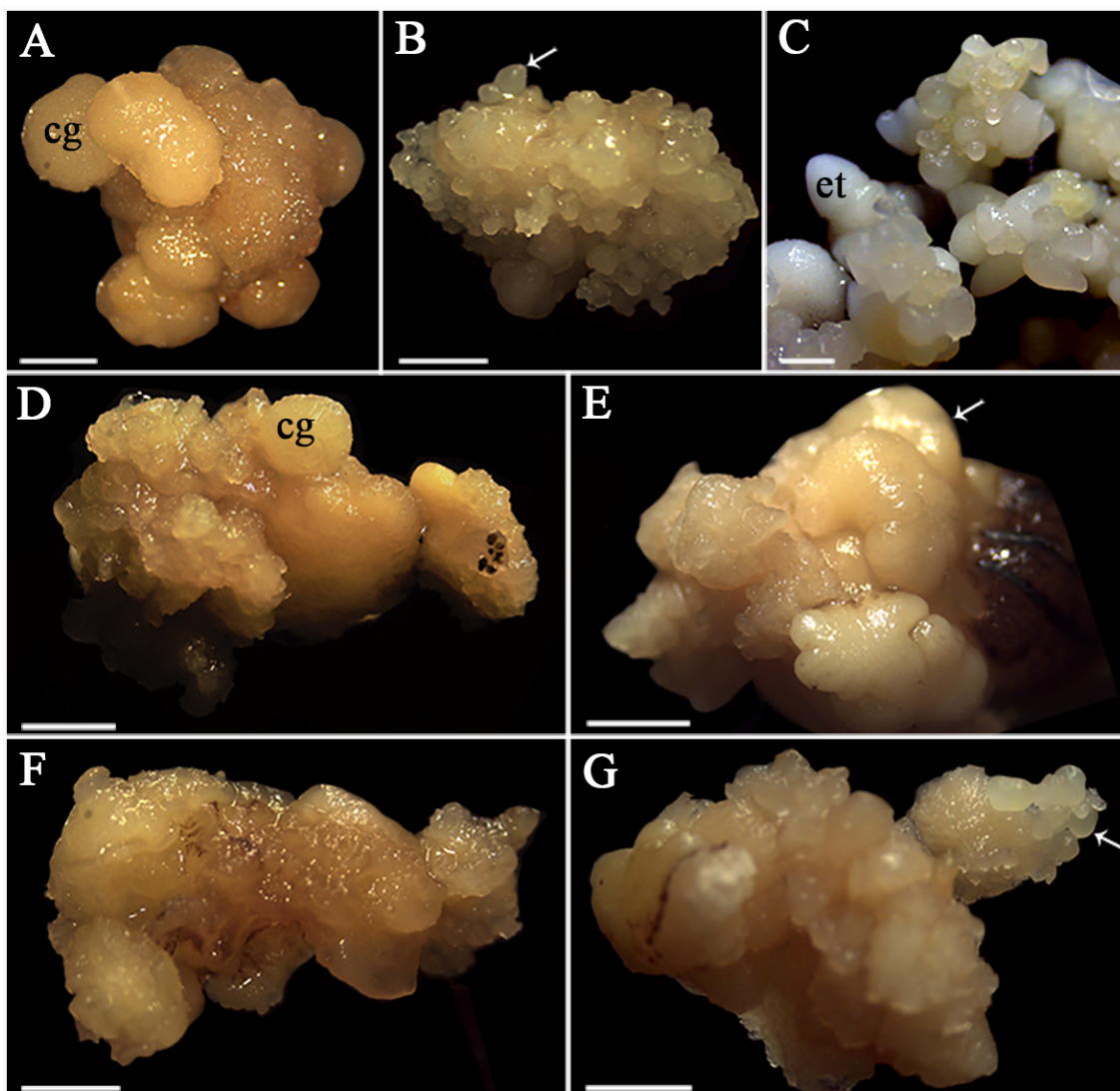


Figura 8. Diferenciação de embriões somáticos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) a partir de calos embriogênicos multiplicados em meio líquido. A. Calos globulares embriogênicos oriundos do meio líquido cultivados em meio de diferenciação. B. Calos embriogênicos com embriões somáticos (seta) após 30 dias em meio de diferenciação $\frac{1}{2}$ MS com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado. C. Embriões somáticos em estágio similar ao torpedo após 90 dias em meio de diferenciação mencionado na letra B. D. Calos embriogênicos após 30 dias em meio de diferenciação de $12,3 \mu\text{M}$ de 2-isopenteniladenina e $0,54 \mu\text{M}$ de ácido naftalenoacético. E. Calos embriogênicos após 90 dias em meio de diferenciação mencionado na letra D, com indícios de diferenciação de embriões somáticos (seta). F. Calos embriogênicos com embriões somáticos após 30 dias em meio de diferenciação $1000 \mu\text{M}$ Putrescina. G. Calos embriogênicos com embriões somáticos globulares (seta) após 90 dias em meio de diferenciação mencionado na letra F. Abreviações: cg, calo globular; et, embrião somático torpedo. Barras: A, B, D-G = 2 mm e C = 1 mm.

O uso de metade da força dos sais de MS, para o desenvolvimento de embriões somáticos, tem sido relatado para diferentes culturas, como *Manihot esculenta* (GROLL; GRAY, 2002) *Malaxis densiflora* (MAHENDRAN; NARMATHA, 2016) e *Elaeis guineensis* (PÁDUA et al., 2017), que obteve maior porcentagem de formação de embriões somáticos. Assim como, o uso de 2ip combinado com ANA tem sido recorrente na literatura para formação de embriões somáticos em dendezeiro (BALZON et al., 2013; GOMES et al., 2017; ALMEIDA et al., 2019), como também observado no presente trabalho.

O efeito positivo do uso de Putrescina nos processos embriogênicos também foi reportado em *Phoenix dactylifera* (RAJESH et al., 2003; HUSSEIN et al., 2021) e *E. guineensis* × *E. oleifera* (BONNETI et al., 2016). Enfatiza-se que os efeitos da aplicação exógena de poliaminas têm sido associados com a divisão celular, desenvolvimento de centros meristemáticos e proteção contra os estresses inerentes ao cultivo *in vitro* (CVIKROVÁ et al., 1998; PAUL et al., 2009; REIS et al., 2016). No entanto, o uso de Putrescina no tratamento 3, observou-se a formação de embriões fusionados e com a base do calo embriogênico oxidada, onde essa oxidação muitas vezes também foi observada sendo direcionada aos embriões torpedos fusionados, dando origem a embriões somáticos com menor qualidade e posteriormente sendo refletido na regeneração de plantas anormais.

3.3 Germinação dos embriões somáticos e aclimatização das plantas

Os embriões somáticos oriundos do tratamento de diferenciação 1 ($\frac{1}{2}$ MS + 20 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado) se destacaram com relação aos demais, com taxa de germinação de 22,02±3,06 %, a germinação foi observada já aos 45 dias de cultivo, sendo notado parte área, raiz e plantas completas, alguns até com a individualização das plantas. Já os embriões somáticos oriundos do tratamento 2 da diferenciação, apresentaram cerca de 13,86±4,86 % de germinação, seguido dos embriões somáticos procedentes do tratamento 3 com a porcentagem mais baixa entre eles, 6,46±3,69%. Além disso, nos embriões somáticos do tratamento 1 da diferenciação, aos 90 dias, foram contabilizadas em média três plantas completas e individualizadas nesse mesmo tratamento (Fig. 9), diferenciando-se estatisticamente dos demais, os quais não apresentaram a formação de planta completa (Tabela 1).

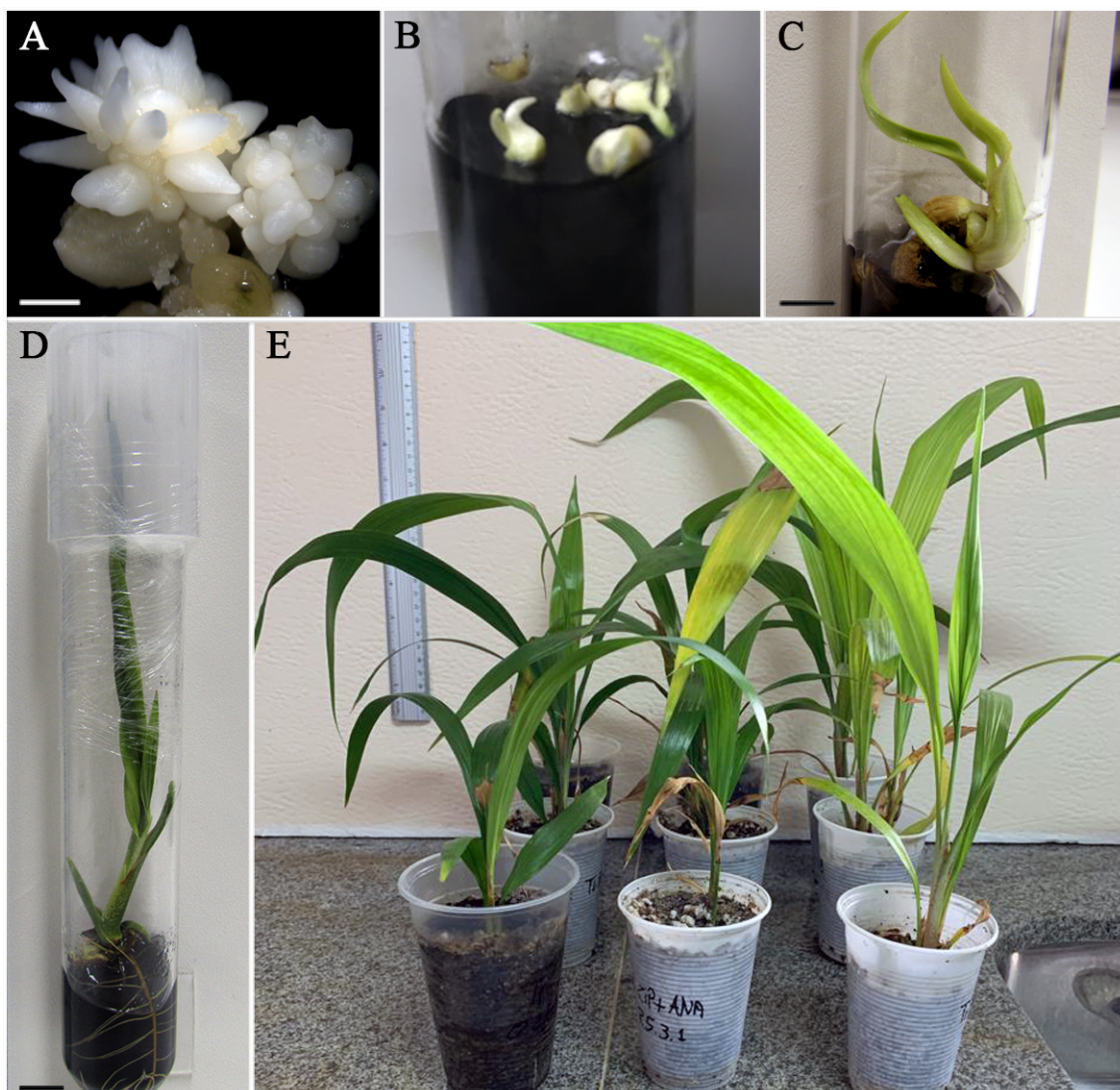


Figura 9. Germinação de embriões somáticos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) a partir de calos embriogênicos multiplicados em meio líquido. A. Cluster de embriões somáticos colocado em meio de germinação, após 150 dias em meio de diferenciação $\frac{1}{2}$ MS com 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. B. Embriões somáticos individualizados oriundos do tratamento de diferenciação $\frac{1}{2}$ MS com 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. C. Emissão de parte aérea. D. Planta completa, após 120 dias em meio de germinação. E. Plantas aclimatizadas. Barras: A = 2 mm; C, D = 1 mm.

No tratamento 1, durante o cultivo em meio de germinação, também foram observados em média 41 embriões somáticos com emissão somente da parte aérea, seguido do tratamento 2 (MS + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 12,3 μ M de 2iP + 0,54 μ M de ANA), com cerca de 11 embriões com desenvolvimento do eixo apical caulinar, e, por fim, o tratamento 3 (MS + 30 g.L⁻¹ de sacarose + 0,50 g.L⁻¹ de glutamina + 1000 μ M Putrescina), com apenas três embriões com emissão de parte aérea,

conforme Tabela 1. Já a emissão apenas do sistema radicular foi limitada a alguns embriões oriundos do tratamento 1 (Tabela 1).

Estudos realizados com embriões somáticos de diferentes espécies, como mangueira (*Mangifera indica* L) e gerânio-sul-africano (*Pelargonium sidoides* DC), demonstraram que o uso da meia força do MS resultou em maior número de plântulas germinadas e maior desenvolvimento das mesmas em comparação com o meio de cultura completo (SHEHATA, 2021; KUMAR; MOYO; VAN STADEN, 2015), como observado no trabalho, pois os embriões somáticos oriundos da diferenciação no tratamento 1, já estavam com o uso de meia força do MS. No entanto, é importante destacar que a utilização da meia força do MS pode variar de acordo com a espécie vegetal e as condições experimentais, sendo necessário ajustar a concentração dos nutrientes de acordo com as necessidades específicas das plântulas em estudo.

De acordo com Ree e Guerra (2015), a presença de raízes é de fundamental importância para o processo de conversão, dado o seu papel no suprimento hídrico e nutricional das plantas após a transição para condições *ex vitro*. Todavia, no gênero *Elaeis* autores diversos têm reportado dificuldade de obtenção de plantas completas a partir de embriões somáticos, como o observado neste trabalho. Nesse sentido, alguns têm optado pela adição de uma etapa de enraizamento com o uso de auxinas (JAYANTHI et al., 2015; GOMES et al., 2015).

Como a embriogênese somática é um processo assíncrono, foi contabilizado também a média do número de embriões somáticos por calo, formados durante o período de germinação, com destaque para o tratamento 1 que apresentou em média 29 embriões somáticos durante essa fase. Já os tratamentos 2 e 3 apresentaram em média 21 embriões e não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1).

Durante o processo de aclimatização de plantas clonadas de palma de óleo, constatou-se que tanto as plantas com formação completa (raiz e parte aérea) quanto aquelas que inicialmente desenvolveram somente a parte aérea e, posteriormente, formaram a raiz, sobreviveram ao período de aclimatização (Fig. 9E). A aclimatização é uma fase crucial na cultura de tecidos, pois é um dos principais fatores limitantes na micropropagação. Essa etapa envolve a transferência das plântulas do meio de cultivo *in vitro* para outro ambiente e substrato, permitindo que a planta se adapte gradualmente ao novo ambiente (GOMES et al., 2015; BRAVO FILHO et al., 2018).

A obtenção de mudas de qualidade por meio da cultura de tecidos é fortemente influenciada pela etapa de aclimatização. Os resultados obtidos sugerem que os calos

gerados em meio líquido podem originar embriões somáticos viáveis para regeneração de plantas.

Tabela 1. Número de plantas completas (raiz e parte aérea), parte aérea, raiz e número de embriões somáticos por calo do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) formados em meio de germinação, destacando a origem dos meios de diferenciação durante o período de germinação.

Germinação	Meio de origem	%Germinação	Número			
			ES/calor	Parte aérea	Plantas	Raiz
$\frac{1}{2}$ MS 30 g.L ⁻¹ Sacarose 0,1 g.L ⁻¹ de arginina 0,1 g.L ⁻¹ de asparagina 0,1 g.L ⁻¹ de cisteína 0,1 g.L ⁻¹ de glutamina 1 g.L ⁻¹ de caseína hidrolisada 14,50 µM (AIB) 0,29 µM AG ₃ 1,5 g.L ⁻¹ de carvão ativado 2,3 g.L ⁻¹ de Phytigel (Sigma®)	T1: $\frac{1}{2}$ MS 20 g.L ⁻¹ Sacarose 0,50 g.L ⁻¹ glutamina 1,5 g.L ⁻¹ carvão ativado 2,3 g.L ⁻¹ de Phytigel (Sigma®)	22,02±30,6 a	29,03±1,2 a	40,75±11,47 a	3,00±1,20 a	2,13±1,01 a
	T2: MS 30 g.L ⁻¹ Sacarose 0,50 g.L ⁻¹ glutamina 12,3 µM de 2iP 0,54 µM de ANA 2,3 g.L ⁻¹ de Phytigel (Sigma®)	13,86±4,86 b	21,4±1,39 b	11,13±3,86 b	0 b	0 b
	T3: MS 30 g.L ⁻¹ Sacarose 0,50 g.L ⁻¹ glutamina 1000 µM Putrescina 2,3 g.L ⁻¹ de Phytigel (Sigma®)	6,46±3,69 c	21±1,42 b	3,76±1,33 c	0 b	0 b

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

CONCLUSÃO

A dissociação de calos embriogênicos do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*), sem a necessidade de seccionamento, proporciona uma taxa superior de crescimento de agregados celulares embriogênicos e de células em suspensão em meio MS líquido suplementado com 4,5 μM de 2,4-D e, portanto, tem potencial de uso para produção em larga escala. Além disso, o tratamento para diferenciação dos embriões somáticos, com $\frac{1}{2}$ MS + 20 g.L^{-1} de sacarose + 0,50 g.L^{-1} de glutamina + 1,5 g.L^{-1} de carvão ativado + 2,3 g.L^{-1} de Phytigel, proporciona maior número de embriões somáticos (isolados ou *clusters*) e uma taxa superior de germinação. Com os resultados obtidos, conclui-se que o protocolo apresenta grande potencial de uso para produção em larga escala da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, N., EL-RAMADY, H., SELIEM, M. K., EL-MAHROUK, M. E., TAHA, N., BAYOUMI, Y.; DOBRÁNSZKI, J. An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 677, 2022.

ABDULLAH, N. A. P.; AZIZ, M. A. A.; AHMAD, N. H.; HARUN, A. R. Optimization of *Elaeis guineensis* (oil palm) suspension culture parameters for high-density cell culture system. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**, 2(2), 14-20. 2015.

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

ALMEIDA, U. O.; NETO, R. D. C. A.; LUNZ, A. M. P.; COSTA, D. A.; ARAUJO, J. M.; SILVA RODRIGUES, M. J. . Crescimento de açaizeiro (*Euterpe precatoria* Mart.) consorciado com bananeira. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 5, n. 3, 2018.

BABU, B. Kalyana; MATHUR, R. K. Role of “Omics” approaches in sustainable development and improvement of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). In: Omics in **Horticultural Crops**. Academic Press, 2022. p. 205-214.

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, 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, n. 190, p. 1-16, 2015.

BLOM, T. J. M., KREIS, W., VAN IREN, F., & LIBBENGA, K. R. A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 146-149, 1992.

BONETTI, K. A. P.; NESI, J.; QUISEN, R. C.; QUOIRIN, M. Somatic embryogenesis from zygotic embryos and thin cell layers (TCLs) of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* × *Elaeis oleifera*). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 37, p. 2028-2037, 2016.

BRAVO FILHO, E. S., SANTANA, M., SANTOS, P., & RIBEIRO, A.. Multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Melocactus sergipensis*. **Lilloa**, v. 55, n. 1, p. 1-10, 2018.

COSTA, B. N. S., RÚBIO NETO, A., CHAGAS, E. A., CHAGAS, P. C., PASQUAL, M., VENDRAME, W. A.. Influence of silicon and *in vitro* culture systems on the

micropropagation and acclimatization of “Dwarf Cavendish” banana. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 43, 2020.

CVIKROVÁ, M.; MALÁ, J.; JOSEF, E.; HRUBCOVZÁ, M.; VÁGNER, M. Absciscic acid, polyamines and phenolic acids in sessile oak somatic embryos in relation to their conversion potential. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 247-255, 1998.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 215-231, 2002.

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

FRANÇA BETTENCOURT, G. M., ZANELLA, L. B., QUOIRIN, M. G. G., & DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Efeito da fonte de carbono na embriogênese somática em *Bactris gasipaes*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 86, p. 179-183, 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 (PCTOC)**, v. 131, p. 269-282, 2017.

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, p. 111-117, 2015.

GROLL, J.; MYCOCK, D. J.; GRAY, V. M. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Annals of botany**, v. 89, n. 5, p. 645-648, 2002.

HUSSEIN, N.H.; JAWAD, H.A; SALEH, F.F. The effect of putrescine and spermidine on somatic embryogenesis and regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cv. Barhee. **Int. J. Agricult. Stat. Sci.** Vol. 17, No. 2, pp. 827-830, 2021.

ISERHIENRHIEN, A., IHASE, L., ODENORE, V., EKE, C., ASEMOTA, O., & VWIOKO, E. Somatic embryogenesis on calli derived from leaf and inflorescence tissues of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Agrikultura CRI journal** 3 (1). ISSN: 2782-8816. 2022.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; NANDIGANTI, M. M.; 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. 256, p. 1-7, 2015.

- JONES, A. M. P.; SAXENA, P. K. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.
- KHAIRUDDIN, N. L. A.; OTHMAN, R. Y.; TAN, C. C. High frequency of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension culture of *Elaeis guineensis* Jacq. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 144(2), 291-301. 2021.
- KUMAR, Vijay; MOYO, Mack; VAN STADEN, Johannes. Somatic embryogenesis of *Pelargonium sidoides* DC. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 121, p. 571-577, 2015.
- LAUKKANEN, H.; HÄGGMAN, H.; KONTUNEN-SOPPELA; HOHTOLA, A. Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 337-343, 1999.
- LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p. 209-215, 2010.
- MAHENDRAN, G.; BAI, V. Narmatha. Direct somatic embryogenesis of *Malaxis densiflora* (A. Rich.) Kuntze. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 77-81, 2016.
- MARBUN, C. L. M., TORUAN-MATHIUS, N., UTOMO, C., & LIWANG, T.. Micropropagation of embryogenic callus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using temporary immersion system. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 122-129, 2015.
- MEDINA, J. D. C., MAGALHÃES, A. I., ZAMORA, H. D., & MELO, J. D. Q.. Oil palm cultivation and production in South America: status and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 5, p. 1202-1210, 2019.
- MEIRA, F. S., LUIS, Z. G., CARDOSO, I., MARIÊ, A., & SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020.
- MONTEIRO, T. R., FREITAS, E. O., NOGUEIRA, G. F., & SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.. Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 196-203, 2018.
- MONTÚFAR, R.; LOUISE, C.; TRANBARGER, T. J. *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés: A neglected palm from the Ecuadorian Amazon. **Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas**, v. 39, n. 1, 2018.

MOZZON, M.; FOLIGNI, R.; TYLEWICZ, U. Chemical characteristics and nutritional properties of hybrid palm oils. In: WAISUNDARA, V. (Ed.). **Palm Oil**. IntechOpen, London, 149-170. 2018.

NAZ, S.; ALI, A.; IQBAL, J. Phenolic content in vitro cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 6, p. 2525-2539, 2008.

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

OTHMANI, A., BAYOUDH, C., DRIRA, N., MARRAKCHI, M., & TRIFI, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 97, p. 71-79, 2009.

PÁDUA, M. S., SANTOS, R. S., LABORY, C. R. G., STEIN, V. C., MENDONÇA, E. G., ALVES, E., & PAIVA, L. V.. Histodifferentiation of oil palm somatic embryo development at low auxin concentration. **Protoplasma**, v. 255, p. 285-295, 2018.

PAUL, A.; MITTER, K.; RAYCHAUDHURI, S. S. Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 303-311, 2009.

POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; ŚWIERCZYŃSKA, J.; GÓRALSKI, G.; ŚLESIAK, H.; BOHDANOWICZ, J. Are extracellular matrix surface network components involved in signalling and protective function? **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 9, p. 707-709, 2015.

QUEIROZ, F.F., de ARAÚJO SILVA-CARDOSO, I.M., SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Initiation and Establishment of Cell Suspension Cultures in Bamboo. **Biotechnological Advances in Bamboo: The “Green Gold” on the Earth**, p. 107-127, 2021.

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

REE, Joseph Francis; GUERRA, Miguel Pedro. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, p. 589-602, 2015.

REIS, R. S.; VALE, E. M.; HERINGER, A. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 170-179, 2016.

RIBEIRO, D. G., de ALMEIDA, R. F., FONTES, W., de SOUZA CASTRO, M., de SOUSA, M. V., RICART, C. A. O., MEHTA, A.. Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. **Journal of proteomics**, v. 192, p. 137-146, 2019.

RIVAL, A., LEVANG, P. **Palms of controversies: Oil palm and development challenges**. CIFOR, 2014.

SAYER, J., GHAZOUL, J., NELSON, P.; BOEDHIHARTONO, A. K.. Oil palm expansion transforms tropical landscapes and livelihoods. **Global Food Security**, v. 1, n. 2, p. 114-119, 2012.

SHEHATA, H. F. Establishment Somatic Embryogenesis of Some Mango Rootstocks in Vitro. **Annals of Agricultural Science**, Moshtohor, v. 59, n. 2, p. 303-310, 2021.

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.

CAPÍTULO 2

Respostas ao estresse oxidativo de genitores de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq. Var. *Pisifera*) contrastantes à capacidade de aquisição da competência embriogênica

RESUMO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma espécie oleaginosa de grande importância econômica devido ao óleo extraído dos seus frutos. A embriogênese somática tem sido empregada para a multiplicação da palma de óleo, sendo que o estresse é um fator crucial para a indução de calos nesse processo. Desse modo, o objetivo foi avaliar as respostas ao estresse oxidativo de genitores de palma de óleo contrastantes quanto à capacidade de aquisição da competência embriogênica, por meio do sistema antioxidante enzimático durante a indução da embriogênese somática. A indução de calos foi realizada a partir de folhas imaturas de duas plantas adultas de *E. guineensis* Jacq. var. *Pisifera*, cultivada em meio MS com 450 μ M de Picloram. Foram realizados dois subcultivos de 45 dias cada. Aos 90 dias de indução foram avaliadas a percentagem de formação de calo, de oxidação dos explantes e de contaminação. As análises bioquímicas e enzimáticas foram efetuadas aos 7, 15, 30, 90 e 180 dias após o início do cultivo de exposição ao meio de indução. Foram analisadas proteínas solúveis totais e a atividade das enzimas peroxidase (POD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APx). Verificou-se genótipo-dependência nos resultados, sendo o genótipo responsivo, codificado como A26.50.6, que apresentou valores de formação de calos aos 90 dias de 9,3%. Nenhuma formação de calos foi observada para o genótipo não responsivo. Os resultados referentes aos teores de proteínas solúveis totais, mostraram-se estatisticamente diferentes entre os genótipos, embora o mais responsivo tenha sido o que apresentou os maiores valores para a enzima POD. A atividade das enzimas CAT e APx não apresentou o mesmo comportamento que a POD, com níveis altos apenas aos 180 dias para o genótipo não responsivo.

Palavras-chave: POD, CAT, APx, ROS, somatic embryogenesis.

ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is an oilseed species of great economic importance due to the oil extracted from its fruits. Somatic embryogenesis has been employed for oil palm multiplication, and stress is a crucial factor for callus induction in this process. Thus, the aim of this study was to evaluate the responses to oxidative stress of oil palm genotypes contrasting in their embryogenic competence acquisition capacity through the enzymatic antioxidant system during somatic embryogenesis induction. Callus induction was performed from immature leaves of two adult *E. guineensis* Jacq. var. Pisifera plants, cultured in MS medium with 450 μ M Picloram. Two subcultures of 45 days each were carried out. At 90 days of induction, the percentage of callus formation, explant oxidation, and contamination were evaluated. Biochemical and enzymatic analyses were performed at 7, 15, 30, 90, and 180 days after induction medium exposure. Total soluble proteins and the activity of peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APx) enzymes were analyzed. Genotype-dependence was observed in the results, with the responsive genotype, encoded as A26.50.6, showing callus formation values of 9.3% at 90 days. No callus formation was observed for the non-responsive genotype. The results regarding total soluble protein contents showed statistically different values between genotypes, although the most responsive showed the highest values for the POD enzyme. The CAT and APx enzyme activities did not show the same behavior as POD, with high levels only at 180 days for the non-responsive genotype.

Keywords: POD, callus induction, antioxidant system, somatic embryogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira oleaginosa pertencente da família Arecacea (HARTLEY, 1988; BABU; MATHUR, 2022). Essa cultura se destaca pela quantidade de óleo produzido e contribui em cerca de 40% do consumo global de óleo vegetal, com produtividades que alcançam até 6 t¹/ha de óleo (WECKX et al. 2019; FAS/USDA 2020). Do óleo produzido pelo fruto, cerca de 36% correspondente ao óleo obtido a partir do mesocarpo, enquanto o óleo da semente, ou palmiste, corresponde cerca de 4%. (WECKX et al., 2019).

Os países maiores produtores de óleo de dendê encontram-se no continente asiático, principalmente Malásia, Indonésia e Tailândia. Entre eles, o principal produtor e exportador do óleo é a Indonésia, com cerca de 50% da produção e exportação mundial (BASYUNI et al., 2018; HARAHAP et al., 2020).

Na América, a Colômbia destaca-se como o quarto produtor mundial, com aproximadamente 1,53 milhão de toneladas, seguido pelo Equador e Brasil, com 0,6 e 0,5 milhão de toneladas, respectivamente. (MEDINA et al., 2019).

De fato, o óleo de dendê é uma importante fonte de óleo vegetal do mundo, sendo utilizado principalmente no processamento de alimentos, mas também para aplicações não alimentícias, como em programas de bionergia (KWONG et al., 2017; MAHLIA et al. 2019).

Devido ao aumento da demanda de óleo de dendê nas últimas duas décadas, seu cultivo se expandiu para novas áreas (WECKX et al. 2019). Contudo, a palma de óleo é uma monocotiledônea com apenas um único ápice crescente e não pode ser reproduzido vegetativamente por técnicas tradicionais, o que acarreta a produção de mudas por semente a única forma de propagar a cultura, com a desvantagem de se produzir plantios heterogêneos devido a segregação genética (CORLEY e TINKER, 2016). Além disso, sua maior expansão em plantios no campo pode ser dificultada pela escassez de material de plantio de materiais elite, como no caso de híbridos interespecíficos, devido baixa taxa de germinação das sementes de alguns cruzamentos que pode atingir percentagens menores de 30% (YARRA et al. 2019; SOH et al. 2011).

De maneira geral, a técnicas da cultura de tecidos de plantas, especialmente via embriogênese somática, é a única maneira de se propagar eficientemente a palma de óleo (STARITSKY, 1970; PANNETIER et al., 1981; TEIXEIRA et al., 1994; SILVA et al., 2012; CONSTANTIN et al., 2015), uma vez que esta técnica pode permitir que se capture o potencial máximo de rendimento de materiais selecionados por meio da clonagem

destes materiais (SOH et al. 2011). Desse modo, os embriões somáticos formam-se a partir da desdiferenciação celular, da proliferação de calos e da diferenciação de células embriogênicas, sendo obrigado nesses casos, o uso de reguladores de crescimento para este processo (ZIMMERMAN, 1993; DONATO et al., 2000; PÁDUA et al., 2013).

O estresse tem sido associado diretamente à indução de calos durante a indução da embriogênese somática em palma de óleo (RIBEIRO et al., 2019). Assim, supõe-se que a modulação dos níveis de estresse pode ser fundamental para a indução e desenvolvimento da embriogênese somática (MITTLER, 2002; MITTLER et al., 2011; FEHÉR, 2015; ALTAMURA et al. 2016).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) induzem mudanças no padrão de expressão gênica, metabolismo celular e totipotência, fatores importantes para a competência embriogênica em células somáticas (PASTERNAK et al., 2002; ZAVATTIERI et al., 2010; PANDEY; CHAUDHARY, 2014; PRUDENTE et al., 2020). Incluída na resposta ao estresse oxidativo celular, a regulação da expressão de genes, que são codificados em proteínas e enzimas antioxidantes, as quais podem reduzir os danos potenciais causados pelas ROS (CYRNE et al., 2003; PANDEY; CHAUDHARY, 2014; GULZAR et al., 2020). Assim, essas enzimas e substâncias antioxidantes podem ser mobilizadas a fim de proteger a célula do dano oxidativo, ocasionado pelo acúmulo de ROS (BULBOVAS et al., 2005; BAŤKOVÁ et al., 2008; SCHIEBER e CHANDEL, 2014; MITTLER, 2017).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas ao estresse oxidativo de genitores de palma de óleo contrastantes quanto à capacidade de aquisição da competência embriogênica, por meio da avaliação da atividade de enzimas antioxidantes durante diferentes períodos da indução da embriogênese somática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF.

O material vegetal utilizado foram folhas imaturas e ainda não expandidas (palmito), oriundas de plantas adultas de *E. guineensis* Jacq. var. *Pisifera*, de dois genótipos: A26.50.6 e A25.58.17 (Figura 11). Os materiais foram cedidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Palma de Óleo, conduzido pela Embrapa Amazônia Ocidental, no Campo Experimental do Rio Urubu, no município de Rio Preto da Eva, AM.

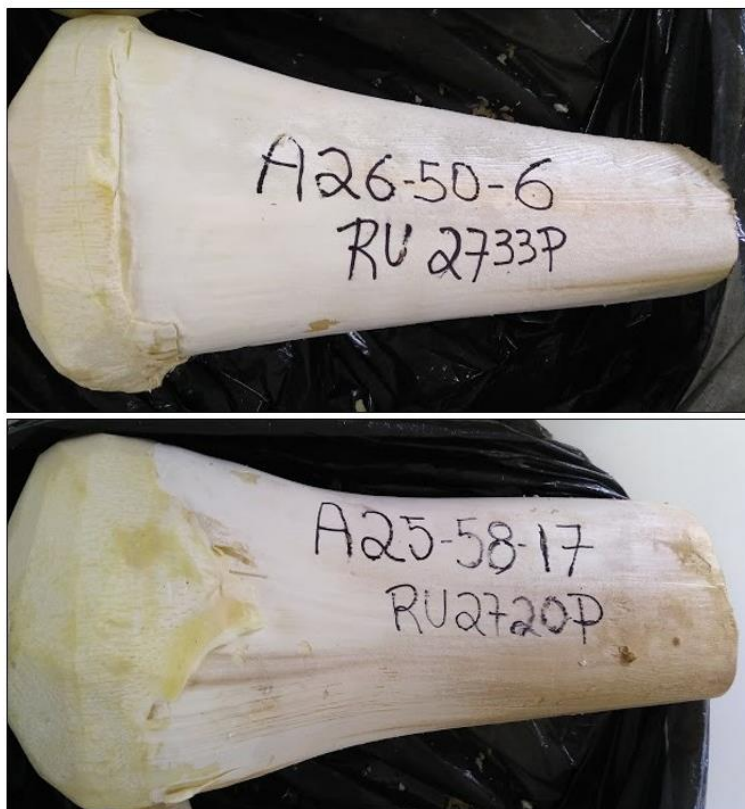


Figura 10. Palmitos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*), genótipos A26.50.6 e A25.58.17, utilizados para obtenção de folhas imatura.

Os palmitos coletados foram embalados em sacos plásticos e acondicionados em caixas de isopor, e imediatamente enviados por transporte aéreo até Brasília, DF. Uma vez recebidos no laboratório, as folhas mais externas foram removidas e o material reduzido para cerca de 30 cm, mantendo-se a parte basal, sendo as folhas mais externas removidas (Fig. 11, A-B). Em seguida, os palmitos passaram por uma aspersão com etanol 70%, antes da manipulação em câmara de fluxo laminar.

So condições assépticas, realizou-se o processo de assepsia pela submersão dos materiais em solução de etanol 70% (v/v) por 3 minutos e hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% de cloro ativo por 20 minutos (Fig. 11C). Por fim, realizaram-se três lavagens em água destilada e autoclavada para remoção do excesso das soluções desinfestantes. Os palmitos foram desinfestados separadamente (BALZON, et al., 2013).



Figura 11. A - Preparo dos palmitos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq. var. pisifera). B – Remoção das folhas externas do palmito. C - Palmito em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo.

2.2. Indução da embriogênese somática

A indução de calos foi realizada a partir de segmentos foliares de aproximadamente 1 cm², provenientes da região basal dos palmitos, que foram cultivados em placas de Petri (15 x 90 mm), com 25 mL de meio de cultura de indução de calos (MIC). Seis explantes, foram inoculados em cada placa de petri.

O MIC foi composto pelos sais e vitaminas de MS (MURASHIGE e SKOOG 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®), Balzon et al. (2013). O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da esterilização do meio, a qual foi realizada por autoclaveagem à 121 °C e pressão de 1,3 atm por 20 minutos.

Seis segmentos foliares de aproximadamente 1 cm², provenientes da região basal dos palmitos dos genótipos foram inoculados em cada placa de petri. Os explantes foram

então cultivados por dois subcultivos de 45 dias cada, para a obtenção de calos primários. Nessa etapa, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em condição de escuro por até 360 dias.

O delineamento experimental utilizado nesta etapa foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2×4 , sendo dois genótipos (A26.50.06 e A25.58.17) e quatro tempos de avaliação, após a indução (90, 180, 270 e 360 dias). O experimento foi composto por pelo menos 50 repetições para cada genótipo, sendo cada repetição constituída de uma placa de petri contendo 6 explantes foliares.

Posteriormente aos dois primeiros subcultivos, ou seja, aos 90 dias de indução foram avaliadas a percentagem de formação de calo, a percentagem de oxidação dos explantes e a percentagem de contaminação. Estas variáveis também foram avaliadas nos tempos sucessivos, a cada 90 dias, até completar 360 dias de indução.

2.3. Análises bioquímicas/enzimáticas

Para as análises bioquímicas/enzimáticas foram coletadas amostras em diferentes tempos de indução de calos, em ambos os genótipos: A26.50.06-responsivo e A25.58.17-não responsivo.

As amostras coletadas para as análises constituíram-se de explantes foliares antes da inoculação (tempo zero), que passaram pelo processo de assepsia e aqueles que entraram em contato com o meio de indução com a auxina, sendo estes coletados aos 7, 15, 30, 90 e 180 dias após o início do cultivo. Nos tempos de 90 e 180 dias, os explantes já apresentavam calos primários e calos embriogênicos formados, não sendo possível a separação, pois a quantidade de calos necessárias para análise era muito baixa.

Em cada período pré-determinado, aproximadamente 2,0 g de material vegetal fresco foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Após, os materiais foram acondicionados em freezer a -80°C até o início das análises, que incluíram a extração das proteínas solúveis totais, das enzimas do sistema antioxidante, do peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica.

2.4. Extração de proteínas solúveis totais e enzimas antioxidantes

Para a avaliação e quantificação das enzimas antioxidantes, realizou-se primeiramente a extração de proteínas solúveis totais (PST), conforme Kar; Mishra (1976). Por espectrometria, a concentração de proteínas foi determinada a 595 nm, segundo

o método de Bradford (1976). Para isso, foi utilizada como padrão a curva do BSA (“*bovine serum albumin*”) e os resultados foram expressos em $\mu\text{g Prot.}/\text{mg de MF}$.

Foram utilizadas três amostras de 300 mg de massa fresca do material vegetal congelado, que foram trituradas em nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, adicionou-se 3 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, com pH 7,5, contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3 mM de ditioneitol (DTT) e 5% (m/v) de polivinilpirrolidona (PVPP) insolúvel, que foram macerados e homogeneizados para extração das PST e das enzimas (POD, CAT e APx). As amostras foram separadas em dois microtúbulos, de 1,5 mL do tipo *Eppendorf*®, centrifugadas a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4° C para a coleta do sobrenadante. A quantificação foi realizada de acordo com o método de Bradford, em triplicata utilizando-se 5 μL da amostra e 250 μL do reagente de Bradford, em microplacas de 96 poços.

2.4.1. Determinação da atividade da enzima POD (Peroxidase)

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada conforme proposto por Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 100 μL de extrato enzimático diluído no tampão de extração; tampão fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1} pH 6,5; pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol.L^{-1} e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5 mmol.L^{-1} . A reação foi conduzida a temperatura ambiente por cinco minutos e resultou na formação de purpurugalina, a qual foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm. O coeficiente de extinção molar (2,47 $\text{mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em $\mu\text{mol de purpurugalina min}^{-1}$ de proteína.

2.4.2. Determinação da atividade da enzima CAT (catalase)

A catalase foi determinada pela decomposição do H_2O_2 conforme metodologia de Azevedo et al. (1998). A atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 80 segundos em meio de reação de 4 mL, em cubetas de quartzo, contendo extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e H_2O_2 12,5 mM. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína.

2.4.3. Determinação da atividade da enzima APx (ascorbato peroxidase)

A atividade da ascorbato peroxidase (APx) foi determinada em espectrofotômetro, seguindo o método de Nakano e Asada (1981), pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, em cubetas de quartzo. O meio de reação foi composto por tampão

fosfato 80 mM (pH 7,0), 5 mM de ascorbato, 1 mM de EDTA, 1 mM de H₂O₂, e 50 µ de extrato enzimático, em um volume total de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição do ascorbato. O decréscimo na absorbância foi monitorado em intervalos de 10 segundos, até totalizar 60 segundos. Os resultados foram expressos em µmol/ min/ mg.

2.5. Análises estatísticas

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos as análises de variância (ANOVA) com 5% de significância. De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). O pacote ExpDes (FERREIRA et al., 2011) e o programa R (R Development Core Team, 2022) foram utilizados para a análise estatística dos dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução da embriogênese somática

A primeira avaliação dos genótipos em relação ao meio de indução de calos foi realizada após 90 dias de cultivo, mas já foi possível observar mudanças na pigmentação e no intumescimento dos explantes (folhas imaturas) aos 30 dias de cultivo. Inicialmente, os explantes apresentavam uma coloração bege clara, mas gradualmente adquiriram uma coloração amarelada devido ao contato com o meio de cultivo em ambos os genótipos.

Diferentes respostas quanto à formação de calos em diferentes genótipos de *E. guineensis* também têm sido relatadas na literatura (SANPUTAWONG; TE-CHATO 2008; THAWARO; TE-CHATO 2009; THUZAR et al. 2011; SILVA et al. 2012; JAYANTHI et al. 2015; ALMEIDA et al., 2019), sendo influenciada por diversos fatores, como o próprio meio de cultivo e resposta genótipo dependente.

Aos 45 dias de cultivo, o genótipo A26.50.6 apresentou formação inicial de calos e, nesse momento, também foi possível observar o rompimento do mesofilo na região em que o explante foi excisado, exibindo a formação de calos diminutos, que apresentavam coloração amarelada e bege-amarronzada, com formatos levemente alongado e nodulares

Aos 90 dias de cultivo, o genótipo A26.50.6 apresentou uma taxa de formação de calos de $9,3 \pm 1,8\%$. Neste período, o genótipo A25.58.17 ainda não havia apresentado formação de calos (Tabela 1).

A frequência de indução de calos com competência embriogênica não depende somente das condições de cultivo, como o uso de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, mas também e principalmente dos genótipos (JIMÉNEZ 2001;

RIVAL; PARVEEZ 2004; THUZAR et al. 2012; CONSTANTIN et al. 2015). Uma resposta genótipo dependente. A taxa de indução é baixa mesmo entre genótipos que passaram pelas mesmas condições de cultivos (SOH et al. 2011; CONSTANTIN et al. 2015).

Tabela 1. Formação de calos em dois genótipos (A26.50.6 e A25.58.17) de palma de óleo (*E. guineensis* Jacq. var. *Pisifera*) em função do tempo de cultivo.

Genótipos	Cultivo em meio de indução (dias)			
	90	180	270	360
A26.50.6	9,3±1,8 aC	28,7±4,1 aA	21,0±3,6 aB	12,0±2,7 aC
A25.58.17	0,0±0,0 bA	3,67±1,19 bA	4,3±1,5 bA	1,3±0,6 bA

Médias seguidas por letras minúsculas diferem-se entre os genótipos e as maiúsculas ao longo dos dias após a indução. ±Erro Padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Aos 360 dias de cultivo, o resultado da formação de calo foi estatisticamente superior para o genótipo A26.50.6, com máximo calogênese aos 180 dias (28,7±4,1%), destacando-se e sendo considerado como genótipo responsivo à embriogênese somática. Por outro lado, o genótipo A25.58.17, apresentou baixa responsividade quanto à formação de calo, como também não diferiu no decorrer dos 360 dias (Tabela 1).

Para as variáveis percentagem de oxidação e contaminação, não houve a interação significativa entre os fatores (genótipo X tempo de cultivo), portanto, analisados separadamente.

A oxidação dos explantes ocorreu em ambos os genótipos e, com maior taxa de oxidação observada para o genótipo A25.58.17 com 47,0±2,5%. Durante os períodos de avaliação foi possível observar um aumento da taxa de oxidação e, aos 360 dias, houve uma média de 67,5±2,7% dos explantes oxidados (Fig. 12A).

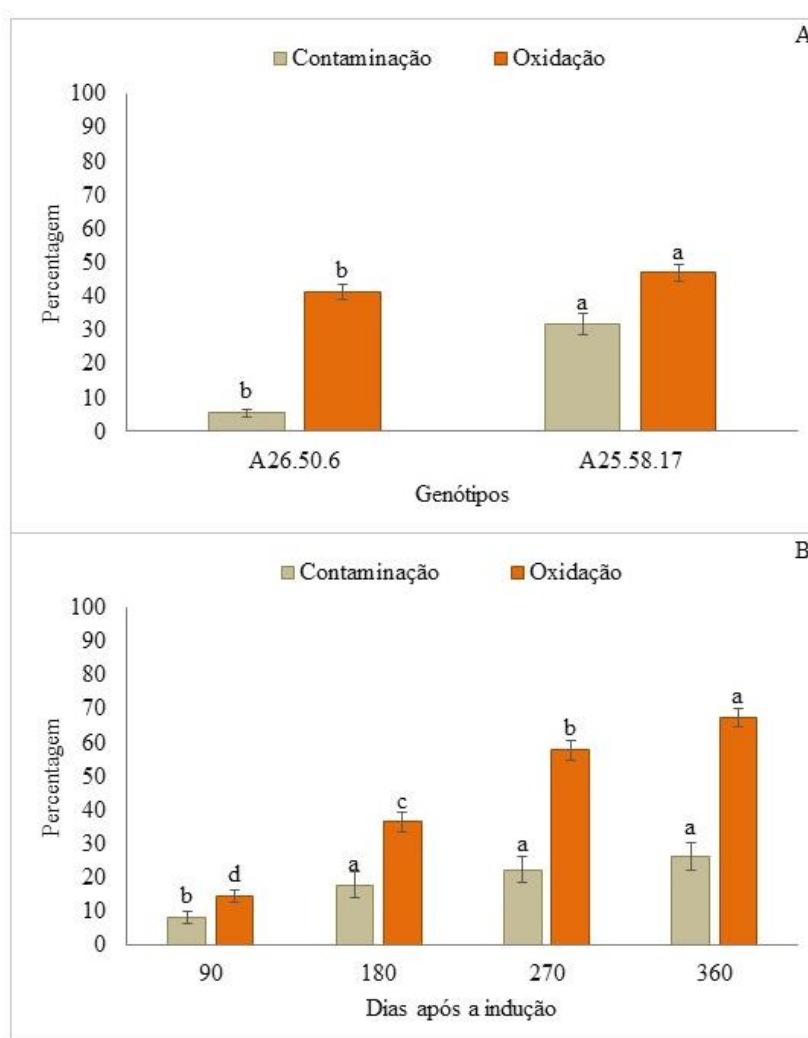


Figura 12. Porcengatem de contaminação e oxidação dos genótipos de palma de óleo contrastantes à induação de calos. A - Avaliação entre os genótipos A26.50.06 e A25.58.17. B - Avaliação ao longo do tempo, até 360 dias após a indução. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Barra: erro padrão.

Com relação à contaminação, o genótipo A25.58.17 teve maior média, quando comparado ao genótipo A26.50.06., foi possível observar taxas de contaminação de $31,9 \pm 3,0\%$. Após 180 dias, a taxa de contaminação se manteve abaixo dos 30% até o final do período de indução de calos (360 dias) (Fig. 12B).

Análises bioquímicas e enzimáticas

Houve efeito significativo do genótipo no conteúdo de proteínas solúveis totais. No tempo zero, o genótipo não-responsivo (A25.58.17) apresentou níveis maiores de proteínas, cerca de $16,67 \pm 1,24 \mu\text{g Prot./mg de MF}$, quando comparado ao genótipo responsivo (A26.50.6) com $11,83 \pm 1,12 \mu\text{g Prot./mg de MF}$ (Figura 13).

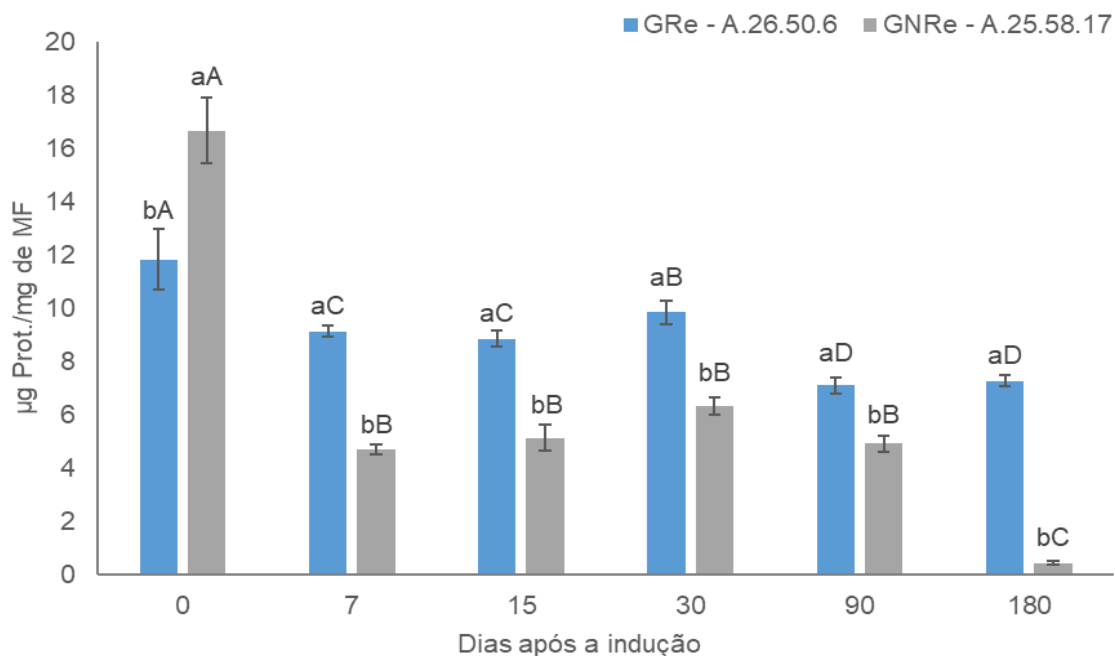


Figura 13. Concentração de proteínas solúveis totais ($\mu\text{g Prot./mg de MF}$) de explantes foliares (palmito) de dois genótipos A.26.50.6 (genótipo responsivo - GRe) e A25.58.17 (genótipo não responsivo - GNRe) de palma de óleo contrastante à indução de calo. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Letras minúsculas comparando entre os genótipos e letras maiúsculas ao longo do tempo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Logo após 7 dias de indução verificou-se uma queda nos níveis de proteínas em ambos os genótipos, diferindo estatisticamente entre si e ao longo do tempo. Neste período avaliado, o genótipo A26.50.6 apresentou os maiores teores de proteínas ($9,12 \pm 0,20 \mu\text{g Prot./mg de MF}$), quando comparado ao genótipo A25.28.17 que apresentou $4,70 \pm 0,17 \mu\text{g Prot./mg de MF}$ (Fig. 13). A maior diferença observada para esta variável foi após 180 dias de indução, onde o genótipo responsivo (A26.50.6) apresentou níveis de proteínas solúveis totais em torno de $7,26 \pm 0,20 \mu\text{g Prot./mg de MF}$, enquanto o genótipo não-responsivo (A25.28.17) apresentou apenas $0,43 \pm 0,05 \mu\text{g Prot./mg de MF}$ (Fig. 13).

Para determinar a presença do estresse oxidativo nos explantes foliares de palma de óleo, foi analisada a atividade de enzimas envolvidas no sistema antioxidante de defesa em resposta as EROs, antes da inoculação (tempo zero) e após passarem pelo processo de assepsia, como também em contato com o meio de cultura, contendo o regulador de crescimento, aos 7, 15, 30, 90 e 180 dias de cultivo.

Quanto aos teores da atividade específica da enzima peroxidase (POD) em razão do tempo de indução, os resultados são apresentados na Fig. 14. Nessa análise, não foram observadas diferenças estatísticas entre os genótipos no tempo zero. Após 7 dias de indução, a atividade da POD do genótipo não-responsivo apresentou-se mais elevada, com $9,93 \pm 1,83$ μmol de purpurogalina/min/mg prot, enquanto o genótipo responsivo apresentou $5,29 \pm 0,26$ μmol de purpurogalina/min/mg prot. A POD está diretamente relacionada à eliminação do radical peróxido, sendo uma classe de enzimas que tem como objetivo transformar esse radical peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2 (BHATT; TRIPATHI, 2011; BARBOSA et al., 2014).

Entre 15 a 180 dias do início dos cultivo, verificou-se aumentos significativos, crescentes e abundantes na atividade da POD do genótipo responsivo (A26.50.6), tendo o seu pico máximo de sua atividade registrada aos 90 dias, com valor de $35,27 \pm 0,50$ μmol de purpurogalina/min/mg prot, embora tenha sido observado leve redução de sua atividade aos 180 dias (Fig. 14). Segundo Shank et al., (2013), ao examinaram a atividade da peroxidase nos calos de diferentes explantes de *Moringa oleífera* Lam, registraram a atividade POD maior no calo do que na própria planta doadora de explante, corroborando com os nossos resultados, já que aos 90 e 180 dias os explantes coletados para análise já estavam com calos nesse período.

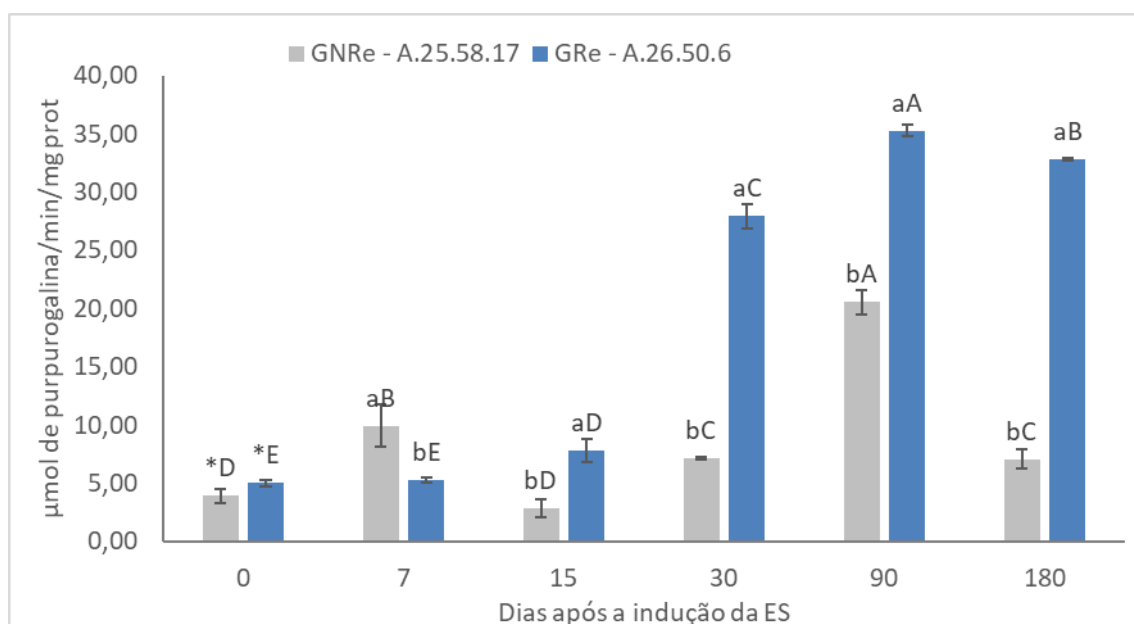


Figura 14. Atividade específica da enzima peroxidase (POD) de explantes foliares jovens (palmito) de genótipos de palma de óleo A.26.50.6 (genótipo responsivo - GRe) e A.25.58.17 (genótipo não responsivo - GNRe), durante a indução da embriogênese somática. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Letras minúsculas

comparando entre os genótipos e letras maiúsculas ao longo do tempo. * não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Aos 15 dias de cultivo, o genótipo não-responsivo (A25.58.17) apresentou o menor valor da atividade da POD, com $2,82 \pm 0,74$ μmol de purpurogalina/min/mg prot. Entretanto, para este mesmo genótipo pôde-se observar um aumento da atividade da POD até os 90 dias, com o valor máximo de $20,55 \pm 1,07$ μmol de purpurogalina/min/mg prot, com redução da atividade da POD a $7,07 \pm 0,82$ μmol de purpurogalina/min/mg prot aos 180 dias.

Ao longo do tempo da indução da embriogênese somática foi possível observar a elevação da atividade da POD no genótipo responsivo A26.50.6 em cerca de 5x, principalmente aos 90 dias após a indução, coincidindo com o período em que foi observado formação de calos primário e embriogênicos neste genótipo. Outro fator importante a ser observado é que ambos os genótipos registram o pico máximo de atividade da POD aos 90 dias, evidenciando algum mecanismo importante durante esse período para a embriogênese somática de palma de óleo, uma vez que logo em seguida houve decréscimo da atividade para ambos os genótipos, como observado na Fig. 14.

As análises de proteínas da classe das peroxidases têm sido fundamentais em outros estudos de ES (TAKEDA et al., 2003; MA et al., 2012; ZDRAVKOVIĆ-KORAĆ et al., 2019) e já são consideradas possíveis marcadores da ES para as espécies como *Vitis vinifera* L. (CALDERON et al., 2015) e *Medicago arborea* L. (GALLEGO et al., 2014).

Quanto aos teores da atividade específica da enzima catalase (CAT), os explantes do genótipo não responsivo (A25.58.17) apresentaram um pico atividade aos 180 dias após a indução da ES, com cerca de $206,58$ μmol de H_2O_2 consumido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína. Já os explantes do genótipo responsivo, não diferem entre si ao longo do tempo, bem como até os 90 dias também não diferem do genótipo não responsivo (Fig. 15). Ressalta-se que o A25.58.17 apresentou pouca formação de calos, quando comparado com o genótipo responsivo (A.26.50.6), conforme a tabela 1.

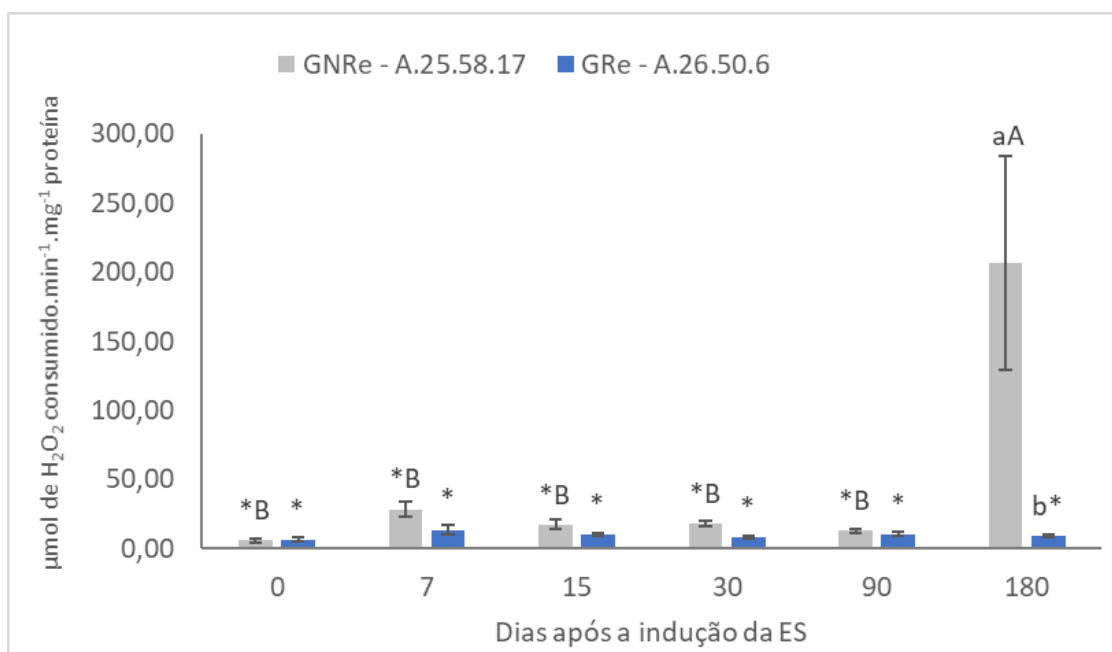


Figura 15. Atividade específica da enzima catalase (CAT) de explantes foliares jovens (palmito) de genótipos de palma de óleo A.26.50.6 (genótipo responsivo - GRe) e A.25.58.17 (genótipo não responsivo - GNRe), durante a indução de calo. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Letras maiúsculas comparando ao longo do tempo e letras minúsculas entre os genótipos. * não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

As enzimas que combatem os radicais livres, como superóxido dismutase, ácido ascórbico, peroxidase, catalase, cumprem o papel de eliminar os radicais livres e reduzem a degradação celular (ADIL et al., 2019). A avaliação da atividade da catalase aqui observada, aumenta significativamente aos 180 dias, que é o período em que o genótipo não responsivo começa a formar pequenas quantidades de calos, contrastando com o genótipo responsivo que tem a formação de calos iniciada aos 90 dias, no entanto, manteve a atividade da catalase semelhante ao longo do tempo, não sofrendo com a alta concentração de 2,4-D, utilizada para indução da embriogênese somática.

Para a atividade específica da Acorbato Peroxidase (APx), os explantes do genótipo não responsivo (A.25.58.17), também apresentaram um pico de atividade aos 180 dias após a indução, com cerca de 1570,54 $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína (Fig. 16), denotando um comportamento semelhante com a atividade da CAT. Os explantes do genótipo responsivo, não diferiram estatisticamente entre si, mas pode se observar uma atividade de 36,88 $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína ao 90 dias, corroborando com alta taxa de formação de calo nesse mesmo período.

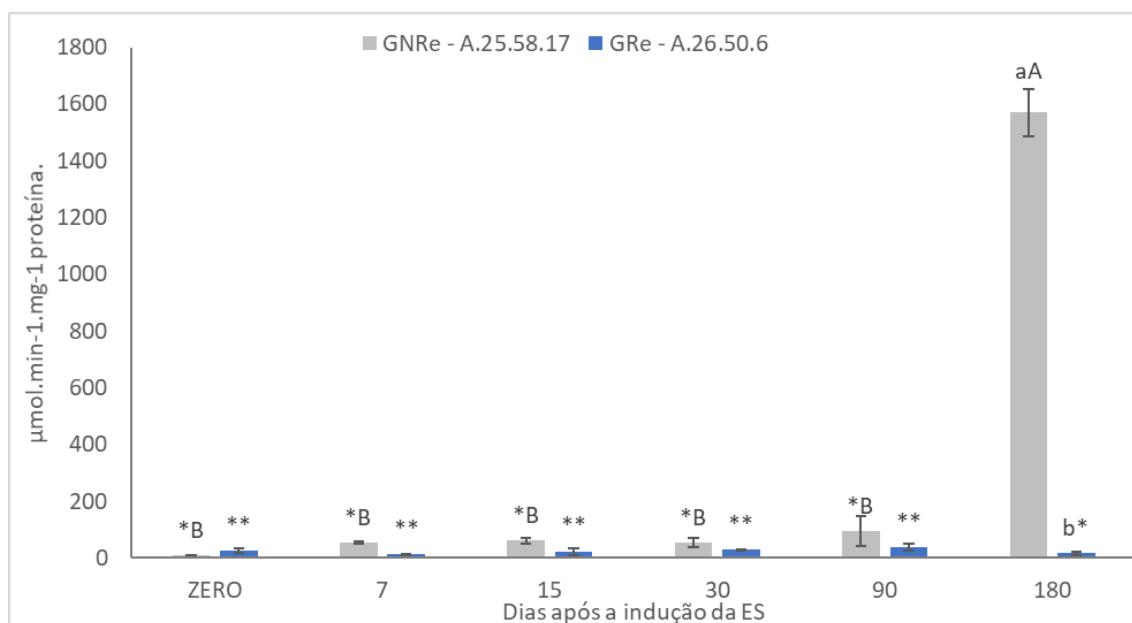


Figura 16. Atividade específica da enzima Ascorbato peroxidase (APx) de explantes foliares jovens (palmito) de genótipos de palma de óleo A.26.50.6 (genótipo responsivo - GRe) e A25.58.17 (genótipo não responsivo - GNRe), durante a indução da embriogênese somática. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Letras maiúsculas comparando ao longo do tempo e letras minúsculas entre os genótipos. * não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

A Ascorbato Peroxidase (APX) é a principal enzima antioxidante em organismos fotossintetizantes, utilizando o ácido ascórbico como doador de elétrons para reduzir peróxido de hidrogênio em água (CAVERZAN et al., 2012). Para superar os danos induzidos pelo estresse oxidativo, as plantas possuem mecanismos para controlar e regular adequadamente os níveis de ROS, incluindo o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como APx e CAT (NGAN et al., 2020). No entanto, foi possível observar que o genótipo não responsivo a embriogênese somática, só apresentou essa alta atividade para ambas as enzimas aos 180 dias, quando começou a ter uma leve resposta a formação de calos. Já o genótipo responsivo se manteve com níveis baixos da APx ao longo dos 180 dias, não sofrendo com a adição de 2,4-D e ainda assim respondendo a formação de calos já nos primeiros 90 dias.

4. CONCLUSÃO

O genótipo responsivo (A26.50.6) à embriogênese somática apresenta maior quantidade de formação de calos, redução da atividade da peroxidase nos primeiros sete dias e aumento exponencial a partir dos 15 dias, já as enzimas CAT e APx não tiveram o mesmo comportamento que a POD, onde ambas só aumentaram no final da avaliação e apenas para o genótipo não responsivo (A25.58.17), que apresentou a menor taxa de formação de calos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIL, M., REN, X., & JEONG, B. R.. Light elicited growth, antioxidant enzymes activities and production of medicinal compounds in callus culture of *Cnidium officinale* Makino. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 196, p. 111509, 2019.

ALTAMURA, M. M.; DELLA ROVERE, F.; FATTORINI, L.; D'ANGELI, S.; FALASCA, G. Recent advances on genetic and physiological bases of in vitro somatic embryo formation. **In vitro embryogenesis in higher plants**, p. 47-85, 2016.

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.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; RANGEL CAMARA, T. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.

BASYUNI, M.; WATI, R.; DENI, I.; TIA, A. R.; SIREGAR, E. S.; SYAHPUTRA, I. Cluster analysis of polyisoprenoid in oil palm (*Elaeis guineensis*) leaves in different land-uses to find the possible cause of yield gap from planting materials. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 19, n. 4, p. 1492-1501, 2018.

BAŤKOVÁ, P.; POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 413-422, 2008.

BHATT, Indu; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 850-859, 2011.

BULBOVAS, P.; RINALDI, M.; DELITTI, W. B.; DOMINGOS, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 4, p. 687-696, 2005.

CALDERON; ZAPATA; BARCELO. Peroxidase isoenzymes as markers of cell dedifferentiation in grapevines (*Vitis vinifera*). **VITIS-Journal of Grapevine Research**, v. 34, n. 4, p. 207, 2015.

CARLSON; K. M.; HEILMAYR; R.; GIBBS; H. K.; NOOJIPADY; P.; BURNS; D. N.; MORTON; D. C.; KREMEN; C. Effect of oil palm sustainability certification on deforestation and fire in Indonesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 1, p. 121-126, 2018.

CAVERZAN, A., PASSAIA, G., ROSA, S. B., RIBEIRO, C. W., LAZZAROTTO, F., & MARGIS-PINHEIRO, M. (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology**, 35(4 suppl 1), 1011–1019.

CONSTANTIN; M.; NCHU; W. A.; GODSWILL; N. N.; WIENDI; N. M. A.; WACHJAR; A.; FRANK; N. E. G. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 0-1, 2015.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. **The oil palm**: Fifth. United State America: The Atrium, Southern Gate, 2016.

CYRNE; L.; US MARTINS; L.; FERNANDES; L.; MARINHO; H. S. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 3, p. 385-393, 2003.

DE CARVALHO SILVA, R.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n. 1, p. 59-67, 2012.

DE PINTO, M. C.; LOCATO, V.; DE GARA, L. Redox regulation in plant programmed cell death. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 2, p. 234-244, 2012.

DONATO et al. In vitro somatic embryogenesis of common cabbage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 711-718, 2000.

FAS/USDA. **Vegetable oil prices on an upward trend**. Acessado em 2020.

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, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, v. 1, n. 1, p. 1-9. 2011.

GALLEGO et al. Involvement of peroxidase activity in developing somatic embryos of *Medicago arborea* L. Identification of an isozyme peroxidase as biochemical marker of somatic embryogenesis. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 2, p. 78-84, 2014.

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.

GULZAR, B., MUJIB, A., 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.

HARAHAP, Fumi et al. Meeting the bioenergy targets from palm oil based biorefineries: An optimal configuration in Indonesia. **Applied Energy**, v. 278, p. 115749, 2020.

HARTLEY, Charles William Stewart et al. **The oil palm (*Elaeis guineenses* Jacq.)** Longman scientific and technical, 1988.

KWONG, Qi Bin et al. Evaluation of methods and marker Systems in Genomic Selection of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **BMC genetics**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2017.

LOW, Eng-Ti L. et al. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2008.

MA et al. Histological changes and differences in activities of some antioxidant enzymes and hydrogen peroxide content during somatic embryogenesis of Musa AAA cv. Yueyoukang 1. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 87-92, 2012.

MAHLIA, Teuku Meurah Indra et al. Palm oil and its wastes as bioenergy sources: a comprehensive review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 15, p. 14849-14866, 2019.

MEDINA, Jesus David Coral et al. Oil palm cultivation and production in South America: status and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 5, p. 1202-1210, 2019.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in plant science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

MITTLER, R. ROS signaling: the new wave? **Trends in plant science**, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MORCILLO, Fabienne et al. EgAP2-1, an AINTEGUMENTA-like (AIL) gene expressed in meristematic and proliferating tissues of embryos in oil palm. *Planta*, v. 226, n. 6, p. 1353-1362, 2007.

PÁDUA et al. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) proembryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1545-1556, 2013.

PANDEY, D. K.; CHAUDHARY, B. Oxidative stress responsive SERK1 gene directs the progression of somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310). **American Journal of Plant Sciences**, v. 2014, 2014.

PANNETIER, Catherine; ARTHUIS, P.; LIÉVOUX, Danielle. Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. 1981.

PASTERNAK, Taras P. et al. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant physiology**, v. 129, n. 4, p. 1807-1819, 2002.

PRUDENTE, D. D. O., DE SOUZA, L. B., & PAIVA, R. Plant somatic embryogenesis: Modulatory role of oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 90, n. 3, p. 483-487, 2020.

RIBEIRO, D.G., DE ALMEIDA, R. F., FONTES, W., DE SOUZA CASTRO, M., DE SOUSA, M. V., RICART, C., DA 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 proteomics**, v. 192, p. 137-146, 2019.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. 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. 378-385, 2010.

SCHIEBER, M., CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SOH, A. C. et al. Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. **J Oil Palm Res**, v. 23, p. 935-952, 2011.

STARITSKY, G. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. **Euphytica**, v. 19, n. 3, p. 288-292, 1970.

TAKEDA et al. Expression and function of cell wall-bound cationic peroxidase in asparagus somatic embryogenesis. **Plant physiology**, v. 131, n. 4, p. 1765-1774, 2003.

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 247-250, 1994.

WECKX, S.; INZÉ, D.; MAENE, L. Tissue culture of oil palm: Finding the balance between mass propagation and somaclonal variation. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 722, 2019.

YARRA, R. et al. Progress in tissue culture and genetic transformation of oil palm: an overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5353, 2019.

ZAVATTIERI, M. A. et al. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 12-13, 2010.

ZDRAVKOVIĆ-KORAĆ, Snežana et al. Somatic embryogenesis from stamen filaments of *Aesculus flava* Sol. and peroxidase activity during the transition from friable to embryogenic callus. **Scientia Horticulturae**, v. 247, p. 362-372, 2019.

ZIMMERMAN. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1411, 1993.

CAPÍTULO 3

Transformação genética mediado por bombardeamento de partículas em calos embriogênicos de palma de óleo (*Elaeis* spp.)

RESUMO

A transformação genética de plantas permite a inserção de sequências gênicas de interesses agronomicamente desejáveis. O foco da transformação genética em palma de óleo tem sido especialmente o de aumentar os teores de ácido oleico, no entanto essa metodologia ainda apresenta alguns obstáculos. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da transformação genética de palma de óleo, por meio do bombardeamento de partículas, utilizando um vetor de transformação para o silenciamento do gene FAD2 e o gene *bar* para selecionar plantas transformadas. Para isso foram utilizados microcalos embriogênicos, que estavam estabelecidos em meio líquido, oriundas de folhas imaturas coletadas do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). O processo de transformação dos calos embriogênicos foi realizado utilizando-se o plasmídeo pMONORNAiBAR-FAD, por meio de biobalística, constituída da aceleração de micropartículas de tungstênio, co-cultivado com o agente de pressão de seleção glufosinato de amônio (4 mg. L⁻¹). No tratamento (T1), os microcalos receberam apenas um tiro, enquanto o tratamento (T2) os microcalos receberam dois tiros consecutivos e, ao final foram avaliados quanto a contaminação, oxidação e sobrevivência, bem como a formação de embriões somáticos, regeneração e identificação indireta das plantas transformadas. Aos 90 dias após o procedimento ambos os tratamentos apresentaram moderada oxidação, apenas o T2 demonstrou contaminação (37,5%), já o T1 teve a maior taxa de sobrevivência (53,1%). Quanto a formação de embriões somáticos, o T1 e T2 alcançaram valores de 12,5% e 20% respectivamente, além disso, o T2 apresentou cerca de 23 embriões somáticos, que resultaram na formação de 21 plantas regenerada. Na identificação indireta e utilizando a técnica PCR, não foi possível detectar nenhum evento de transformação. Os resultados sugerem otimização ao protocolo de transformação.

Palavras-chave: biobalística, microcalos, FAD2, BAR, híbrido interespecífico

ABSTRACT

The genetic transformation of plants allows the insertion of gene sequences of agronomically desirable traits. The focus of genetic transformation in oil palm has been specially to increase the levels of oleic acid, however this methodology still has some bottlenecks. Therefore, the objective of this work was to evaluate the efficiency of the genetic transformation of oil palm, through particle bombardment, using a transformation vector for the silencing of the FAD2 gene and the bar gene to select transformed plants. For this, embryogenic microcalli were used, which were established in liquid medium, from immature leaves collected from the interspecific hybrid – B351733 (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). The embryogenic callus transformation process was carried out using the pMONORNAiBAR-FAD plasmid, by means of bioballistics, constituted by the acceleration of tungsten microparticles, co-cultured with the selection pressure agent glufosinate of ammonium (4 mg. L^{-1}). In the treatment (T1), the microcalli received only one shot, while the treatment (T2) the microcalli received two consecutive shots and, at the end, they were evaluated for contamination, oxidation and survival, as well as the formation of somatic embryos, regeneration and identification. At 90 days after the procedure both treatments showed moderate oxidation, only T2 showed contamination (37.5%), whereas T1 had the highest survival rate (53.1%). As for the formation of somatic embryos, T1 and T2 reached values of 12.5% and 20%, respectively. In addition, T2 presented about 23 somatic embryos, which resulted in the formation of 21 regenerated plants. In indirect identification it was not possible to detect any transformation event. The results suggest an optimization of the transformation protocol.

Keywords: bioballistics, microcallus, FAD2, BAR, interspecific hybrid

1. INTRODUÇÃO

A demanda global por alimentos deve aumentar 60% em 2050, impulsionado pela rápida expansão da população humana e mudanças alimentares globais (FRÓNA et al., 2019). A palma de óleo (*Elaeis spp.*) é, reconhecidamente, a oleaginosa mais eficiente na produção de óleo vegetal no mundo. Ela contribui com cerca de 35% de todo o óleo vegetal do planeta, sendo assim, uma solução para a insegurança alimentar da crescente população mundial (MIELKE, 2017).

Espécies de palma de óleo como *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera* estão amplamente distribuídas nas regiões da África e América do Sul e Central. O híbrido interespecífico desenvolvido a partir do cruzamento do dendê africano e do dendê americano (*E. guineensis* x *E. oleifera*) é cultivado principalmente nas regiões da América do Sul (HORMAZA et al., 2012; RIYADI et al., 2018). O dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma das principais culturas cultivadas do mundo, sendo cultivada em mais de 16 milhões de hectares (WECKX et al., 2019; FAOSTAT, 2020).

Os métodos convencionais de propagação vegetativa são impossíveis de serem utilizados na propagação de híbridos de interesse, pois as plantas não produzem brotos axilares, mas sim, apenas um único meristema vegetativo (MUNIRAN et al., 2008). Para superar essas dificuldades, o uso da cultura de tecidos de plantas, em especial, a embriogênese somática, é a melhor e possivelmente a única maneira para a geração de clones uniformes com características desejáveis de plantas elite (LEE, et al., 2019).

Apesar da melhoria de rendimento de frutos e da qualidade do óleo alcançada através do melhoramento convencional e clonagem de genótipos superiores (BARCELOS et al., 2015; KHATUN et al., 2017), a engenharia genética pode gerar plantas com uma gama de característica de interesse que vão desde a adaptação a diversos ambientes e resistência a doenças até mudanças nas características de óleo para atender a diferentes finalidades (relação entre ácidos graxos saturados e insaturados, conteúdo de carotenoides, menor acidez, entre outros) (LOPES et al., 2012; ZHOU e LUO, 2013; CHAVES, et al., 2018).

A transformação genética de plantas permite a integração de novas sequências de genes agronomicamente úteis, essa transferência de genes desejáveis e estáveis é uma ferramenta significativa em programas de melhoramento pela produção de novas plantas geneticamente diversas (CHILTON et al., 1977; MURAI et al., 1983; Voytas e Gao 2014; ALTPETER et al., 2016). A tecnologia de transformação genética mais utilizada em palma de óleo tem sido a transformação mediada por bombardeamento de partículas,

aliado a utilização do RNA interferente (RNAi), que apresenta importantes aplicações para o melhoramento genético por possibilitar o silenciamento gene-específico (JAGTAP et al., 2011; GUO et al., 2016; MASANI et al., 2018; PUNJABI et al., 2018).

Aliando as duas tecnologias anteriormente citadas, o foco da transformação genética em palma de óleo tem sido especialmente o de aumentar os teores de ácido oleico. A modificação da via de síntese de ácidos graxos, através do silenciamento da Oleoil-fosfatidilcolina dessaturase (FAD2), pode resultar na redução da formação de ácido linoleico e o aumento no acúmulo de ácido oleico (ZAPLIN et al., 2013), que é utilizado como matéria-prima importante na indústria oleoquímica (PARVEEZ et al., 2015).

No entanto, para que se estabeleça um eficiente protocolo de transformação genética, a regeneração de plantas é uma das etapas mais importantes. De modo geral, os protocolos de transformação genética em palma de óleo ainda apresentam algumas dificuldades, pois não possuem um sistema de transformação eficiente e reproduzível para a seleção e regeneração de plantas transgênicas dos demais genótipos de interesse (IZAWATI et al., 2015).

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência da transformação genética de palma de óleo, por meio do bombardeamento de partículas, utilizando um vetor de transformação para o silenciamento do gene FAD2 e o gene *bar* para selecionar plantas transformadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, situado em Brasília – DF, Brasil.

Para a indução da embriogênese somática foram utilizadas como explantes, folhas imaturas aclorofiladas e ainda não expandidas (palmito), oriundas de palmitos coletados de plantas adultas do híbrido interespecífico – B351733 (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*).

Inicialmente, os palmitos coletados em campo foram submetidos ao processo de assepsia em laboratório, onde folhas mais externas foram retiradas em fluxo laminar com auxílio de bisturi. Em seguida, o material foi submerso em solução de álcool (70%) por 3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) (solução comercial) por 20 minutos e três lavagens em água destilada e autoclavada.

Posteriormente, os explantes foliares do palmito foram retirados com auxílio de pinças e bisturis para inoculação em meio de cultura de indução de calos (MI), formulado com sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog 1962) e suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma®), conforme Balzon et al. (2013).

Seis segmentos de folhas de aproximadamente 1 cm², provenientes das regiões apical e basal dos palmitos, foram inoculados com a face adaxial em contato com o meio de cultura, em placas de Petri contendo 25 mL de meio MI. Todos os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C e, durante a obtenção de calos, acondicionados no escuro.

Nestas condições de cultivo, os explantes foram mantidos por três subcultivos de 60 dias cada para a obtenção de calos primários e mais um subcultivo de 90 dias para a obtenção de calos embriogênicos.

Após o processo de indução, os calos embriogênicos obtidos foram transferidos para o meio de cultura de consistência líquida para o estabelecimento e multiplicação de microcalos e agregados celulares, de acordo com Monteiro et al. (2018). O meio de consistência líquida foi formulado com sais e vitaminas de MS (MURASHIGE e SKOOG 1962) e suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 500 mg.L⁻¹ glutamina, 100 mg.L⁻¹ asparagina e 100 mg.L⁻¹ caseína hidrolisada. O meio foi depositado em erlenmeyers de 125 mL de capacidade, com volume utilizado de 30 mL de meio de cultura e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da esterilização em autoclave à 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Os Erlenmeyers contendo meio líquido e cerca de 300 mg de massa de calos embriogênicos, foram acondicionados sob agitação (100 rpm), em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas tubulares tipo Led (Philips, mod. 920008431). Os meios de cultura foram renovados a cada 30 dias até a obtenção significativa do volume de microcalos e agregados celulares com características embriogênicas.

2.2 Transformação genética: plasmídeo – vetor de transformação

Os experimentos de transformação genética foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

O processo de transformação dos calos embriogênicos e agregados celulares foi realizado utilizando-se o plasmídeo pMONORNAiBAR-FAD (Fig. 18), que contém um fragmento de 465 pb do gene FAD2 da palma de óleo, que foi clonado no sentido senso e antisenso para formar um grampo, visando o silenciamento pós transcricional desse gene, afim de modificar a rota metabólica do óleo responsável pela conversão de precursores de ácido oleico em precursores de ácido linoleico (OKULEY et al., 1994; SCHLUETER et al. 2007). O plasmídeo é composto também pelo promotor pUbi1 (promotor do gene de ubiquitina de milho), em seguida o gene *bar* (gene marcador de seleção), para selecionar as células transformadas, além do gene da ampicilina para a seleção das bactérias transformadas. Como marcador de seleção, utilizaou-se o gene BAR que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

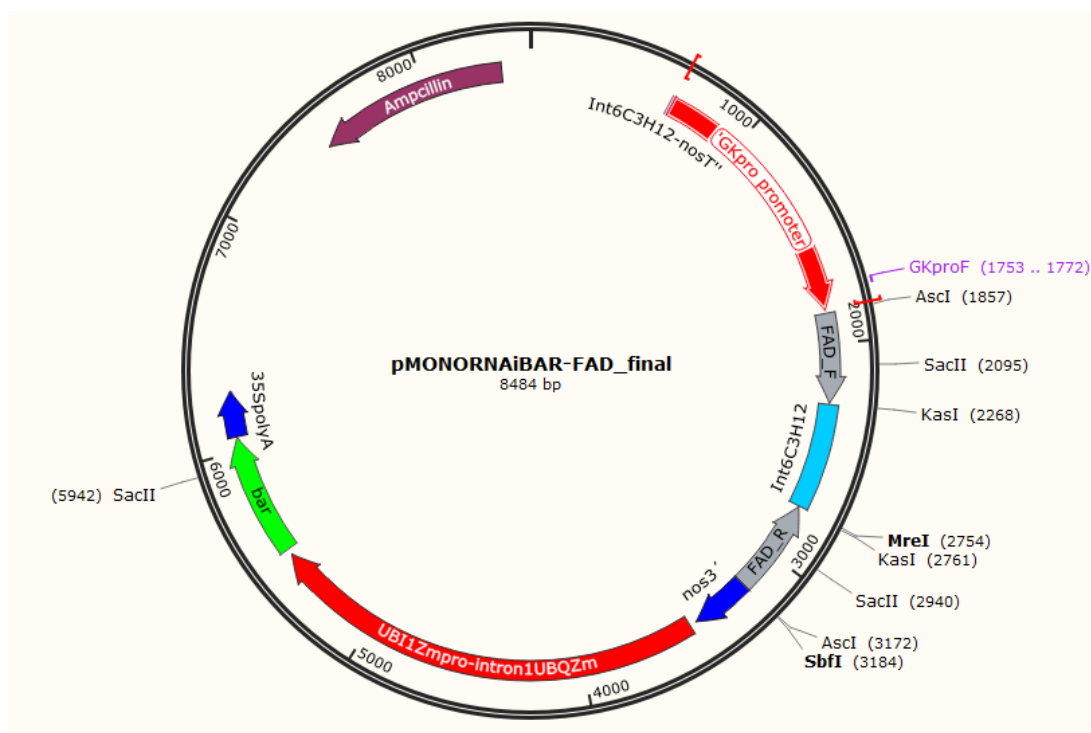


Figura 18. Representação esquemática do Mapa do vetor pMONORNAiBAR-FAD com o fragmento de 465 pb do gene FAD2 amplificado de palma de óleo, escolhido com base em múltiplos alinhamentos por apresentar maior identidade dentro da família gênica nas monocotiledôneas, tendo sido clonado na direção senso e antisenso separado pelo intro6C3H12 para constituir o grampo (RNAi) que está dirigido pelo promotor GKpro (gene da fosfoglicerato quinase) e terminador nos; e o gene marcador de seleção *bar* dirigido pelo pUbi1 (promotor de Ubiquitina de milho) e terminador do 35SCaMV.

Os plasmídeos foram preparados para bombardeamento usando o protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook et al. (1989), sendo quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop) com concentração ajustada para 1 µg/µL.

2.3 Biobalística: bombardeamento de partículas

O processo de biobalística foi baseado no protocolo desenvolvido por Aragão et al. (1996, 2002), para introduzir o vetor pMONORNAiBAR-FAD nas células embriogênicas por meio de aceleração de micropartículas de tungstênio.

Os microcalos embriogênicos, advindos da suspensão em meio líquido, foram transferidos para placas de Petri (60 x 15 mm) com meio de multiplicação de células, composto pelo meio de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 1,0 g.L⁻¹ de caseína, 1,0 g.L⁻¹ de glutamina, 20 µM de picloram, 5µM de 2iP, tendo o seu pH ajustado para 5,7±0,1 e suplementado com 7,5 g.L⁻¹ de Phytigel, ficando nessas condições overnight.

Para o processo de transformação, primeiramente foram pesados 60 mg de micropartículas de tungstênio que, posteriormente, foram transferidas para tubos de microcentrífuga, adicionando-se 1 mL de etanol 70%. Com o auxílio do vortex, as partículas foram misturadas por 15 minutos e centrifugadas a 3000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado por meio de micropipeta, sem que o sedimento fosse tocado. A ele foi adicionado 1 mL de água estéril, agitando vigorosamente por mais 15 minutos com auxílio do vortex, seguido de centrifugação a 3000g por 5 minutos. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. Finalizadas as lavagens, o sobrenadante foi descartado e as partículas foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 50% autoclavado.

Posteriormente, as micropartículas foram distribuídas em tubos de microcentrífuga em 50 µL e agitadas vigorosamente com o auxílio do vortex por aproximados 30 segundos, anteriormente sonicadas por 5 minutos, a fim de garantir total desagregação das partículas. No momento de cada bombardeamento, as partículas receberam o vetor pMONORNAiBAR-FAD numa proporção de 8 µL (8 µg) de DNA para cada 50 µL de partículas de tungstênio. Após 2 segundos de rápida agitação em vortex, foram adicionados 50 µL de CaCl₂ 2.5 M e mais uma vez homogeneizadas. Em seguida, 20 µL de espermidina a 0,1 M e mais uma vez homogeneizados. Agitou-se por 10 minutos em velocidade mínima no vortex, seguida de centrifugação por 10 segundos a 3000 x g. O sobrenadante foi descartado, adicionando-se 150 µL de etanol absoluto, o qual foi rapidamente homogeneizado e centrifugado a 3000 x g. O sobrenadante foi novamente descartado e, finalmente, adicionou-se 24 µL de etanol absoluto,

homogeneizando-se mais uma vez, distribuindo 3,8 μL de partículas sobre cada membrana carreadora.

As condições físicas do bombardeamento, utilizando um acelerador a alta pressão de gás Hélio (ARAGÃO et al., 1996), foram: pressão de gás Hélio 1.200 psi, distância do anteparo para os explantes de 6 cm e vácuo de 27 lb de Hg. Os tratamentos foram a quantidade de tiros por placa. Assim, no primeiro tratamento (T1), os microcalos receberam apenas um tiro, enquanto para o segundo tratamento (T2) os microcalos receberam dois tiros consecutivos.

Cada tratamento foi formado por 4 placas contendo 10 microcalos cada. Os controles consistiram de: controle de transformação genética, ou controle positivo (CP), no qual o DNA foi substituído por água na precipitação com as partículas. Já o controle de regeneração, ou controle negativo (CN), os explantes não foram submetidos ao bombardeamento e foram cultivados sem a presença do glufosinato de amônio. Para os explantes submetidos ao bombardeamento e à pressão de seleção, os microcalos foram cultivados na presença de 4,0 mg.L^{-1} do herbicida glufosinato de amônio, assim como o controle positivo.

Os microcalos bombardeados foram cultivados em seus respectivos tratamentos supracitados, todos em ambientes com ausência de luz, por quatro subcultivos de 30 dias cada. Após esse período foi avaliada a porcentagem de contaminação, oxidação e sobrevivência dos explantes, que foram considerados sobreviventes aqueles que apresentavam coloração bege/amarelada e/ou com estruturas celulares novas.

2.4 Diferenciação e maturação dos embriões somáticos após bombardeamento de partículas

A diferenciação dos embriões somáticos foi realizada a partir da inoculação dos calos provenientes da fase anterior citado acima em placas de petri (15 x 90 mm) com 25 mL de meio de diferenciação de embriões somáticos. Este meio é composto por metade dos sais e vitaminas do meio de MS, suplementado com 30 g.L^{-1} de sacarose, 4 mg.L^{-1} de GA (Glufosinato de amônio), 1,5 g.L^{-1} de carvão ativado e solidificado com 2,3 g.L^{-1} de Phytigel (Sigma®). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da esterilização realizada por autoclavagem.

Nessa etapa, os calos foram cultivados por até quatro subcultivos de 30 dias para a obtenção dos embriões somáticos. O material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}$.

$2.s^{-1}$ fornecida por lâmpadas LED (Philips® – Green Power 20 W 60 Hz). Após esse período foi avaliado a porcentagem de formação de embriões somáticos, oxidação e o número de embriões somáticos no estágio torpedado.

2.5 Regeneração dos embriões somáticos que passaram pela pressão de seleção

A regeneração foi realizada a partir da inoculação dos embriões somáticos em estádio torpedado, provenientes da fase de diferenciação e maturação. Embriões somáticos diferenciados foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de regeneração. Este meio é constituído por meio de MS isento de reguladores de crescimento, mas suplementado com 0,5 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 0,1 g.L⁻¹ de cisteína, 0,1 g.L⁻¹ de asparagina, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel e 2,3 g.L⁻¹ de carvão ativado, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (BALZON et al. 2013). Nesta etapa, o meio de cultura não recebeu a adição do herbicida glufosinato de amônio. O material foi acondicionado em sala de crescimento nas mesmas condições descritas anteriormente.

Nessa fase, os embriões somáticos foram cultivados por pelo menos quatro subcultivos de 30 dias cada, para a obtenção de plantas T₀ potencialmente transformadas. Após esse período foi analisado o número de plantas regeneradas por tratamento e a identificação dos transgenes por imunocromatografia de fluxo lateral e análise PCR.

2.6 Identificação das plantas transformadas por imunocromatografia com tira de fluxo lateral e análise PCR

A confirmação das plantas transgene foi realizada de forma indireta, a partir de anticorpos específicos, que detectam a presença da proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT). O teste foi realizado por meio do método imunocromatográfico de tiras de fluxo lateral (“Lateral Flow Strip”), Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.), específica para detecção da proteína PAT. O procedimento foi realizado em oito plantas regeneradas de diferentes calos. A avaliação consistiu em retirar uma pequena porção de folha das plantas regeneradas, colocando-as em tubo tipo *Eppendorf*®. Ao tubo, acrescentou-se 750 µl de tampão PBS, macerando o material com um pistilo e colocando-se a fita em contato com o produto macerado. A avaliação do resultado foi realizada após 5 minutos.

Além disso, foi realizada a análise da técnica de PCR, para isso foram realizadas extrações de DNA através do método de CTAB (Romano, 1998), um disco foliar foi

retirado com o auxílio de um microtubo de centrifuga de 1,5 mL e macerado em 400 µL de solução CTAB [CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM com PVP 1% (p/v)] e incubado por 30 minutos a 65 °C. Em seguida foram adicionados 400 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 5 minutos a 13000 RPM. A fase aquosa (superior) foi coletada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 280 µL de álcool isopropílico e centrifugado novamente por 5 minutos a 13000 RPM; o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 70% (v/v). O pellet foi seco à temperatura ambiente e diluído em 20 µL de H₂O.

Com o DNA extraído a técnica de PCR foi feita com os primers para os genes BAR 90 + BAR 536c = 447 pb e int6C3H12F +TNOSR = 784 pb. Para a amplificação foi realizado um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 72 °C por 5 minutos.

2.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo realizado ao menos duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância ($p \leq 0.05$). Para as análises utilizou-se o programa de análises estatísticas R (R Development Core Team, 2019), com os pacotes ExpDes (FERREIRA et al., 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições experimentais foram utilizados 40 microcalos para o tratamento 1 (T1), 40 microcalos para o tratamento 2 (T2), 40 microcalos para o controle positivo (CP) e 40 microcalos para o controle negativo (CN), totalizando 160 microcalos embriogênicos para o experimento de transformação genética mediado por biobalística. Todos os microcalos utilizados apresentavam características semelhantes como, coloração amarelada, aspecto friável e granulares (Fig. 19A-B).

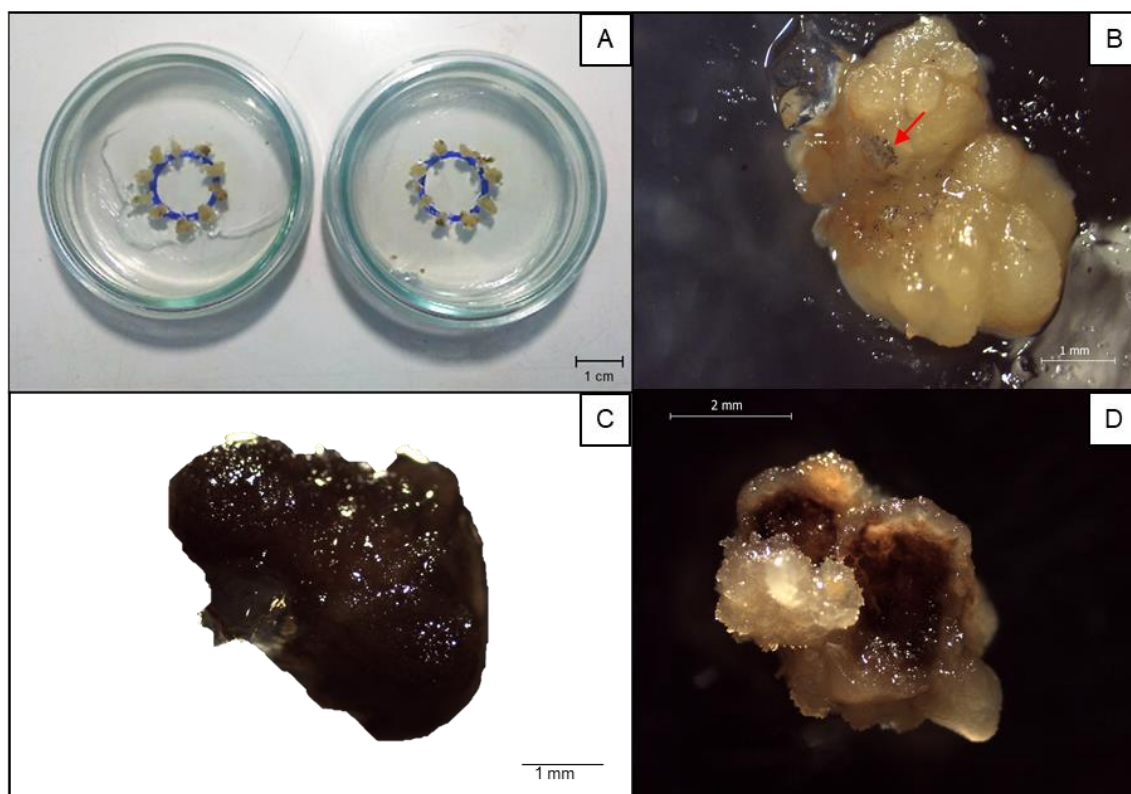


Figura 19. Sequência de eventos da transformação genética via biobalística: A – Disposição dos microcalos em placas de Petri (60 x 15 mm) para o bombardeamento de partículas, evitando a área de morte pelo excesso de micropartículas projetadas no centro da placa. B – Caracterização dos microcalos bombardeados; seta indica a presença das partículas após o bombardeamento. C – Caracterização da oxidação severa dos microcalos do controle positivo (CP), na presença da seleção em glufosinato de amônia. D – Microcalo friável após 90 dias do bombardeamento, em meio de seleção, apresentando características de multiplicação celular, com novo aglomerado de massa celular sobressaindo a região oxidada.

Após 30 dias do bombardeamento, em meio de multiplicação com a adição do agente seletivo glufosinato de amônio (4 mg.L^{-1}), foi possível observar oxidação severa nos calos (Fig. 19C), principalmente do controle positivo, além de moderada em alguns

calos dos tratamentos T1 e T2. Esses resultados são evidenciados também em Nurfahisza et al (2016), onde os resultados mostraram que os calos embriogênicos eram mais sensíveis aos agentes de seleção em relação aos embrióides.

Aos 90 dias, os microcalos, mesmo com regiões oxidadas, apresentaram crescimento de novas estruturas nodulares, mantendo o aspecto embriogênico, semelhante àqueles inicialmente utilizados para os experimentos, evidenciando, assim, o desenvolvimento e a multiplicação celular desse material (Fig. 19D).

Após 120 dias em meio de multiplicação com $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de glufosinato de amônio, os microcalos foram avaliados quanto a porcentagem de contaminação, oxidação e sobrevivência (Fig. 20). Em relação a porcentagem de contaminação, o tratamento T1 não apresentou nenhuma contaminação nesse período, já o tratamento T2 e os controles (CP e CN) tiveram taxas de contaminação que não diferiram estatisticamente entre si, apresentando valores entre 25% a 37,5% de contaminação.

Ainda em relação à oxidação, verificou-se que o controle positivo (não transformado) apresentou 100% de oxidação, sendo observado tal comportamento dos calos desde os primeiros 30 dias após o bombardeamento. Isso pode ter ocorrido pelo estresse durante a execução do experimento e pelo o agente seletivo, a concentração do herbicida (4 mg.L^{-1}) acarretou nessa oxidação severa. Já o controle negativo e os tratamentos T1 e T2 apresentaram menores valores de oxidação (18,75%, 34,75 e 50% respectivamente) (Fig. 20). Possivelmente, alguns grupos de células incorporaram o gene que confere a resistência ao herbicida, o que explica esses valores não diferirem do controle negativo.

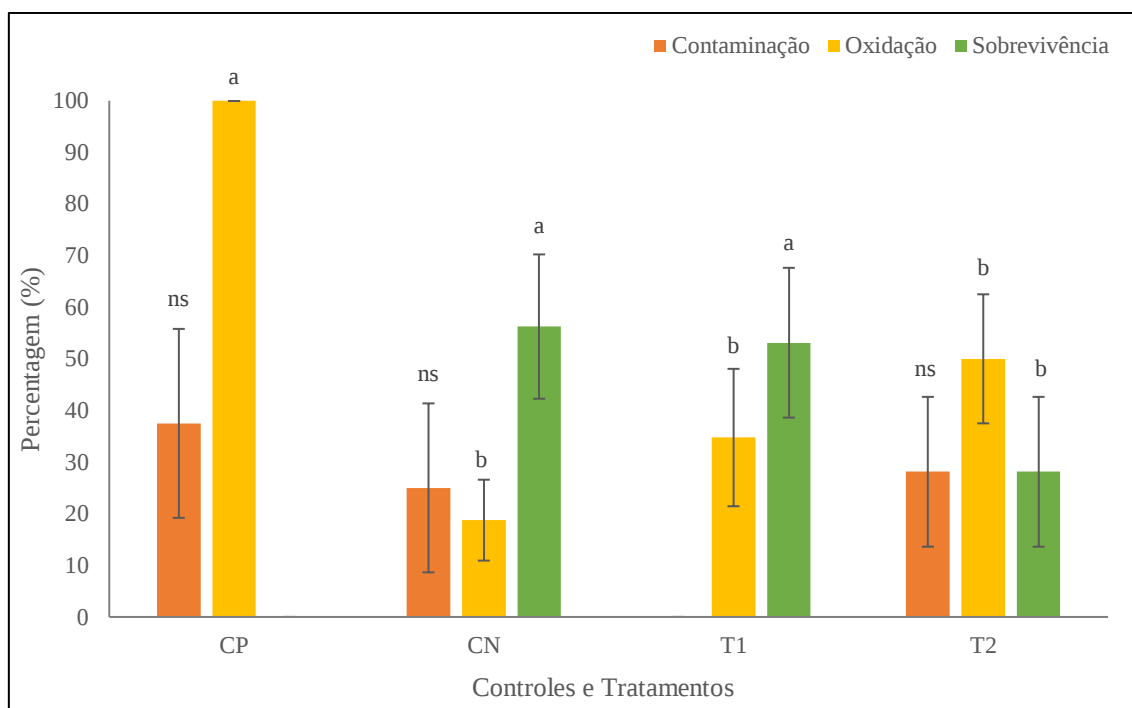


Figura 20. Resposta morfogênica dos microcalos nos diferentes tratamentos, após 120 dias em meio de multiplicação na presença de glufosinato de amônio. Valores médios da porcentagem de contaminação, oxidação e sobrevivência. CP - Controle Positivo (microcalos bombardeados com as partículas de tungstênio em água e cultivados em meio com o agente de seleção glufosinato de amônio); CN - Controle Negativo (microcalos não bombardeados e cultivados sem a presença do glufosinato de amônio); T1 - Tratamento 1 (microcalos que receberam um tiro); T2 - Tratamento 2 (microcalos que receberam 2 tiros). Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott 5% de significância ($p \leq 0.05$). ns - Não significativo.

Essa alta taxa de oxidação presente no controle positivo (CP), evidencia que o material não possuía nenhuma resistência ao herbicida glufosinato de amônio, uma vez que ele passou pelo processo de bombardeamento apenas com partículas de tungstênio em água. Ressalte-se, porém, que estes microcalos podem terem sofrido ferimentos com o bombardeamento, sugerindo também toxicidade para as células do calo, uma reação já conhecida e descrita na literatura (RUSSELL et al., 1992), e no caso observado, acredita-se ser a junção dos dois fatores, tanto o bombardeamento, quanto à pressão de seleção.

Corroborando a isso, Zang e colaboradores (2009), afirmam que diferentes tecidos têm sensibilidade diferente para um dado agente de seleção, isso pode ter comprometido a seleção rigorosa em diferentes estágios de desenvolvimento. No estudo em questão,

ficou evidenciado durante a pressão de seleção na multiplicação dos microcalos e diferenciação dos embriões somáticos durante o processo de transformação, demonstrado por essas altas taxas de oxidação.

Quanto a porcentagem sobrevivência, alguns microcalos mantiveram suas características embriogênicas e conseguiram multiplicar sua massa e até seguir para o estágio de diferenciação dando origem a embriões globulares e posteriormente torpedos (Fig. 19D). O controle negativo apresentou uma taxa de sobrevivência de 56,2% e o tratamento T1 53,1%, valores que não diferiram entre si. Já o tratamento T2 apresentou taxa de sobrevivência de 28,1%, indicando o menor valor que os demais tratamentos, com exceção ao tratamento referente ao controle positivo o qual não apresentou sobrevivência de microcalos, corroborando com a hipótese de que o bombardeamento duas vezes seguidas, pode ter provocado maiores danos às células dos microcalos (Fig. 20).

Ao final da etapa de multiplicação, os microcalos foram então cultivados em meios de diferenciação. Após 120 dias em meio de diferenciação, os calos embriogênicos começaram a apresentar formações de embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 21). Pode-se observar que os calos do controle negativo (CN) apresentaram formação significativa de embriões somáticos do tipo torpedo, ao passo que essa característica já não se fez tão presente nos tratamentos que passaram pelo processo de transformação, onde observou-se maior demora no aparecimento dos embriões somáticos quando comparado ao tratamento acima descrito, muitas vezes sobressaindo a massa calogênica também oxidada (Figura 21).



Figura 21. Aspectos morfológicos dos embriões somáticos durante a etapa de diferenciação após o bombardeamento de partículas e sob pressão de seleção do herbicida GA (4,0 mg. L⁻¹). A – Embriões somáticos dos tipos globulares e torpedos do controle negativo (CN). B – Presença de massa de calo embriogênico e embriões do tipo globulares presentes no Tratamento 1 (T1). C – Massa de calo embriogênico bastante oxidada no Tratamento 2 (T2), com presença de embrião do tipo torpedo.

Quando se avaliou as porcentagens de formação de embriões somáticos e a de oxidação, verificou-se que o controle negativo (CN) foi o que apresentou a maior taxa de formação de embriões somáticos, com cerca de 47,5% dos calos apresentando tais formações. Já os tratamentos T1 e T2 tiveram valores menores de formação de calos com embriões somáticos, verificando-se valores de 12,5% e 20% que não diferiram estatisticamente entre si. Quanto a oxidação desse material, durante a fase de diferenciação, apenas o controle negativo (CN) teve a menor taxa de oxidação 52,5%, enquanto os demais tratamentos, assim como, o controle positivo apresentaram os maiores valores, entre 82,5% a 100% de oxidação (Fig. 22).

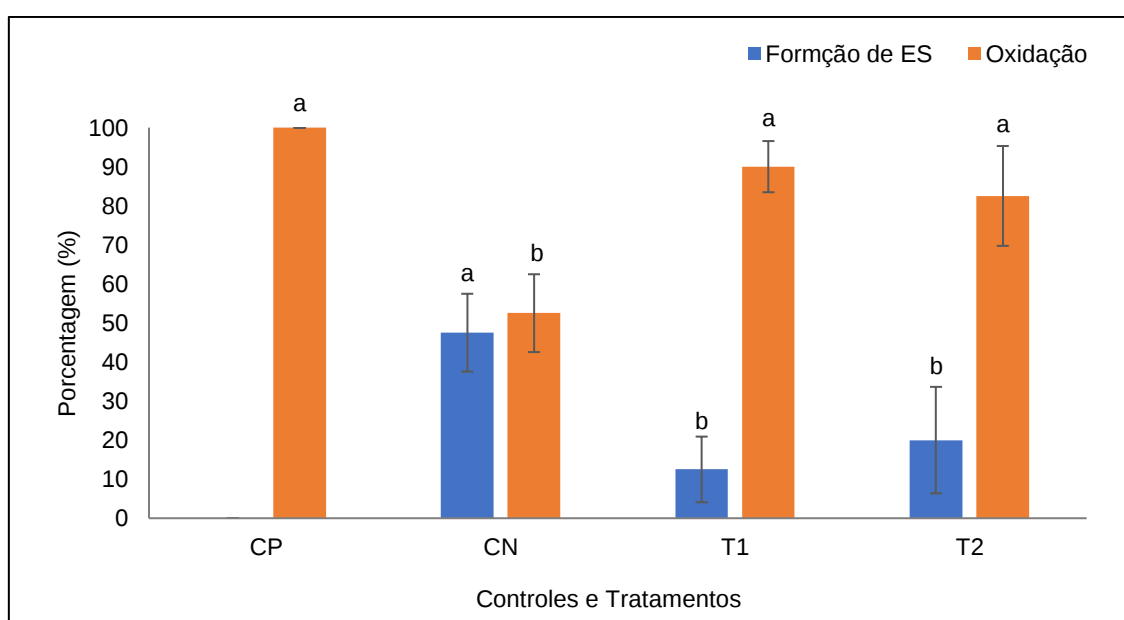


Figura 22. Avaliação dos tratamentos em meio de diferenciação com o agente de seleção glufosinato de amônio, após 120 dias de cultivo. Valores médios da porcentagem de formação de embriões somáticos e oxidação. CP - Controle Positivo; CN - Controle Negativo; T1 - Tratamento 1 e T2 - Tratamento 2. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott 5% de significância ($p \leq 0.05$).

Os embriões somáticos diferenciados foram transferidos para tubos de ensaio, contendo meio de regeneração, sem adição do glufosinato de amônio, por ser um momento crucial durante a germinação desses embriões, para prosseguirem com o desenvolvimento (Fig. 23). Nestas condições, com o passar do tempo observou-se, além do desenvolvimento dos embriões somáticos primários, também o surgimento de novos embriões somáticos, chamados comumente de embriões secundários. Após 120 dias de

cultivo foi analisado o número de plantas regeneradas por tratamento e a identificação dos prováveis transgenes por imunocromatografia de fluxo lateral.

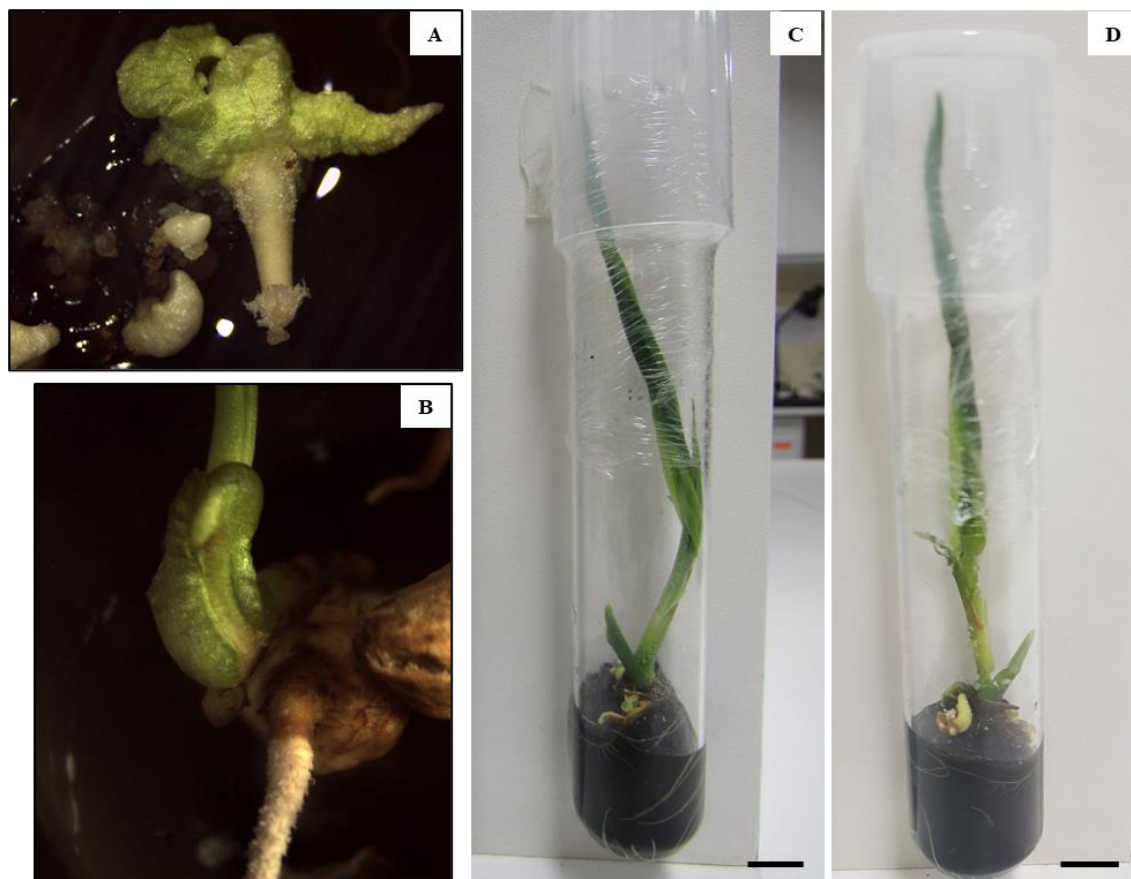


Figura 23. Regeneração das plantas de óleo de palma que passaram por ensaio de transformação genética. A – Planta ainda em processo de regeneração já clorofilada e presença de embriões somáticos torpedos. B – Planta em regeneração com raiz e parte aérea bem desenvolvida. C – Planta regenerada completa, com raiz e parte área presente. D – Planta completa regenerada e apresentando embriogênese secundária.

Durante a análise foi possível observar que plantas originárias do controle negativo (CN), bem como as do tratamento T2, não diferiram estatisticamente, apresentando valores médios de 38 e 23 embriões somáticos do tipo torpedo (Fig. 24). Tal resultado demonstra esse comportamento também para o número de plantas regeneradas, em média 26 para o controle negativo e 21 para o tratamento 2 (T2). Já no tratamento 1 foi onde se observou os menores valores médios para plantas regeneradas, verificando-se apenas 9 embriões somáticos do tipo torpedo e regeneração de 4 plantas.

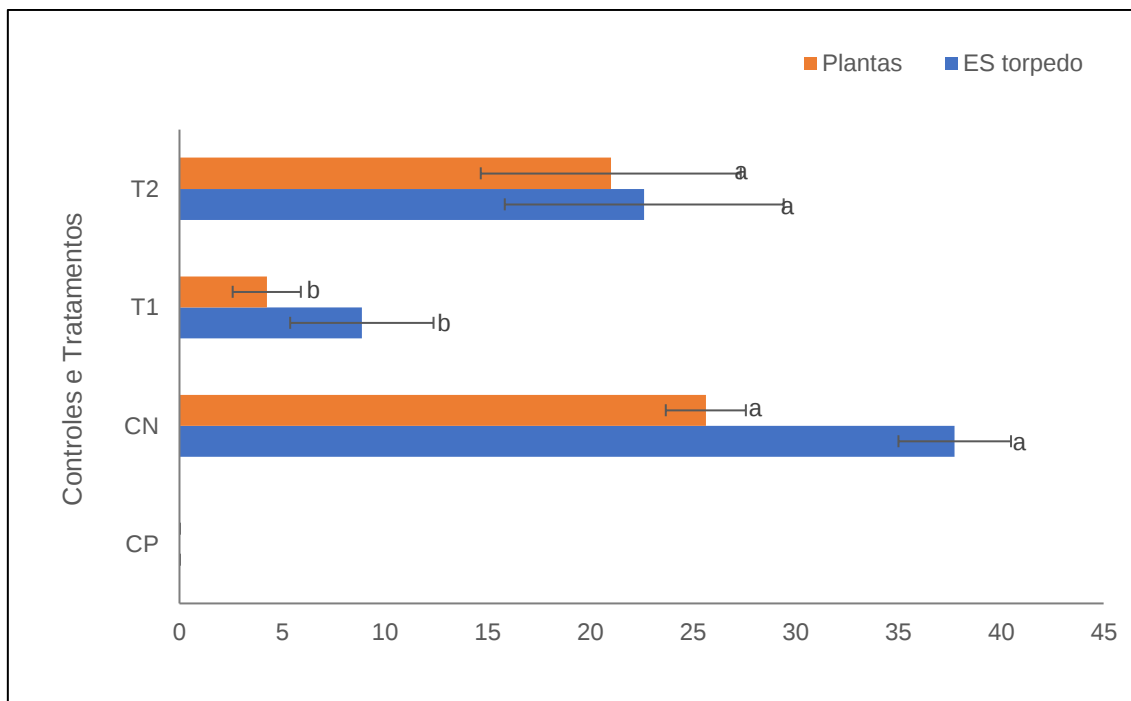


Figura 24. Quantitativo médio de embriões somáticos do tipo torpedo e de plantas regeneradas por tratamento e seus controles. CP - Controle Positivo; CN - Controle Negativo; T1 - Tratamento 1 e T2 - Tratamento 2. Os dados representam as médias seguidas dos erros padrões. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott 5% de significância ($p \leq 0.05$).

No teste de identificação indireta das plantas transformadas, realizado pelo método imunocromatográfico de tiras de fluxo lateral (“Lateral Flow Strip”), Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.), específica para detecção da proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT), não foi possível observar nenhum evento de transformação (Fig. 25).



Figura 25. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral, com amostras de ambos os tratamentos (T1 e T2), com duas amostras de cada, evidenciando a não detecção da proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT).

Outro método para confirmar se houve ou não a transformação, foi por meio da PCR (Fig. 26), na qual não foi possível observar também nenhum evento de transformação, esse teste foi realizado ao menos duas vezes. Todas as plantas regeneradas foram derivadas de calos embriogênicos que foram selecionados no herbicida glufosinato de amônio (4 mg.L^{-1}) até a etapa de diferenciação, após serem bombardeados com o plasmídeo portador do gene *bar*. Portanto, a amplificação do gene *bar* foi usada para verificar os transformantes, usando os primers do gene *bar*, esperava-se uma amplificação de 447 pb.

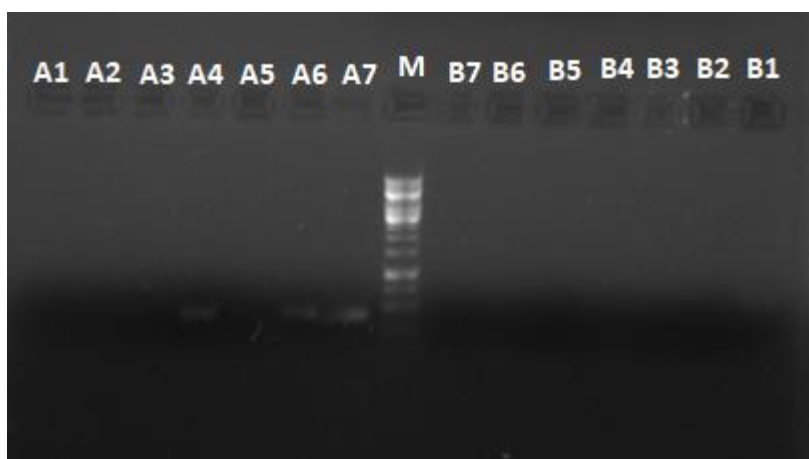


Figura 26. Análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) no DNA das plantas regeneradas, usando primers para o gene *bar* $90 + \text{bar } 536c = 447 \text{ pb}$ (A1 a A7) e $\text{int6C3H12F} + \text{TNOSR} = 784 \text{ pb}$ (B1 a B7), amostras 1 e 2 tratamento 1 (T1) e de 3 a 7 tratamento 2 (T2); M = marcador.

Estudos anteriores mostram uma baixa eficiência na transformação genética de palma de óleo, a qual varia entre 0,7–1,5%. Esses resultados são observados em protocolos mediados por *Agrobacterium* e biobalística utilizando calos embriogênicos e regeneração de plantas por embriogênese somática indireta (PARVEEZ et al., 1998; MASLI et al., 2012; DAYANG IZAWATI et al., 2015).

Para o sucesso da produção de plantas transformadas, depende principalmente da integração estável do DNA exógeno no genoma do hospedeiro (transformação estável) e regeneração da planta inteira, parte aérea e sistema radicular desenvolvidos. Contudo, esses dois processos são independentes, mas ocorrem simultaneamente e são vitais para a produção das plantas transgênicas. Além disso, os transgenes introduzidos são integrados em locais aleatórios no genoma da planta hospedeira (Yarra et al., 2019).

Segundo Massani e colaborados (2018), a transformação genética mediado pelo bombardeamento de partículas em palma de óleo, depende de diversos fatores, principalmente fatores físicos e biológicos, que afetam a eficiência da integração do DNA. No caso de fatores físicos, como: pressão de aceleração do hélio, distância do bombardeio, pressão de vácuo da câmara, tamanho do microtransportador, quantidade de DNA, número de bombardeios, entre outros, são alguns dos fatores que devem ser otimizados para a transformação eficiente em palma de óleo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo de transformação utilizado não foi eficiente para gerar plantas geneticamente transformadas do genótipo de palma de óleo utilizado (híbrido interespecífico – B351733), no entanto, foi possível observar uma consistência de resposta do genótipo em relação aos tratamentos testados. O controle positivo apresentou elevada oxidação e não houve obtenção de embriões diferenciados na presença do agente seletivo, isto indica que a pressão de seleção ou a concentração de herbicida utilizado para selecionar células transformadas foi adequado para inviabilizar a divisão celular nos microcalos na presença do herbicida, por isso não houve escapes. Dessa forma, a pressão de seleção do glufosinato de amônio no genótipo testado foi otimizada.

O controle negativo respondeu à multiplicação e à diferenciação de ES, indicando um elevado potencial de sobrevivência e regeneração desse genótipo para transformação genética. O tratamento 1 respondeu semelhante ao controle negativo, indicando uma elevada resposta morfogênica mesmo sob pressão de seleção; e o tratamento 2 mostrou um aumento na oxidação, sendo consistente em relação ao aumento do estresse causado

por dois tiros no bombardeamento, o que era esperado. A conversão de ES em plantas ou germinação dos ES seguiu também a mesma dinâmica, indicando que o genótipo é muito apto à conversão e por tal, a ser utilizado para transformação genética. O fato de retirar o GA durante a fase de germinação, pode ter favorecido o fato de as plantas obtida não serem geneticamente modificadas.

Nossos resultados sugerem que seja realizado uma otimização de protocolos de transformação, com enfoque na pressão de seleção, principalmente na etapa final, durante a germinação e a regeneração das plantas. Além disso, verificar por meio da PCR a pressão de seleção em cada etapa do desenvolvimento. Outra ferramenta importante a ser utilizada é a técnica CRISPR/Cas9, que pode desempenhar um papel fundamental no direcionamento das transformações genéticas em palma de óleo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTPETER, F., SPRINGER, N. M., BARTLEY, L. E., BLECHL, A. E., BRUTNELL, T. P., CITOVSKY, V., STEWART Jr, C. N. Advancing crop transformation in the era of genome editing. **The Plant Cell**, v. 28, n. 7, p. 1510-1520, 2016.

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 1, p. 142-150, 1996.

ARAGAO, F. J.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. M.; RECH, E. L. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. **Crop Science**, v. 42, n. 4, p. 1298-1302, 2002.

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. D. A., CUNHA, R. N., LOPES, R., MOTOIKE, S. Y., BABIYCHUK, E., KUSHNIR, S. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 190, 2015.

CHAVES, G., LIGARRETO-MORENO, G. A.; CAYON-SALINAS, D. G. Physicochemical characterization of bunches from American oil palm (*Elaeis oleifera* HBK Cortes) and their hybrids with African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Acta Agronómica**, v.67, 2018.

CHILTON, M. D., DRUMMOND, M. H., MERLO, D. J., SCIAKY, D., MONTROYA, A. L., GORDON, M. P., NESTER, E. W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, v. 11, n. 2, p. 263-271, 1977.

DAYANG IZAWATI, A. M.; ABDUL MASANI, M. Y.; ISMAIL, I.; GHULAM KADIR, A. P. Evaluation on the effectiveness of 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase (DOGR1) gene as a selectable marker for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryogenic calli transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 727, 2015.

FAOSTAT—CROPS, F. A. O. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data.QC> (accessed on 20 March 2020), 2020.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental Designs: um pacote r para análise de experimentos (pp. 1-9). **Revista da Estatística da Universidade Federal de Ouro Preto**, v. 1, n. 1, 2011.

FRÓNA, Dániel; SZENDERÁK, János; HARANGI-RÁKOS, Mónika. The challenge of feeding the world. *Sustainability*, v. 11, n. 20, p. 5816, 2019.

GUO, Q.; LIU, Q.; A SMITH, N.; LIANG, G.; WANG, M. B. RNA silencing in plants: mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. **Current Genomics**, v. 17, n. 6, p. 476-489, 2016.

HORMAZA, P.; FUQUEN, E. M.; ROMERO, H. M. Phenology of the oil palm interspecific hybrid *Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 4, p. 275-280, 2012.

JAGTAP, U. B.; GURAV, R. G.; BAPAT, V. A. Role of RNA interference in plant improvement. **Naturwissenschaften**, v. 98, n. 6, p. 473-492, 2011.

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.

LEE, F. C.; ONG-ABDULLAH, M.; OOI, S. E.; HO, C. L.; NAMASIVAYAM, P. Cloning and characterization of Somatic Embryogenesis Receptor Kinase I (EgSERK I) and its association with callus initiation in oil palm. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, n. 2, p. 153-164, 2019.

LOPES, R.; CUNHA, R.N.V.; RESENDE, M.D.V. Produção de cachos e parâmetros genéticos de híbridos de caiaué com dendê. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.10, p.1496-1503, 2012.

MASANI, M. Y. A.; IZAWATI, A. M. D.; RASID, O. A.; PARVEEZ, G. K. A. Biotechnology of oil palm: Current status of oil palm genetic transformation. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 15, p. 335-347, 2018.

MASLI, DAYANG IZAWATI Abang; PARVEEZ, Ghulam Kadir Ahmad; ISMAIL, ISMANIZAN. Optimisation of 2-deoxyglucose concentration for identifying the sensitivity level for oil palm embryogenic calli. **J. Oil Palm Res**, v. 24, p. 1296-1302, 2012.

MIELKE, T. World markets for vegetable oils: status and prospects. Encyclopedia of sustainability science and technology. New York: Springer, p. 989-1, 2017.

MUNIRAN, F., J.B. SUBHASH and H.S. FARIDA: Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. 'Dura': Comparison of three basal media for efficient regeneration. **Indian. J. Exp. Biol.**, 46, 79-82. 2008.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURAI, N., KEMP, J. D., SUTTON, D. W., MURRAY, M. G., SLIGHTOM, J. L., MERLO, D. J., HALL, T. C. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. **Science**, v. 222, n. 4623, p. 476-482, 1983.

NURFAHISZA, A. R., RAFIQA, M. A., PARVEEZ, G. K. A., & RASID, O. A. Comparison of the effectiveness of Basta, bialaphos and glufosinate ammonium for selecting transformed oil palm tissues. **J. Oil Palm Res**, v. 28, p. 247-255, 2016.

OKULEY, John et al. Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. **The Plant Cell**, v. 6, n. 1, p. 147-158, 1994.

PARVEEZ, Ghulam Kadir A.; CHOWDHURY, M. K. U.; SALEH, Norihan M. Biological parameters affecting transient GUS gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryogenic calli via microprojectile bombardment. **Industrial Crops and Products**, v. 8, n. 1, p. 17-27, 1998.

PARVEEZ, Ghulam Kadir Ahmad et al. Biotechnology of oil palm: strategies towards manipulation of lipid content and composition. **Plant cell reports**, v. 34, n. 4, p. 533-543, 2015.

PUNJABI, Mansi et al. Molecular characterization, modeling, and docking analysis of late phytic acid biosynthesis pathway gene, inositol polyphosphate 6-/3-/5-kinase, a potential candidate for developing low phytate crops. 3 **Biotech**, v. 8, n. 8, p. 1-20, 2018.

RIYADI, I. et al. Embryogenic callus initiation from leaf explants of *Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis* (OxG) hybrids. In: IOP **Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2018. p. 012009.

RUSSELL, Julie A.; ROY, Mihir K.; SANFORD, John C. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. **Plant Physiology**, v. 98, n. 3, p. 1050-1056, 1992.

SAMBROOK, Joseph. Molecular cloning: a laboratory manual. Synthetic oligonucleotides, 1989.

SCHLUETER, Jessica A. et al. The FAD2 gene family of soybean: insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. **Crop Science**, v. 47, p. S-14-S-26, 2007.

SOH, Aik Chin; MAYES, Sean; ROBERTS, Jeremy. Introduction to the oil palm crop. In: **Oil Palm Breeding**. CRC Press, 2017. p. 1-6.

VOYTAS, D. F.; GAO, C. Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. **PLoS biology**, v. 12, n. 6, p. e1001877, 2014.

WECKX, Sylvie; INZÉ, Dirk; MAENE, Ludo. Tissue culture of oil palm: Finding the balance between mass propagation and somaclonal variation. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 722, 2019.

YARRA, R., JIN, L., ZHAO, Z., & CAO, H. Progress in tissue culture and genetic transformation of oil palm: an overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5353, 2019.

ZAPLIN, Ella Simone et al. Production of high oleic rice grains by suppressing the expression of the OsFAD2-1 gene. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 10, p. 996-1004, 2013.

ZANG, N; ZHAI, H; GAO, S; CHEN, W; HE, S and LIU, Q (2009). Efficient production of transgenic plants using the bar gene for herbicide resistance in sweet potato. **Scientia Horticulturae**, 122(4): 649-653.

ZHOU, Man; LUO, Hong. MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering. **Plant molecular biology**, v. 83, n. 1, p. 59-75, 2013.