



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Clonagem de genitores pisifera e proteômica diferencial durante a  
aquisição de competência embriogênica em palma de óleo**  
(*Elaeis guineensis* Jacq.)

Raphael Ferreira Almeida

Brasília, DF  
Fevereiro/2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Raphael Ferreira Almeida

**Clonagem de genitores pisifera e proteômica diferencial durante a  
aquisição de competência embriogênica em palma de óleo**  
(*Elaeis guineensis* Jacq.)

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica da Universidade de Brasília,  
como requisito para obtenção do título  
de Doutor em Botânica

**Orientador:** Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira  
**Co-Orientador:** Dra. Angela Mehta

Brasília, DF  
Fevereiro/2017

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia em todos os momentos e me proporciona boa índole, humildade, paciência e amor ao próximo.

Aos meus pais Antônio e Vera por acreditarem e fazerem parte da minha história, ajudando e incentivando a vencer cada obstáculo nessa longa jornada; mais uma vez, o meu muito obrigado. Amo vocês.

Ao meu irmão Wesley pelos momentos de risos e pelos sobrinhos lindos: Yan Felipe, Ana Luiza e Pedro Lucas, que me alegravam nos momentos mais tensos.

À minha namorada Aldeni Silva de Lima pelo companheirismo e paciência incondicionais até os momentos finais deste trabalho. Obrigado por fazer parte dessa história.

À Universidade de Brasília, em especial aos professores do Departamento de Botânica pelo apoio e conhecimento disponibilizado ao longo das disciplinas.

Aos funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que de alguma forma colaboraram com a infraestrutura necessária. Agradeço especialmente, ao técnico do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II, André Xavier, pelos ensinamentos e auxílio durante a execução dos experimentos; e à Dra. Priscila Grynberg, sem a qual não teria conseguido executar toda a parte de bioinformática para complementar este trabalho. Obrigado pelo ensinamento e paciência para comigo.

À Universidade Católica de Brasília pela infraestrutura disponibilizada, onde as análises de espectrometria de massas foram realizadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos pesquisadores e orientadores Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira e Dra. Angela Mehta, por acreditarem no meu trabalho, pelos vários momentos de diálogo, pela paciência e, principalmente, incentivo, muito obrigado. O meu crescimento é fruto do apoio de vocês.

Aos companheiros dos laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais II e Genômica e Proteômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que de alguma forma, contribuíram com o resultado final deste trabalho. Agradeço em especial ao amigo doutorando Filipe Sathler Meira, por ter me auxiliado nos momentos finais do trabalho, sem medir esforços. Ao futuro botânico Ivonaldo Reis, pelos momentos de descontração e trabalho em equipe, muito obrigado.

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

*Aos meus pais,  
motivo da minha pessoa e minhas conquistas, dedico.*

## Sumário

|   |     |
|---|-----|
| Índice de Figuras e Tabelas .....   | vi  |
| Resumo Geral .....  | x   |
| Abstract.....   | xii |
| 1 – Introdução geral .....  | 1   |
| 2 – Revisão de literatura .....   | 4   |
| 2.1 – Aspectos gerais do dendezeiro ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) .....   | 4   |
| 2.2 – Embriogênese somática .....   | 1   |
| 2.3 – Análise morfo-anatômica.....  | 4   |
| 2.4 – Proteômica: Eletroforese bidimensional (2-DE).....  | 5   |
| Capítulo I.....   | 8   |
| Embriogênese somática de genitores pisifera ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. var. <i>pisifera</i> ) a partir de explantes foliares de plantas adultas ..... | 8   |
| Resumo .....  | 8   |
| Abstract.....   | 10  |
| 1 – Introdução.....   | 12  |
| 2 – Material e métodos .....  | 15  |
| 2.1 – Indução de calos.....   | 16  |
| 2.1.1 – Coleta de dados durante a indução de calos .....  | 17  |
| 2.2 – Multiplicação de calos .....  | 18  |
| 2.3 – Diferenciação de embriões somáticos.....  | 19  |
| 2.4 – Regeneração de embriões somáticos .....   | 19  |
| 2.5 – Análise de dados .....  | 20  |
| 2.6 – Análises morfo-anatômicas e histoquímicas.....  | 20  |
| 3 – Resultados e discussão .....  | 21  |
| 3.1 – Indução de calos.....   | 21  |
| 3.1.1 – Coleta de dados durante a indução de calos .....  | 23  |
| 3.2 – Multiplicação de calos .....  | 26  |
| 3.3 – Diferenciação e regeneração de embriões somáticos.....  | 28  |
| 3.4 – Análises morfo-anatômicas e histoquímicas.....  | 30  |
| 3.4.1 – Indução de calos .....  | 30  |
| 3.4.2 – Multiplicação de calos.....   | 33  |
| 3.4.3 – Diferenciação de calos .....  | 34  |
| 3.4.4 – Regeneração de embriões somáticos.....  | 37  |
| 4 – Conclusões.....   | 41  |

|  |    |
|--|----|
| <i>Capítulo II</i> .....   | 42 |
| Análise proteômica durante a aquisição de competência embriogênica em explantes foliares de dendezeiros ( <i>Elaeis guineensis</i> Jaq. var. <i>tenera</i> ) com respostas contrastantes ao processo ..... | 42 |
| Resumo .....   | 42 |
| Abstract.....  | 44 |
| 1 – Introdução.....  | 46 |
| 2 – Material e métodos .....   | 47 |
| 2.1 – Material vegetal e condições de cultivo.....   | 47 |
| 2.2 – Análise proteômica .....   | 48 |
| 2.2.1 – Extração de proteínas, quantificação e SDS-PAGE.....   | 48 |
| 2.2.2 – Eletroforese bidimensional (2-DE) .....  | 49 |
| 2.2.3 – Análise de imagem .....  | 50 |
| 2.2.4 – Digestão das proteínas e análise por espectrometria de massa .....   | 50 |
| 2.3 – Anotação funcional – GO (Ontologia Gênica) .....   | 51 |
| 3 – Resultados e Discussão.....  | 51 |
| 3.1 – Análise proteômica .....   | 51 |
| 3.2 – Anotação funcional – GO (Ontologia Gênica) .....   | 66 |
| 3.2.1 – Proteínas envolvidas com resposta ao estresse .....  | 68 |
| 3.2.2 – Processamento de proteínas .....   | 70 |
| 3.2.3 – Metabolismo energético .....   | 71 |
| 3.2.4 – Desenvolvimento.....   | 72 |
| 4 – Conclusões.....  | 74 |
| Referências bibliográficas .....   | 75 |

## Índice de Figuras e Tabelas

### Revisão de literatura

**Figura 1.** Genótipo superior de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) apresentando frutificação e crescimento vertical do caule reduzido. **Foto:** Scherwinski-Pereira, J.E., Manaus, AM, 2012 ..... 04

**Figura 2.** Principais países envolvidos no cultivo do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e na produção anual de óleo de palma. Fonte: adaptado de IndexMundi (2016).  
..... 05

**Figura 3.** Consumo mundial de óleos vegetais em 2010/2011. \*Outros óleos incluem o óleo de oliva, palmiste e coco. Fonte: adaptado de Agriculture (2011) – UNITED STATES OF AGRICULTURE. The oilseeds group. **World markets and trade 2001-2011.** Washington: USDA, 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>>. Acesso em 19 dez 2016. .... 06

**Figura 4.** Frutos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.) apresentando diferenças quanto à espessura e presença ou ausência do endocarpo, de acordo com a variedade. **A-** *E. guineensis* var. *dura*; **B-** *E. guineensis* var. *pisifera*; **C-** *E. guineensis* var. *tenera*. **Foto:** Scherwinski-Pereira, J.E., Manaus, AM, 2012..... 07

**Capítulo I** – Embriogênese somática de genitores *pisifera* (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*) a partir de explantes foliares de plantas adultas

**Figura 1.** Aspecto geral de um dos quatro palmitos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*) e as regiões utilizadas para o cultivo *in vitro*. \* Região basal não foi utilizada. .... 15

**Figura 2.** Etapas do estabelecimento *in vitro* de folhas aclorofiladas de genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*) para a indução da embriogênese somática. **A** – Palmitos de genótipos de dendezeiro recebidos em laboratório; **B** – eliminação da região basal fibrosa dos palmitos; **C** – aspersão de álcool 70% no palmito, antes de sua manipulação em câmara de fluxo laminar; **D** – material em condições de câmara de fluxo laminar submerso nas soluções de álcool 70% (3 min.) e hipoclorito de sódio 2,5% de cloro ativo (20 min.), respectivamente; **E** – enxágue do material com água destilada e autoclavada; **F** – folhas aclorofiladas sendo separadas e excisadas em explantes de tamanho de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>; e **G** – explantes foliares em número de seis por placa de petri inoculados em meio de cultura para indução da embriogênese somática. Barras: 8 cm. .... 16

**Figura 3.** Caracterização dos níveis de oxidação e da posição e intensidade de formação dos calos nos explantes foliares do genótipo A251424 de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*). **A-** oxidação com nota 1 (inicial); **B-** oxidação com nota 3 (parcial); **C-** oxidação com nota 5 (total); **D-** produção de calos nota 1 (baixa formação de calo em um dos lados do explante e numa única região); **E-** produção de calos nota 3 (média formação de calos distribuídos num dos lados do explante em mais de uma região); e **F-**



produção de calos nota 5 (alta formação de calos distribuídos por todo o explante)..... 18

**Figura 4.** Formação de calos primários (setas brancas) em explantes foliares de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) aos 180 dias de cultivo. **A-** genótipo A251424; **B-** genótipo A251427; **C-** genótipo A251512; e **D-** genótipo A251513..... 22

**Figura 5.** Incremento de biomassa fresca em função do peso inicial de calos representado por intervalos de classe para os calos do genótipo A251424 em dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*), após 90 dias de cultivo em meio de multiplicação. Médias seguidas por letras distintas  $\pm$  erro padrão, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ )..... 27

**Figura 6.** Diferenciação e regeneração de embriões somáticos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) ao longo do tempo de cultivo em meios de diferenciação e regeneração. **A:** calos nodulares amarelados em meio de multiplicação, após 90 dias; **B - C:** calos embriogênicos e embrião somático torpedo (seta branca) em início de desenvolvimento, respectivamente, a partir de calos nodulares amarelados submetidos ao meio de diferenciação por 90 dias; **D - H:** desenvolvimento do embrião somático (seta branca) aos 30, 71, 90, 113 e 130 dias, e surgimento de novos embriões (\*) em meio de diferenciação; **I - L:** desenvolvimento de embriões somáticos aos 150, 163, 177 e 192 dias em meio de regeneração e início do esverdeamento dos primeiros embriões somáticos (estrela branca), indicando início da regeneração..... 29

**Figura 7.** Caracterização morfo-anatômica e histoquímica dos diferentes tipos de calos observados durante a indução da embriogênese somática em dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) aos 180 dias de cultivo. **A:** calo alongado; **B:** nodular branco; **C:** nodular amarelado; **D:** calo esponjoso; **E - H:** corte transversal dos quatro tipos de calos corados com azul de toluidina mostrando regiões meristemáticas e células vacuoladas; **I - L:** visualização de células com características meristemáticas (setas pretas indicam núcleos evidentes); **M - P:** células da zona meristemática coradas com XP (setas pretas indicando núcleos); **Q:** células com núcleo evidente (seta preta) coradas com lugol e ausência de amido, e; **R - T:** visualização de grãos de amido (setas brancas) nas células meristemáticas e parenquimáticas. **Ca:** calo alongado; **nb:** calo nodular branco; **na:** calo nodular amarelado; **ce:** calo esponjoso; **ex:** explante; **cv:** células vacuoladas; **zm:** zona meristemática..... 32

**Figura 8.** Caracterização morfo-anatômica e histoquímica de calos nodulares amarelados de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*), coletados após 90 dias em meio de multiplicação. **A:** calo nodular amarelado; **B:** Visão geral do calo nodular amarelado corado com Azul de Toluidina; **C:** células parenquimáticas e meristemáticas coradas com Azul de Toluidina; **D:** células parenquimáticas e meristemáticas coradas com Xilidine Ponceau; **E:** células meristemáticas apresentando grãos de amido intensamente corados com Lugol (seta preta); **cn:** calo nodular amarelado; **zm:** zona meristemática; **cp:** células parenquimáticas; **cm:** células meristemáticas. .... 34

**Figura 9.** Caracterização morfo-anatômica e histoquímica de calos embriogênicos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*), coletados após 90 dias em meio de diferenciação. **A:** calo embriogênico; **B:** Visão geral do calo embriogênico corado com

Azul de Toluidina mostrando a localização das células embriogênicas e pró-embriões; **C:** células embriogênicas com parede celular delgada (seta preta) e núcleo em divisão (asterisco); **D:** visão geral de pró-embriões corados com Azul de Toluidina; **E:** pró-embriões com parede celular espessa (setas pretas) e compostos por duas ou mais células embriogênicas (asterisco). **F:** visualização dos grãos de amido (seta preta) distribuídos nas células embriogênicas coradas com Lugol; **G-** pró-embriões com grãos de amido menos evidentes (setas pretas); **H:** ausência de proteínas nas células embriogênicas coradas com Xilidine Ponceau; **I:** pró-embriões contendo proteínas representadas pelas setas pretas; **ce:** calo embriogênico; **pe:** pró-embriões. ....36

**Figura 10.** Caracterização morfo-anatômica e histoquímica do embrião somático de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*), coletado com 180 dias de idade. **A:** Aspecto geral do embrião somático apresentando região distal e região proximal; **B:** Visão geral do embrião somático corado com Azul de Toluidina e apresentando as regiões distal e proximal, onde se encontram o eixo embrionário, o meristema fundamental e as células do procâmbio; **C:** detalhe das células do procâmbio, que são mais alongadas em relação àquelas do meristema fundamental e apresentam núcleo em divisão (asterisco); **D:** células da protoderme justapostas apresentando núcleo e nucléolo evidentes; **E-** ausência de amido nas células do procâmbio (asterisco) e do meristema fundamental (seta preta), ambas coradas com Lugol; **F:** ausência de amido (seta preta) nas células próximas à protoderme; **G:** células do meristema fundamental e procâmbio apresentando reservas proteicas (setas pretas), ambas coradas com Xilidine Ponceau; e **H:** ausência de reservas proteicas nas células da protoderme em relação àquelas do meristema fundamental (seta preta); **rd:** região distal; **rp:** região proximal; **ee:** eixo embrionário; **mf:** meristema fundamental; **pc:** procâmbio; **pd:** protoderme. ....39

**Tabela 1.** Formação de calos e oxidação dos explantes em quatro genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) avaliados em diferentes tempos de cultivo ..... 23

**Tabela 2.** Classificação dos calos em notas (1, 3 e 5\*) quanto à sua posição e intensidade de formação nos explantes foliares dos genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) avaliados nos diferentes tempos de cultivo..... 24

**Tabela 3.** Classificação da oxidação em notas\* (1, 3 e 5), de acordo com a distribuição em explantes foliares de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) avaliados nos diferentes tempos de cultivo. .... 26

**Capítulo II** – Análise proteômica durante a aquisição de competência embriogênica em explantes foliares de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*) com respostas contrastantes ao processo

**Figura 1.** Esquema representativo dos tempos de coleta, obtenção e acondicionamento do macerado das triplicatas biológicas proveniente dos explantes foliares dos híbridos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*), B351733 e B352933, responsivo e não-responsivo à indução da embriogênica somática, respectivamente..... 48

**Figura 2a.** Eletroforese bidimensional (2-DE) para os genótipos B351733 (responsivo à aquisição de competência embriogênica) e B352933 (não-responsivo à aquisição de

competência embriogênica) em dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) comparando a abundância proteica entre os tempos 0 e 14 dias de indução de calos. **Números circulados** indicam spots exclusivos; **linhas vermelhas** indicam localização da abundância de proteínas entre pI 3 a 10; e **retângulo** exemplifica um grupo de proteínas que apresentaram abundância reduzida ao longo do tempo. .... 54

**Figura 2b.** Eletroforese bidimensional (2-DE) para os genótipos B351733 (responsivo à aquisição de competência embriogênica) e B352933 (não-responsivo à aquisição de competência embriogênica) em dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) comparando a abundância proteica entre os tempos 90 e 150 dias de indução de calos. **Números circulados** indicam spots exclusivos; **linhas vermelhas** indicam localização da abundância de proteínas entre pI 3 a 10; e **retângulo** exemplifica um grupo de proteínas que apresentaram abundância reduzida ao longo do tempo ..... 55

**Figura 3.** Comportamento de genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*) submetidos ao meio de indução de calos com picloram 450  $\mu$ M ao longo do tempo. Em 150 dias de indução a formação de calos inicia para o genótipo responsivo. .... 56

**Figura 4.** Processos biológicos e categorias nas quais estão inseridas as proteínas durante a aquisição de competência embriogênica em genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) aos 14 dias de cultivo. Asteriscos (\*) indicam processos que podem apresentar proteínas exclusivas e/ou proteínas que estão aumentadas nos genótipos (ver cor da legenda)..... 67

**Figura 5.** Processos biológicos e categorias nas quais estão inseridas as proteínas durante a aquisição de competência embriogênica em genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) aos 150 dias de cultivo. Asteriscos (\*) indicam processos que podem apresentar proteínas exclusivas e/ou proteínas aumentadas nos genótipos (ver cor da legenda).. ..... 68

**Tabela 1.** Spots diferenciais detectados na comparação entre os genótipos B351733 (responsivo) e B352933 (não-responsivo) de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) ao longo do tempo (T0-T150). .... 52

**Tabela 2.** Proteínas diferencialmente abundantes identificadas por MS e MS/MS nos genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) B351733 e B352933 (responsivo e não-responsivo, respectivamente) aos 14 dias de indução. .... 58

**Tabela 3.** Proteínas diferencialmente abundantes identificadas por MS e MS/MS nos genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) B351733 e B352933 (responsivo e não-responsivo, respectivamente) aos 150 dias de indução. .... 61

**Tabela Suplementar 1.** Ontologia gênica (GO) e categorização geral de proteínas identificadas aos 14 e 150 dias de indução dos genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*). **Vários (\*)** compreendem os spots 301, 333, 334 e 335. .... 89

## Resumo Geral

O presente trabalho objetivou avaliar respostas de genitores *Pisifera* de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) quanto à capacidade de regeneração de plantas por embriogênese somática (ES), além de identificar proteínas envolvidas durante o processo de aquisição de competência embriogênica em híbridos *Tenera* contrastantes para a embriogênese somática. Num primeiro experimento, explantes foliares de quatro genótipos adultos de dendezeiro da variedade *Pisifera* (A251424, A251427, A251512 e A251513) foram submetidos à indução de ES utilizando-se o meio de indução (MI), composto pelos sais e vitaminas de Murashige e Skoog (MS), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glutamina, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 450 µM de Picloram e gelificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de phytigel. O material permaneceu nesta condição por 360 dias, com subcultivos a cada 150 dias. Posteriormente, o material foi transferido para o meio de multiplicação de calos (MM), composto por 40 µM de Picloram, 10 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de phytigel, onde permaneceu por mais 90 dias. Em seguida, os calos foram colocados em meio de diferenciação (MD) formado por 12,3 µM de 2iP, 0,54 µM de ácido naftalenoacético (ANA) e de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de phytigel. Depois de diferenciados, os embriões somáticos foram transferidos para o meio de regeneração, desprovido de reguladores de crescimento e acrescido de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de phytigel e carvão ativado. Durante todo o processo, o material foi avaliado morfo e histoquimicamente para melhor caracterizar as etapas. Num segundo experimento, a proteômica diferencial de dois híbridos *Tenera* var. B351733 (responsivo à ES) e var. B352933 (não-responsivo à ES) foi avaliada durante o processo inicial (14 dias) e tardio (150 dias) da aquisição de competência embriogênica em dendezeiro, etapas caracterizadas pelo início de formação de calo primário e calo embriogênico, respectivamente. As proteínas extraídas foram quantificadas por Bradford e analisadas por eletroforese bidimensional (2-DE). Proteínas consideradas diferenciais pelo programa de análise de imagem Image Master Platinum foram identificadas por espectrometria de massa. A sequência foi obtida no banco NCBI por meio do GI (Gene Identifier) de cada proteína identificada nestes tempos. Com as sequências, adicionalmente foi realizada a anotação funcional destas proteínas nas plataformas AgBase e Revigo, sendo o gene ontology (GO) de cada proteína obtido. A partir dos dados também foram gerados gráficos dos processos biológicos em cada tempo. Verificou-se que o genótipo *Pisifera* A251424 foi o mais

responsivo ao processo de ES quando comparado aos demais, com maior formação de calos ao longo do tempo (45%). Na etapa MM, calos com até 10,6 mg de massa fresca foram os que apresentaram maior incremento de biomassa em relação aos calos de maior peso inicial. Com 90 dias em meio MD, calos embriogênicos se diferenciaram em embriões somáticos e até 130 dias após, clusters de embriões somáticos surgiram nesta condição. Nas análises morfo-anatômicas e histoquímicas, quatro tipos de calos foram observados na etapa MI, sendo o nodular amarelado, com maior adensamento de amido nesta etapa, o único a progredir até a formação de embriões somáticos. Na análise proteômica das variedades *Tenera*, 52 proteínas diferencialmente abundantes no tempo 14 dias foram reveladas, incluindo 17 proteínas aumentadas e 14 diminuídas no genótipo responsivo, em relação ao genótipo não-responsivo. Já aos 150 dias de indução, 74 proteínas reguladas foram detectadas, incluindo 19 aumentadas e 13 diminuídas no genótipo responsivo em relação ao não-responsivo. Um total de 40 proteínas exclusivas foram observadas no genótipo responsivo aos 150 dias de indução, enquanto que o genótipo não-responsivo apresentou somente duas. A anotação funcional evidenciou uma menor diversidade dos processos biológicos aos 14 dias para o genótipo responsivo, e aos 150 dias estes processos apresentaram maior diversidade, quando comparados ao não-responsivo. A análise 2-DE e ontologia gênica permitiram a identificação de dez proteínas importantes relacionadas com a aquisição de competência embriogênica, entre elas a isoenzima catalase 2 (*spot* 254), mono-dehidro-ascorbato-reductase isoforma cloroplástica X2 (*spot* 150), subunidade beta da pirofosfatofruose-6-fosfato-1-fosfotransferase (*spot* 338). De modo geral, os resultados obtidos envolvendo a ES, morfo-anatomia, histoquímica e a análise proteômica, aliada à bioinformática (anotação funcional), permitiram compreender melhor a propagação *in vitro* em dendezeiro, dando novos subsídios para pesquisas futuras rumo a um melhor entendimento sobre os processos de propagação clonal da espécie por embriogênese somática.

**Palavras-chave:** Dendezeiro, embriogênese somática, morfogênese, 2-DE, espectrometria de massa.

## Abstract

The objective of this work was to evaluate the responses of the *Pisifera* genus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) regarding the acquisition of embryogenic competence and plant regeneration by somatic embryogenesis (SE) and to identify proteins involved in the process of acquisition of embryogenic competence in *Tenera* hybrids contrasting as to the embryogenic capacity. In a first experiment, leaf explants of four adult genotypes of oil palm of the *Pisifera* variety (A251424, A251427, A251512 and A251513) were used for SE induction using the induction medium (IM) composed of salts and vitamins of Murashige e Skoog (MS) and supplemented with 30 gL<sup>-1</sup> of sucrose, 0.5 gL<sup>-1</sup> of glutamine, 0.5 gL<sup>-1</sup> of hydrolyzed casein, 2.5 gL<sup>-1</sup> of activated charcoal, 450 µM of Picloram and solidified with 2.5 gL<sup>-1</sup> of phytigel. The material remained in this condition for 360 days, being subcultured every 150 days. Subsequently, the material was transferred to calluses multiplication medium (MM) containing 40 µM of Picloram, 10 µM of 2-isopentenyladenine (2iP) and 2.5 gL<sup>-1</sup> of phytigel, where it remained for 90 days. Then, calluses were transferred to differentiation medium (DM), composed of 12.3 µM 2iP, 0.54 µM of naphthaleneacetic acid (ANA) and 2.5 gL<sup>-1</sup> of phytigel. After differentiation, the somatic embryos were transferred to regeneration medium, without growth regulators and supplemented with 2.5 g.L-1 of phytigel and activated charcoal. Throughout the process, the material was evaluated morphologically and histochemically to better characterize the steps. In a second experiment, differential proteomics of two hybrids of the *Tenera* variety, B351733 (responsive to SE) and B352933 (non-responsive to SE) were evaluated during the initial (14 days) and late (150 days) process of the acquisition of embryogenic competence in oil palm, steps characterized by the beginning of formation of primary and embryogenic callus, respectively. Proteins extracted were quantified by Bradford assay and analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Differential proteins detected by the Image Master Platinum software were identified by mass spectrometry. The sequence was obtained from NCBI bank by means of the GI (Gene Identifier) of each protein identified at these times. With the sequences, it was performed the functional annotation of these proteins on the AgBase and Revigo platforms, and the gene ontology (GO) of each protein was obtained. The graphics for biological process ES were generated for both genotypes at each time. It was verified

that the Pisifera genotype A251424 was the most responsive to the SE process when compared to the others, because it presented greater calluses formation over time (45%). In stage MM, calluses with lower initial weight (up to 10.6 mg) presented a greater increase of fresh biomass in relation to the calluses of greater initial weight. After 90 days on MD medium, embryogenic calluses differentiated into somatic embryos and after 130 days, clusters of somatic embryos appeared on this condition. In the morpho-anatomical and histochemical analyzes, four types of calluses were observed in stage MI, being nodular yellowish with greater starch deposition in this step and proceeded in the stages until formation of somatic embryos. At the proteomic analysis of the *Tenera* varieties, 52 differentially abundant proteins on time 14 days were revealed, including 17 proteins increased and 14 decreased in the responsive genotype with respect to the non-responsive genotype. Already at 150 days of induction, 74 regulated proteins were detected, including 19 increased and 13 decreased also in the responsive genotype with respect to non-responsive genotype. A total of 40 unique proteins were observed in the responsive genotype at 150 days of induction, while the non-responsive genotype showed only two. The 2-DE analysis and gene ontology allowed the identification of ten important proteins related to the acquisition of embryogenic competence, among them Catalase isozyme 2 (*spot* 254), Monodehydro ascorbate reductase chloroplastic isoform X2 (*spot* 150), Pyrophosphatefructose-6-phosphate-1-phosphotransferase subunit beta like (*spot* 338). In general, the results obtained involving SE, morphology, histochemistry and proteomic analysis, together with bioinformatics (functional annotation), allowed a better understanding of the in vitro propagation of oil palm, giving new subsidies for future research towards a better understanding about the processes of clonal propagation of the species by somatic embryogenesis.

**Key words:** Oil palm, somatic embryogenesis, morphogenesis, 2-DE, mass spectrometry.

## 1 – Introdução geral

Com mais de 3500 espécies, a família Arecaceae, na qual as palmeiras estão incluídas, compreende um grupo particular de plantas tropicais e subtropicais, com crescimento exclusivamente primário (Tomlinson 2006). A família apresenta importância econômica, sendo útil como alimento, vestuário, têxtil e combustível, principalmente nos trópicos (Glimn-Lacy e Kaufman 2006).

A utilização de biomassa para a produção de biocombustíveis tem despertado interesse econômico significativo nas palmeiras, principalmente em espécies como a macaúba (*Acrocomia aculeata* Jacq. Loddiges ex Mart.), dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), inajá (*Maximiliana regia* Mart.), tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) e o babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng.) (Costa e Marchi 2008). Destas, o gênero *Elaeis* se destaca por possuir duas espécies de interesse para a produção de óleo vegetal: caiaué (*Elaeis oleifera* HBK.) e dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Surre e Ziller 1969).

Caiaué é uma palmeira de origem americana, sendo encontrada em Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Suriname, Equador, Brasil e Peru (Rajainadu 1986). As plantas de *E. oleifera* crescem ao longo das margens de rios suportando bem o sombreamento e a inundação, o que resulta em maior adaptabilidade ambiental em relação a *E. guineensis* (Corley et al. 2003). A espécie possui características agrônômicas importantes em relação ao dendezeiro como, por exemplo, menor taxa de crescimento vertical do tronco, óleo mais insaturado e de alto teor de oleína, que beneficia a produção de biodiesel de alta qualidade. Porém, a proporção de óleo produzido por cacho em caiaué é em torno de 5%, quando comparado a 25% em dendê (Barcelos et al. 2002).

Adicionalmente, o caiaué apresenta maior resistência ou tolerância a diversas pragas e doenças, especialmente ao amarelecimento-fatal, uma das principais doenças da cultura, caracterizada pelo amarelecimento dos folíolos basais das folhas mais jovens (Chinchilla 2008). Assim, o Caiaué é utilizada em cruzamentos com a espécie africana (*E. guineenses*) para formar híbridos interespecíficos produtivos (Boari 2008; Collares 2011; Cunha et al. 2012).

Diferentemente do caiaué, o dendezeiro é uma planta de grande porte, podendo alcançar até 30 metros de altura quando em idade adulta. Esta palmeira tem origem Africana, sendo encontrada na Guiné, Serra Leoa, Libéria, Costa do Marfim, Gana,



Togo, Benim, Nigéria, Camarões, República Democrática do Congo e Angola. Na região Centro-oeste do continente Africano, a palma de óleo é encontrada passando pela República do Congo, Tanzânia, Moçambique e Ilha de Madagascar (Rajainadu 1986). Esta planta não possui resistência ao amarelecimento-fatal, que é a maior ameaça ao cultivo do dendê na América Latina (Barcelos et al. 2015), mas possui a maior produtividade de óleo vegetal, com rendimento de até 7 ton/ha/ano de óleo, valor que corresponde a 10 vezes a produtividade do óleo de soja (Boari 2008; Lin et al. 2009; Jayanthi et al. 2015). Outra característica do dendezeiro é que ele pode produzir três variedades de frutos, que são caracterizados conforme a espessura do endocarpo, a qual é determinada pela presença do gene denominado *Sh* (Billote et al. 1999).

Dessa forma, *E. guineensis* Jacq. var. *dura* Becc., apresenta genótipo homozigoto com genes  $Sh^+/Sh^+$ , endocarpo com espessura entre 2 a 6 mm e é usada como planta feminina na produção de híbridos comerciais. *E. guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc., apresenta genótipo homozigoto com genes  $Sh^-/Sh^-$ , vestígios do endocarpo, que também pode estar ausente e é uma planta que fornece pólen para produção de híbridos comerciais. E por último, *E. guineensis* Jacq. var. *tenera* Becc. é o híbrido resultante do cruzamento das duas variedades acima, possuindo genótipo heterozigoto com gene  $Sh^+/Sh^-$ , endocarpo de espessura entre 0,5 e 4 mm, o qual é atualmente utilizado para a maioria dos plantios comerciais (Billote et al. 1999) e tem vida econômica de 20 a 30 anos (Barcelos et al. 2000).

Devido à alta produtividade de óleo que *E. guineensis* possui, programas de melhoramento genético da espécie têm sido implementados por instituições de pesquisa que buscam introduzir, selecionar e melhorar geneticamente materiais com características agrônomicas de interesse. Porém, apesar de várias décadas de trabalho, o número de materiais selecionados, melhorados e lançados convencionalmente, ainda são relativamente baixos em função do longo ciclo da cultura (Low et al. 2008).

Outra limitação no melhoramento genético do dendezeiro é que a planta possui um único ápice de crescimento, sem perfilhamento, o que impede que sua multiplicação vegetativa seja realizada por métodos convencionais, fato que, em última análise, impossibilita a obtenção de culturas uniformes e a perpetuação de características agrônomicas de interesse (Scherwinski-Pereira et al. 2010; Silva et al. 2012; Silva et al. 2014b). Até então, a principal forma de propagação da planta é via sementes (Lorenzi et al. 2004). No entanto, as progênes resultantes são altamente heterogêneas, visto que os

genitores apresentam considerável nível de heterozigose, pois não existem linhagens puras, o que leva a plantios desuniformes (Viégas e Müller 2010). Dessa forma, a cultura de tecidos de plantas vem sendo tratada como uma importante ferramenta para o melhoramento genético da espécie e clonagem de materiais selecionados (Silva et al. 2012).

Entre as técnicas aplicadas em cultura de tecidos de plantas, a embriogênese somática (ES) apresenta grande importância para a propagação clonal, pois um grande número de plantas pode ser produzido por meio da germinação de embriões somáticos *in vitro* (Litz e Gray 1995). Trata-se de um processo pelo qual células ou tecidos somáticos, em determinadas condições experimentais, são induzidas à formação de embriões somáticos, que se assemelham a embriões zigóticos, porém não são originados a partir da fusão de gametas (Williams e Maheswaran 1986). De fato, a ES tem sido considerada uma técnica potencial para a propagação de várias espécies vegetais, dentre as quais o dendezeiro, por possibilitar em espaço físico reduzido, a clonagem de indivíduos por meio de diferentes tipos de propágulos, como embriões zigóticos, folhas imaturas e inflorescências (Teixeira et al. 1994; Guedes et al. 2011; Silva et al. 2012; Balzon et al. 2013).

No entanto, apesar do grande potencial da ES, ainda não são conhecidos com precisão todos os processos fisiológicos e moleculares envolvidos durante a formação dos embriões, que possibilitem, ao final das etapas, a regeneração em larga-escala de plantas completas. Buscando o melhor entendimento da ES, padrões protéicos vêm sendo utilizados como marcadores moleculares do processo em diferentes sistemas (Joosen et al. 2007; Legrand et al. 2007; Sharma et al. 2008). Nesse sentido, o uso de proteínas como marcadores moleculares é uma importante estratégia para otimização e controle dos estádios da ES, principalmente durante a aquisição de competência embriogênica. Assim, no estudo de proteômica, a eletroforese bi-dimensional (2-DE) é a técnica ainda muito utilizada que permite a visualização de proteínas envolvidas nos diferentes estádios da ES (Rabilloud 2002; Salvato e Carvalho 2010).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivos: 1) induzir a embriogênese somática de genitores da variedade *pisifera* de *Elaeis guineensis* Jacq. e; 2) identificar proteínas envolvidas durante o processo de indução da embriogênese somática em híbridos *tenera* contrastantes quanto à capacidade embriogênica.

## 2 – Revisão de literatura

### 2.1 – Aspectos gerais do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)

O dendezeiro pertence à classe Liliopsida (Monocotyledonae), ordem Arecales, família Arecaceae (Palmae), subfamília Arcoideae e gênero *Elaeis* (Tregear et al. 2011) (Fig. 1). A espécie foi denominada em 1763 pelo botânico Nicholas Joseph Jacquin, que propôs o nome genérico *Elaeis* por derivação da palavra grega *elaion* que significa óleo, e o nome específico *guineensis*, devido o centro de origem da espécie na Guiné-Bissau. Trata-se de uma espécie de origem Africana encontrada naturalmente desde o Senegal até Angola. É uma planta cultivada em regiões tropicais úmidas na África, Ásia e América, sendo que as populações mais densas são encontradas na Costa do Marfim, Camarões e Zaire (Zeven 1964; Valois 1997).

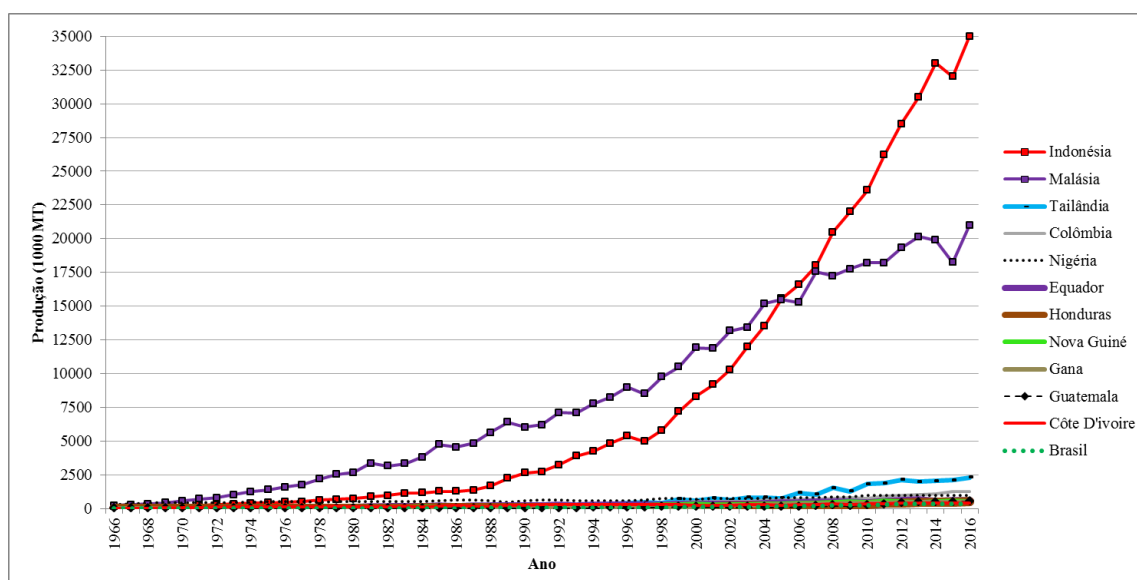


**Figura 1.** Genótipo de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) apresentando frutificação e crescimento vertical do caule reduzido. **Foto:** Scherwinski-Pereira, J.E., Manaus, AM, 2012.

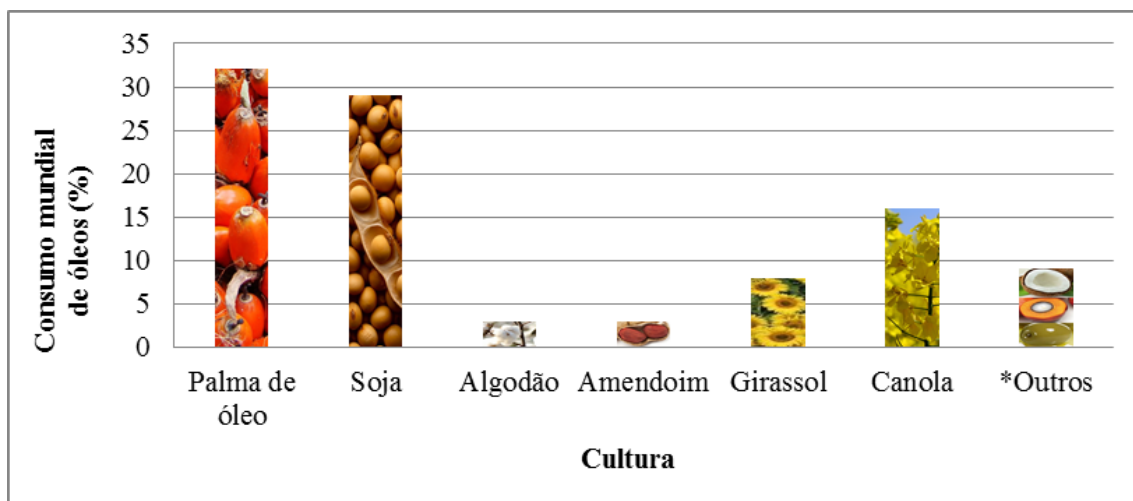
No Brasil, populações de dendezeiro Africano selvagem, encontradas na Bahia, são semelhantes às aquelas encontradas na Nigéria, e por isso, é possível que o dendezeiro tenha sido introduzido durante o período de tráfico de escravos africanos no início do

século XVIII (Bakoumé et al. 2015). Mais de 100 mil hectares do território nacional são ocupados pela espécie, que está distribuída entre os estados do Amazonas, Amapá, Bahia e Pará, sendo este último o produtor de aproximadamente 100 mil toneladas de óleo vegetal por ano e responsável por um retorno monetário médio anual de 2000 dólares por hectare (Villela et al. 2014). Contudo, o país ainda ocupa posição inferior quando comparado aos seus concorrentes (Indonésia e Malásia), em relação ao cultivo dessa oleaginosa (Gontijo et al. 2011) (Fig. 2).

De produção direcionada para a demanda local a um dos cultivos que mais crescem no mundo, o óleo de palma tornou-se o mais importante óleo vegetal. Dos óleos vegetais mais comercializados no mercado internacional, como soja, canola, amendoim, girassol, algodão, entre outros, aquele que se destaca como líder mundial em comércio e consumo entre óleos comestíveis, é o óleo de palma (Fig. 3) (Levermann e de Souza 2014).



**Figura 2.** Principais países envolvidos no cultivo do dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.) e na produção anual de óleo de palma. Fonte: adaptado de IndexMundi (2016).



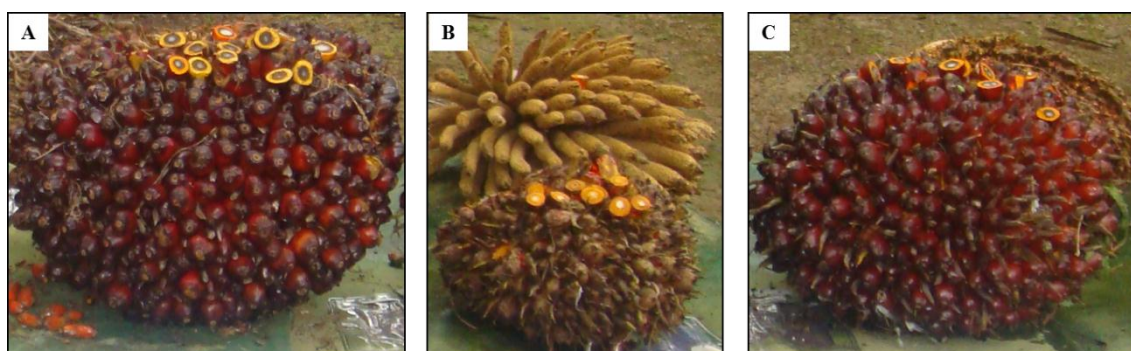
**Figura 3.** Consumo mundial de óleos vegetais em 2010/2011. \*Outros óleos incluem o óleo de oliva, palmiste e coco. Fonte: adaptado de Agriculture (2011) – UNITED STATES OF AGRICULTURE. The oilseeds group. **World markets and trade 2001-2011.** Washington: USDA, 2011. Disponível em <http://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>>. Acesso em 19 dez 2016.

O dendezeiro é uma monocotiledônea perene que, em idade adulta, pode alcançar de 15 a 18 metros de altura e até 30 metros numa floresta densa (Barcelos et al. 2015). A espécie possui sistema radicular fasciculado, composto por várias raízes adventícias primárias, que emergem do bulbo radicular e são encontradas entre 20 e 60 cm de profundidade (Ferwerda 1975; Adam et al. 2005). O caule é do tipo estipe, cilíndrico e com um único ápice crescente, não apresentando ramificações (Gonçalves 2001). As folhas do dendezeiro apresentam nervuras paralelinérveas e são pinadas, medindo de 5 a 7 m. Um eixo central está presente nas folhas, o qual é dividido em pecíolo, parte basal que se liga ao estipe, com aproximadamente 1,5 m de comprimento, e ráquis, a parte distal, com aproximadamente 5 m de comprimento e sendo composta de 250 a 350 folíolos (Adam et al. 2005).

A espécie é monóica, isso é, produz inflorescências masculinas e femininas na mesma planta. As inflorescências, denominadas espádices, são formadas na axila de cada folha e compostas por espigas envolvidas por duas brácteas fibrosas, chamadas de espatas. O dendezeiro ainda é caracterizado como uma cultura alógama, assim, seu modo de reprodução é por polinização cruzada, uma vez que as inflorescências são produzidas em ciclos alternados e amadurecem em momentos distintos (Valois 1997; Adam et al. 2011).

Entre cinco e seis meses após a polinização, os frutos de dendezeiro tornam-se maduros. Cerca de 1500 frutos ficam dispostos em um cacho, que possui formato ovóide de aproximadamente 50 cm de comprimento, 35 cm de largura média e pesando entre 20 e 30 kg (Barcelos et al. 2015). Os frutos são compostos pelo epicarpo (camada externa); mesocarpo (camada média entre epicarpo e endocarpo), que representa 92% do fruto e contém 20 a 50% de óleo de palma; e endocarpo (camada interna) onde está a amêndoa que contém o óleo de palmiste (Sumathi et al. 2008). Em três anos e meio, após o transplante para o campo, geralmente inicia-se a produção dos cachos do dendezeiro que pode chegar ao ápice produtivo entre 7 e 15 anos. Após este período, a produção começa a decrescer gradativamente até o 25º ano (Suframa 2003; Basiron 2007).

A principal característica dos frutos é a espessura do endocarpo, o qual é chamado de *shell* e é controlada por um gene principal, classificando assim, as plantas em três variedades: *Dura*, que é usada como planta feminina na produção de híbridos comerciais, possui genótipo homocigoto ( $Sh^+/Sh^+$ ) e endocarpo com espessura de até 6 mm; *Pisifera*, que produz grande quantidade de pólen que também é usado na produção dos híbridos comerciais e com o endocarpo pequeno ou ausente. Essa variedade apresenta genótipo homocigoto ( $Sh^-/Sh^-$ ); e por último *Tenera*, um híbrido resultante do cruzamento entre as variedades *Pisifera* e *Dura*, apresentando genótipo heterocigoto ( $Sh^+/Sh^-$ ). Suas sementes têm espessura entre 0,5 e 4 mm e são indicadas para plantios comerciais, devido sua boa produção de frutos e óleo vegetal (Fig. 4). Essa variedade tem vida econômica recomendada entre 20 e 30 anos e alta produção de óleo por cacho chegando até 6000 kg.ha<sup>-1</sup> (Beirnaert e Vanderweyen 1941; Billote et al. 1999; Barcelos et al. 2000; Pádua et al. 2013).



**Figura 4.** Frutos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq.) apresentando diferenças quanto à espessura e presença ou ausência do endocarpo, de acordo com a variedade. **A-** *E. guineensis* var. *dura*; **B-** *E. guineensis* var. *pisifera*; **C-** *E. guineensis* var. *tenera*. **Foto:** Scherwinski-Pereira, J.E., Manaus, AM, 2012.

O óleo dos frutos (óleo de palma extraído da polpa do mesocarpo) e óleo de palmiste (extraído da amêndoa) são comestíveis e possuem grande importância econômica mundial, sendo utilizados em vários setores da indústria (Subramaniam et al. 2010). O óleo de palma é empregado na alimentação humana, fabricação de margarinas, pães, biscoitos, e também em siderurgia, laminação de chapas de aço, banho de estanhagem, fabricação de tintas e vernizes. O óleo de palmiste é de grande valor na indústria farmacêutica, cosmética e perfumaria, além de também ser usado na formulação de drinks energéticos e alimentos para crianças (Barcelos et al. 1995; Konan et al. 2006; Basiron 2007; Murphy 2007; Boari 2008; Konan et al. 2010; Thuzar et al. 2011). Outro aspecto importante do óleo de dendê é que vem sendo foco para a produção de energia renovável, como na área de biocombustíveis (Urquiaga et al. 2005).

Estima-se que o Brasil possua cerca de 32 milhões de hectares de áreas degradadas adequadas para o cultivo da espécie, espaço este suficiente para a produção de óleo e manutenção das demandas internas e externas, tornando o Brasil um dos maiores produtores de óleo vegetal do mundo (De Carvalho et al. 2006; Ramalho-Filho et al. 2010; Barcelos et al. 2015). Porém, a cultura apresenta dificuldades com relação à produção de mudas de qualidade em escala comercial, devido às características que as plantas possuem, como um único meristema apical, que impede a propagação por meio de estacas ou propágulos vegetativos. O método de propagação atualmente utilizado é via sementes, o que torna praticamente impossível a obtenção de culturas uniformes e a perpetuação das características selecionadas de genótipos elites. Além do mais, a multiplicação por meio de sementes requer um período longo para que as novas mudas sejam formadas (Jouannic et al. 2011), pois a taxa de germinação pode ser baixa e lenta (Luis et al. 2010). Buscando ultrapassar essas limitações biológicas impostas pela cultura do dendezeiro, a embriogênese somática (ES), como técnica da cultura de tecidos vegetais, pode auxiliar na otimização de protocolos de propagação clonal, produção em larga escala da espécie e, principalmente, obtenção de genótipos elites selecionados.

## 2.2 – Embriogênese somática

Embriogênese somática (ES) compreende uma das técnicas de propagação clonal mais promissoras dos últimos tempos. Trata-se de um processo em que células somáticas haplóides ou diplóides se desenvolvem a partir de diferentes estádios embriogênicos para formar uma estrutura bipolar, conhecida como embrião somático. Este, por sua vez, não apresenta conexão vascular com o tecido materno, originando uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Durzan 1988; von Arnold et al. 2002; Sané et al. 2006; Pereira et al. 2007). Para a indução dos calos durante a ES, teoricamente qualquer tecido vegetal pode ser usado, considerando-se a totipotencialidade das células vegetais. Contudo, explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático têm sido empregados, pois geralmente são oriundos de tecidos jovens e apresentam maior atividade celular, sendo assim, mais adequados para o estímulo da formação dos calos (Grattapaglia et al. 1998).

Em relação aos métodos tradicionais de propagação (estaquia, microestaquia, miniestaquia, enxertia e alporquia), a ES é considerada a técnica de reprodução vegetativa mais comumente recomendada para a propagação clonal, principalmente em palmeiras, que não apresentam ramificações do tronco e nem gemas laterais. Assim, a ES tem como vantagens a possibilidade de multiplicação em larga escala de genótipos superiores, a obtenção de maior número de embriões somáticos em pequenos espaços físicos, o armazenamento de propágulos por maior período de tempo por criopreservação, entre outros usos (Soh et al. 2011). Dessa forma, a técnica se torna uma das únicas alternativas possíveis de serem aplicadas para a clonagem da maioria das palmeiras (Scherwinski-Pereira et al. 2010; Sané et al. 2012).

A ES pode ocorrer de forma direta ou indireta. O primeiro caso ocorre quando células programadas para a diferenciação ou já diferenciadas adquirem competência embriogênica e formam embriões somáticos, sem passarem pelo estágio de formação de calos. No segundo caso, as células passam pelo estágio de formação de calos para posterior diferenciação em embriões (Sharp et al. 1980; Grattapaglia et al. 1998; Rezende et al. 2008; Scherwinski-Pereira et al. 2010).

A maioria dos estudos envolvendo as palmeiras mencionam a ocorrência de embriogênese somática indireta, a qual pode permitir maior produção de clones, como observado em tamareira (*Phoenix dactylifera* L.), dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e



coqueiro (*Cocos nucifera* L.) (Konan et al. 2006; Te-Chato e Hilae 2007; Wang et al. 2010). É possível que alguns fatores influenciem a ES nas palmeiras, como os tipos de reguladores de crescimento a serem utilizados nas diferentes etapas, o tipo de explante, o meio de cultura e seus diferentes constituintes (Gueye et al. 2009; Perera et al. 2009), o carvão ativado (Thomas 2008), além do genótipo (Silva et al. 2012; Luis e Scherwinski-Pereira 2014).

Reguladores de crescimento, em especial auxinas, são de fundamental importância na transdução de sinais para desencadear um padrão de expressão gênica determinado (von Arnold et al. 2002). Há consenso na literatura sobre a função dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura para induzir competência embriogênica, sendo auxinas e citocininas os grupos mais comumente envolvidos na ativação e regulação da divisão e diferenciação celular (Fehér et al. 2003; Phillips 2004; Gueye et al. 2009; Chen et al. 2010; Steinmacher et al. 2011; Thuzar et al. 2011). A aplicação exógena de auxinas consideradas fortes, como o 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) e o picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) é bem relatada para induzir a transição de células somáticas já diferenciadas para células em estado embriogênico em vários sistemas vegetais (Don Palmer e Keller 2011). O conteúdo elevado destes reguladores na aquisição de competência embriogênica, leva a uma resposta extrema de estresse das células vegetais, a qual é necessária para induzir a desdiferenciação celular (Karami e Saidi 2010).

O regulador 2,4-D tem sido bastante empregado para induzir a formação de calos durante a embriogênese somática (Verdeil et al. 1994; Gueye et al. 2009). Besse et al. (1992) obtiveram formação de calos nodulares compactos e friáveis quando as folhas jovens de dendezeiro foram submetidas a concentrações elevadas de 2,4-D. Alguns estudos fornecem evidência de que o uso de picloram também ocasiona boa resposta na indução de embriões somáticos em várias espécies de palmeiras, como em pupunha (Maciel et al. 2010; Steinmacher et al. 2011) e o próprio dendezeiro (Scherwinski-Pereira et al. 2010; Sanputawong e Te-chato 2011). Em estudo com *Phoenix canariensis* Chabaud, Huong et al. (1999) observaram que altas concentrações de picloram no meio de cultura foi um pré-requisito para a indução de calos embriogênicos nodulares.

A influência de 2,4-D na indução da embriogênese somática é bem documentada na literatura (Dudits et al. 1995). Fehér et al. (2003) propuseram que este regulador de

crescimento, quando adicionado ao meio de cultura acima de determinada concentração, pode apresentar duplo efeito nas culturas, como auxina (diretamente ou através do metabolismo endógeno) e agente de estresse. Assim, a ação simultânea da resposta ao estresse e aos sinais de auxina pode ser um evento chave na adaptação celular, levando a reprogramações genéticas, metabólicas e fisiológicas, que resultam na competência embriogênica das células somáticas.

Como mencionado anteriormente, outro fator que pode ter influência na ES é a seleção dos propágulos a serem utilizados no processo para obtenção da regeneração de embriões somáticos (Benson 2000). Em palmeiras, alguns protocolos de ES já foram feitos usando-se como explantes embriões zigóticos (Teixeira et al. 1993), raízes (Jones 1974; Ledo et al. 2002; Balzon et al. 2013), folhas (Ahée et al. 1981; Duval et al. 1988) e inflorescências imaturas (Teixeira et al. 1994; Karun et al. 2004), além de ovários não fertilizados (Perera et al. 2007). Todavia, a resposta embriogênica pode variar em uma mesma espécie de palmeira de acordo com o tipo de tecido vegetal utilizado, pois alguns tecidos respondem melhor do que outros ao processo da ES (Viñas e Jiménez 2011).

Em relação ao meio de cultura, o meio MS de Murashige e Skoog (1962) tem sido o mais rotineiramente utilizado para as diversas espécies (Guedes et al. 2011), incluindo as palmeiras (Vasil e Vasil 1981; Balzon et al. 2013). O meio Y3, formulado por Eeuwens em 1976 para o cultivo de *Cocos nucifera* L., também tem sido bastante utilizado, especialmente em palmeiras (Muniran et al. 2008; Moura et al. 2009; Luis e Scherwinski-Pereira 2014). Em dendezeiro, Guedes et al. (2011) observaram maior formação de calo embriogênico nos explantes cultivados em meio de MS, do que naqueles cultivados em Y3 (Eeuwens 1976). Em tamareira, o meio de cultivo mais utilizado também tem sido o de MS (Hilae e Te-chato 2005; Othmani et al. 2009; Mazri 2013). No caso de coco (*C. nucifera*) (Verdeil et al. 1994) e macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) (Moura et al. 2009; Luis e Scherwinski-Pereira 2014) foi utilizado o meio de cultivo Y3.

Outro componente que influencia na embriogênese somática em palmeiras é o carvão ativado. Sua influência no crescimento e desenvolvimento vegetal pode ser atribuída ao seu potencial em adsorver substâncias inibidoras do meio de cultivo (Thomas 2008), diminuir a oxidação fenólica (Teixeira et al. 1994), alterar o pH do meio (Owen et al. 1991) e estabelecer um ambiente escuro no meio de cultivo,

simulando a condição ambiental do solo em que o indivíduo cresceria naturalmente (Dumas e Monteuis 1995).

Contudo, o maior impacto do uso de carvão ativado ao meio de cultura parece ser a diminuição que ele ocasiona nas concentrações dos reguladores de crescimento vegetal, devido sua capacidade de adsorção. Dessa forma, é comum se utilizar quantidades maiores desses reguladores para suprir o déficit ocasionado pelo carvão ativado, durante a indução (Pan e Van Staden 1998; Thomas 2008).

Por fim, baixa resposta da embriogênese é influenciada também pelo genótipo (Constantin et al. 2015). Mesmo sendo conduzida desde 1970 (Raberchault et al. 1970; Jones 1974; Teixeira et al. 1993; Teixeira et al. 1994; Scherwinski-Pereira et al. 2010; Silva et al. 2014a; Gomes et al. 2016), a cultura de tecidos em dendezeiro ainda enfrenta desafios para a obtenção de calos embriogênicos a partir de certos genótipos, uma vez que a resposta é genótipo dependente (Rival e Parveez 2004; Thuzar et al. 2012).

Silva et al. (2012) trabalhando com nove genótipos de dendezeiro e utilizando meio de cultura de MS contendo 450  $\mu\text{M}$  de picloram, mostraram que somente dois genótipos tinham potencial para formação de calos embriogênicos e diferenciação em embriões somáticos. Alves et al. (2011) trabalhando com híbridos interespecíficos oriundos do cruzamento *E. oleifera*  $\times$  *E. guineensis*, também mostraram que diferentes variedades requerem diferentes níveis ideais de 2,4-D para indução de calos (375 e 625  $\mu\text{M}$ ).

Assim, esta diferença de resposta entre as variedades pode estar refletida na interação do genótipo com o ambiente, ou seja, quando os mesmos genótipos respondem diferentemente de acordo com o ambiente onde se encontram (Obisesan e Fatunla 1983), o que caracteriza a resposta genótipo-dependente. Adicionalmente, não é uma tarefa trivial explicar este tipo de resposta, pois há todo um processo dinâmico de regulação epigenética e molecular durante a ES (Elhiti et al. 2013; Us-Camas et al. 2014), que necessita ser melhor compreendido.

### 2.3 – Análise morfo-anatômica

A análise anatômica ou histológica permite o detalhamento dos eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro* (Rodrigues et al. 2004). Neste tipo de cultivo, características próprias podem ser apresentadas pelas plantas, como

abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, capacidade de sustentação reduzida (esclerênquima e colênquima), entre outros tipos de desordens (Schwendiman et al. 1988; Campostrini e Otoni 1996; Guerra e Handro 1998; Moura et al. 2008; Silva et al. 2014b).

Por meio de estudos morfo-anatômicos é possível identificar as fases do desenvolvimento embrionário (Portillo et al. 2007): calo primário, calo pró-embriogênico, desenvolvimento pró-embriogênico, maturação e desenvolvimento de embriões, que ocorrem na ES indireta (Viñas e Jiménez 2011). Verdeil et al. (2001) verificando a competência embriogênica em *C. nucifera*, observaram que durante a formação de pró-embriões, ocorreram alterações na estrutura da parede celular dos explantes, como fechamento dos plasmodesmas e deposição de calose. Estas alterações, segundo os autores, proporcionam aos pró-embriões o isolamento necessário para o início do seu desenvolvimento e diferenciação.

Estudos histológicos durante a ES têm sido úteis para compreender a formação de embriões somáticos (Silva et al. 2014b), pois possibilitam a identificação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos, permitindo dessa forma o aumento da manipulação das respostas embriogênicas (Barbosa et al. 2003). O estudo do desenvolvimento de células e tecidos, nas diferentes etapas do processo, também tem ajudado a aprimorar a eficiência dos protocolos de propagação clonal. Assim, estes estudos têm possibilitado a observação de alterações associadas com a posição e atividade das células de competência embriogênica a serem identificadas, além da caracterização e melhor entendimento de todo o desenvolvimento ontogênico (Sané et al. 2006).

#### 2.4 – Proteômica: Eletroforese bidimensional (2-DE)

A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma técnica rotineiramente utilizada para as análises proteômicas (López 2007) e surgiu na década de 70, logo após o advento da eletroforese-1D em gel de poliacrilamida, a qual possibilitou a criação das primeiras bases de dados de proteínas. Denominada na época de SDS-PAGE, a eletroforese-1D separa as proteínas provenientes de material complexo, de acordo com sua massa molecular. Porém, buscando o melhor entendimento das funções celulares em nível

proteico, métodos mais acurados de análise foram desenvolvidos, assim a 2-DE foi estabelecida (Klose 1975; O'Farrell 1975).

Nos anos 90, com o surgimento do termo “proteômica” (Wilkins et al. 1996; 1997) foi que a 2-DE realmente começou a ser mais utilizada no estudo de proteínas em larga escala. Dessa forma, a caracterização de perfis proteicos, a quantificação de proteínas, as interações entre proteínas e as modificações pós-traducionais marcaram o início da proteômica (Wilkins et al. 1997; Dias et al. 2007; Salvato e Carvalho 2010; Di Carli et al. 2012; Wright et al. 2012).

A proteômica tem sido útil para o melhoramento genético de plantas, pois fornece informação de variabilidade genética que é efetivamente expressa no genoma (Pennington e Dunn 2001). Adicionalmente, dados gerados por análises proteômicas possibilitam uma ampla gama de estudos, como os de caracterizar as respostas celulares em relação a determinadas drogas, doenças e mudanças ambientais; identificar alvos farmacológicos e marcadores biológicos relacionados ao estabelecimento e progressão de doenças; evidenciar proteínas envolvidas nas rotas metabólicas relacionadas aos diferentes processos celulares, entre outros (Wilkins et al. 1996; Rose et al. 2004; Silva et al. 2009).

A separação de proteínas por 2-DE ocorre de acordo com o ponto isoelétrico das mesmas e seu peso molecular para então haver a comparação do conteúdo de cada proteína produzida em diferentes células ou tecidos e em diferentes estados fisiológicos (Rabilloud 2002; Monteoliva e Albar 2004). Nesta técnica, proteínas precisam ser separadas por massa molecular em um gel desnaturante e posteriormente, visualizadas por métodos de marcação, como o Comassie coloidal (Monteoliva e Albar 2004). Na área vegetal, os trabalhos de proteômica utilizando 2-DE têm contribuído para detecção de proteínas expressas em resposta a estresses abióticos e bióticos, bem como na investigação de proteínas que estão envolvidas na interação planta-patógeno (Carmo et al. 2013).

A produção de géis 2-DE tornou-se rotina para o estudo da expressão de proteínas, produzindo mapas proteicos correspondentes a diferentes genótipos, estádios de desenvolvimento e condições estressantes. Porém, a técnica é limitada, por ser difícil separar proteínas com pontos isoelétricos extremos e também não permitir a integração direta ao sistema de espectrometria de massa (Salvato e Carvalho 2010). Mesmo assim, a técnica 2-DE é a metodologia clássica ainda utilizada em estudos de proteômica e

aliada à espectrometria de massas, tem sido capaz de separar muitas proteínas de amostras complexas, possibilitando com isso, a análise de expressão gênica através da comparação de padrões proteicos (Poretzky e Geohegan 1998; Wang e Hanash 2003; Sizova et al. 2007; Tang et al. 2008). Adicionalmente, a técnica apresenta como vantagens a avaliação rápida da qualidade da preparação da amostra, identificação e sequenciamento de proteínas para organismos os quais não se tem informação genômica disponível ou estas são escassas, além da visualização e quantificação de proteínas intactas e suas isoformas (Rogowska-Wrzesinska et al. 2013).

Em embriogênese somática, a abordagem proteômica baseada em eletroforese bi-dimensional tem sido aplicada para investigar mudanças moleculares em várias espécies vegetais (Choi e Sung 1984; Kuroda 1995; Sallandrouze et al. 1999; Stasolla et al. 2004; Imin et al. 2005; Marsoni et al. 2008; Rode et al. 2011; Noah et al. 2013). Contudo, ainda são restritos os trabalhos usando a proteômica para tentar elucidar o processo embriogênico nas palmeiras, principalmente em dendezeiro, onde os estudos são ainda mais raros.

Silva et al. (2014a) buscaram identificar proteínas nos estágios iniciais da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de dendezeiro. Este foi o primeiro relato proteômico de embriogênese somática da espécie, especificamente no início da aquisição de competência embriogênica, onde os autores encontraram três possíveis candidatos como biomarcadores do processo: *IIIa membrane protein cp-wap13*, *fructokinase* e *PR proteins*. Posteriormente, Sin et al. (2016) utilizaram da mesma abordagem para tentar entender a alta e baixa taxa de proliferação de calos em explantes foliares de dendezeiros adultos e identificaram três proteínas como possíveis biomarcadores do processo: *triosephosphate isomerase*, *L-ascorbate peroxidase* e *superoxide dismutase*.

Como observado, estudos proteômicos que buscam compreender o processo de ES ainda são limitados, principalmente em dendezeiro. Assim, são escassas pesquisas que se utilizam da proteômica para auxiliar na compreensão das respostas contrastantes entre mesmos genótipos durante aquisição de competência embriogênica. Nesse sentido, o presente estudo vai ao encontro a essa necessidade.

**Embriogênese somática de genitores pisifera (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*) a partir de explantes foliares de plantas adultas**

**Resumo**

O presente trabalho objetivou avaliar respostas de genitores *Pisifera* de dendezeiros quanto à aquisição de competência embriogênica e regeneração de plantas por ES. Adicionalmente, a caracterização morfo-anatômica e histoquímica foram realizadas, buscando identificar marcadores morfológicos e bioquímicos do processo. Explantes foliares aclorofilados de quatro genótipos de dendezeiro da variedade *Pisifera* (A251424, A251427, A251512 e A251513) foram utilizados na ES. Para a etapa de indução, foi utilizado o meio de Murashige e Skoog (MS) suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glutamina, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de phytigel. O material permaneceu nessa condição por 360 dias, sendo subcultivado a cada 150 dias. Na etapa de multiplicação, calos obtidos com 180, 270 e 360 dias em meio de indução foram coletados, pesados em balança analítica para obtenção do peso fresco e transferidos para novo meio de multiplicação de calos (MM), contendo 40 µM de Picloram, 10 µM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de phytigel. Nessa condição, o material permaneceu por 90 dias em sala de crescimento, sendo então novamente pesados para obtenção do incremento de biomassa fresca. Durante a etapa MM, intervalos de classes de calos foram estabelecidos para avaliar a influência do peso inicial dos calos sobre sua multiplicação ao longo deste período. Uma vez multiplicados, os calos foram transferidos para o meio de diferenciação de embriões somáticos (MD), composto de 12,3 µM de 2iP, 0,54 µM de ácido naftalenoacético (ANA) e de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de phytigel. O material permaneceu nesta condição até o início da diferenciação dos embriões somáticos, quando então foram transferidos para o meio de regeneração de embriões somáticos (MR) acrescido de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de phytigel e carvão ativado e desprovido de reguladores de crescimento. Registros fotográficos foram realizados para caracterizar o desenvolvimento dos embriões somáticos ao longo do tempo, bem como análises

morfo-anatômicas e histoquímicas foram realizadas durante todas as etapas. Verificou-se que na etapa de indução da ES, o genótipo A251424 foi o mais responsivo ao processo, por apresentar maior formação de calos ao longo do tempo (45%), quando comparado aos demais. Na etapa MM, calos com menor peso inicial (até 10,6 mg) apresentaram maior incremento de biomassa fresca em relação aos calos de maior peso inicial. Com 90 dias em meio MD, calos embriogênicos diferenciaram embriões somáticos e em até 130 dias, clusters de embriões somáticos surgiram nesta condição. Para as análises morfo-anatômicas e histoquímicas, um dos quatro tipos de calos avaliados na etapa MI, nodular amarelado, apresentou maior adensamento de amido, e foi o único dos tipos que promoveu a formação de embriões somáticos. Este é o primeiro relato que utiliza explantes foliares como tecido somático para regeneração da variedade *Pisifera* e que, ao final do processo de ES, obtiveram-se clones.

**Palavras-chave:** Dendezeiro, folhas, indução de calos, amido, embrião somático



## Abstract

The objective of this work was to evaluate the responses of the *Pisifera* variety regarding the acquisition of embryogenic competence and plant regeneration by somatic embryogenesis (SE). Additionally, morpho-anatomical and histochemical characterization were performed, aiming to identify morphological and biochemical markers of the process. Leaf explants without chlorophyll from four genotypes of *Pisifera* variety (A251424, A251427, A251512 and A251513) were used in SE. In induction phase, it was used Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 30 gL<sup>-1</sup> sucrose, 0.5 gL<sup>-1</sup> glutamine, 0.5 gL<sup>-1</sup> hydrolyzed casein, 2.5 gL<sup>-1</sup> activated charcoal, 450 µM Picloram and solidified with 2.5 gL<sup>-1</sup> phytagel. The material remained on this condition for 360 days, being subcultured every 150 days. In the multiplication stage, calluses obtained with 180, 270 and 360 days of induction were collected, weighed on analytical balance to obtain fresh weight and transferred to a new calluses multiplication medium (MM) containing 40 µM Picloram, 10 µM 2-isopentenyladenine (2iP) and 2.5 gL<sup>-1</sup> of phytagel. In this condition, the material remained for 90 days in growth room, and then were weighed again to obtain the increase of fresh biomass. During the MM stage, calluses class intervals were established to evaluate the influence of calluses initial weight on multiplication over this period. Once multiplied, calluses were transferred to differentiation medium of somatic embryos (MD) supplemented with 2iP 12.3 µM, 0.54 µM naphthaleneacetic acid (NAA) and 2.5 g.L<sup>-1</sup> Phytigel. The material remained in this condition until the beginning of differentiation of the somatic embryos, when they were transferred to the regeneration medium of somatic embryos (MR) supplemented with 2.5 g.L<sup>-1</sup> of phytagel and activated charcoal, and without growth regulators. Photographic records were performed to characterize the development of somatic embryos over time as well as morpho-anatomical and histochemical analyzes for all stages. It was verified that in the induction step of SE A251424 genotype was the most responsive to the process, because it presented greater calluses formation over time (45%), when compared to the others. In the MM stage, calluses with lower initial weight (up to 10.6 mg) presented a greater increase of fresh biomass in relation to the calluses of greater initial weight. With 90 days on MD medium, embryogenic calluses differentiated into somatic embryos and up to 130 days, clusters of somatic embryos appeared in this condition. For morpho-anatomical and histochemical analysis, one of

the four types of calluses evaluated in stage MI, nodular yellowish, presented greater starch deposition and was the only one of the types that promoted formation of somatic embryos. This is the first report that uses leaf explants as somatic tissue for regeneration of the Pisifera variety and that to the end of the SE process, clones were obtained.

**Key words:** Oil palm, leaves, calluses induction, starch, somatic embryo.

## 1 – Introdução

Originário da região Noroeste da África (Guiné-Bissau) e pertencente à família *Arecaceae*, o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma monocotiledônea oleaginosa, perene e alógama, com cultivo predominante nas regiões de clima tropical úmido da América Latina, Sudeste da Ásia e África (Tregear et al. 2011). Economicamente, o dendezeiro é importante devido à alta demanda por parte da indústria alimentícia e farmacêutica, as quais têm extraído o óleo de palma – da polpa do fruto, e o óleo de palmiste – da amêndoa, para a fabricação de alimentos, cosméticos e perfumaria (Konan et al. 2006). Além disso, o dendezeiro é uma fonte promissora para a produção de biocombustível, que é uma energia alternativa e renovável (Rajesh et al. 2003; Basiron 2007; Villela et al. 2014).

De fato, entre as oleaginosas, o dendezeiro ganha destaque por poder apresentar rendimento de óleo em torno de 5 a 7 ton ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, sendo essa produção a de pelo menos 1,5 vezes superior a de óleo de coco, duas vezes maior que a do óleo de oliva e dez vezes maior que a do óleo de soja, o que o classifica como a primeira fonte de óleo vegetal do planeta (Rajesh et al. 2003; Lin et al. 2009; Agriculture 2011). No Brasil, a produção nacional não alcança nem 1% da produção da Indonésia ou Malásia, e nem mesmo a 0,5% da produção mundial. Atualmente, o Brasil ocupa a 12<sup>a</sup> posição em relação a produção mundial e, entre os países da América Latina, ocupa a 3<sup>a</sup> posição, ficando atrás da Colômbia e Equador (Gontijo et al. 2011). Em termos ambientais, as plantações de dendezeiro apresentam a capacidade de fixar carbono e proteger o solo da erosão, o que o torna uma espécie importante para a ocupação de áreas desmatadas, além do óleo, quando produzido e usado para queima não contribuir para o efeito estufa (Viégas e Müller 2010).

Devido a esse potencial econômico, programas de melhoramento genético surgiram pelo mundo, com destaque para as Instituições localizadas nos países do Continente Asiático e da América Latina (Lin et al. 2009; Konan et al. 2010). Contudo, em razão do longo ciclo da cultura, aliado a outros fatores limitantes da cultura, como por exemplo, a impossibilidade de se utilizar a propagação vegetativa para reproduzir indivíduos com características agrônômicas de interesse, ainda são relativamente poucos os materiais selecionados, melhorados e lançados comercialmente (Low et al. 2008). Adicionalmente, uma das principais dificuldades na expansão da cultura é a

disponibilidade de mudas em escala comercial, visto que a principal forma de propagação é via sementes, que muitas vezes podem apresentar baixos índices de germinação e, fundamentalmente, formar plantas heterogêneas que podem resultar em plantios desuniformes com variabilidade na produção, crescimento e resistência a pragas e doenças (Jones 1974; Noiret 1981; Konan et al. 2006; Scherwinski-Pereira et al. 2010; Silva et al. 2012).

Em todo o mundo, híbridos comerciais da variedade *Tenera* têm sido usados para comporem os plantios comerciais, pois são plantas com alta produtividade de óleo. Estes híbridos são obtidos do cruzamento de duas variedades da espécie *E. guineensis*: *Dura* x *Pisifera*, as quais são caracterizadas conforme a espessura do endocarpo (Low et al. 2008). A variedade *Dura* possui genótipo homozigoto dominante ( $Sh^+/Sh^+$ ) e desenvolve frutos com o endocarpo espesso. Nos cruzamentos da espécie, esta variedade entra como genitora feminina. A variedade *Pisifera*, por outro lado, apresenta genótipo homozigoto recessivo ( $Sh^-/Sh^-$ ) e desenvolve frutos com endocarpo mais fino, quando não, ausente. *Pisifera* também são usadas no cruzamento da espécie, mas como genitores masculinos disponibilizando grãos de pólen (Beirnaert e Vanderweyen 1941; Pádua et al. 2013; Arolu et al. 2016).

Neste contexto, a propagação clonal de indivíduos *Pisifera* é importante, pois como parentais, são eles que disponibilizam material genético (grãos de pólen) para a obtenção das variedades comerciais *Tenera* (Jayanthi et al. 2015). No Brasil, a produção comercial de sementes de dendezeiro iniciou em 1991 pela Embrapa Amazônia Ocidental, Amazonas, a qual foi responsável pela comercialização de quase 7 milhões de sementes germinadas no período de 2000 a 2010 (Lobato 2016). Praticamente toda a produção de sementes comerciais é baseada em indivíduos *Pisifera*. Porém, devido a intempéries do meio, permanência em campo e idade avançada, estes indivíduos vêm sendo perdidos no decorrer dos anos. Este fato deverá comprometer sobremaneira o programa de produção de sementes comerciais do Brasil num futuro não muito distante. Como são poucos os indivíduos *Pisifera*, sua clonagem poderia permitir a substituição dos genitores ou então, aumentar a capacidade de produção de sementes pelo Brasil.

Assim, uma possibilidade para superar os obstáculos e avançar nos programas de melhoramento genético da cultura e nos programas de produção de mudas é a utilização de ferramentas biotecnológicas, como a clonagem (Scherwinski-Pereira et al. 2010; Silva et al. 2012). Desde os primeiros relatos de embriogênese somática (ES) em *E.*

*guineensis* (Raberchault et al. 1970; Staritsky 1970; Jones 1974; Raberchault e Martin 1976), vários estudos de ES têm sido conduzidos com a cultura voltados para o seu melhoramento genético ou reprodução de genótipos de interesse (Jones 1974; Teixeira et al. 1993; Teixeira et al. 1994; Konan et al. 2010; Scherwinski-Pereira et al. 2010; Soh et al. 2011; Silva et al. 2012; Balzon et al. 2013). Com isso, a ES se tornou uma das técnicas de propagação clonal mais promissoras dos últimos tempos, apresentando como vantagens a possibilidade de multiplicação em larga escala de genótipos superiores, obtenção de maior número de mudas que outras técnicas de propagação vegetativa e, conseqüente produção de plantas em espaço físico reduzido, além da possibilidade de armazenamento de propágulos por meio da criopreservação. Adicionalmente, a técnica pode ser uma importante ferramenta em programas de melhoramento genético da espécie, por poder acelerar a reprodução de cruzamentos de interesse e/ou auxiliar a fixação de ganhos genéticos em ciclos de seleções (Vicient e Martínez 1998; Konan et al. 2010; Soh et al. 2011).

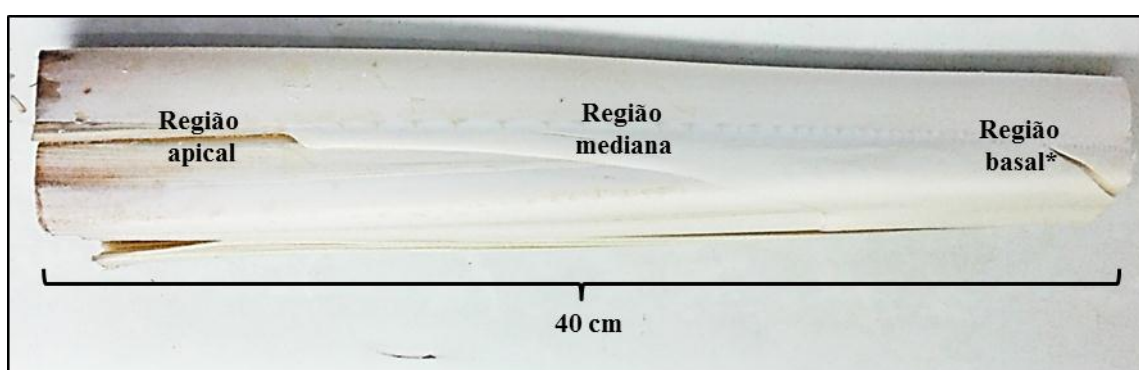
Na ES, células haplóides ou diplóides se desenvolvem a partir de diferentes estádios embriogênicos característicos para formar uma estrutura bipolar, conhecida como embrião somático, o qual não apresenta conexão vascular com o tecido materno e pode formar uma nova planta completa, sem que ocorra a fusão de gametas (Williams e Maheswaran 1986; Raemakers et al. 1995). Durante este processo, a formação dos embriões somáticos pode ocorrer por duas formas: a direta e a indireta. No primeiro caso, células programadas para a diferenciação ou já diferenciadas adquirem competência embriogênica e formam embriões somáticos sem passarem pelo estágio de formação de calos. Já no segundo, as células passam pelo estágio de formação de calos para posterior diferenciação em embriões somáticos (Sharp et al. 1980; Guerra et al. 1999).

Na literatura, há somente um relato abordando a embriogênese somática em *Pisifera* a partir de inflorescências imaturas (Teixeira et al. 1994), não sendo encontrados trabalhos que comparam a resposta de diferentes genótipos a partir de tecidos somáticos de plantas adultas, partindo-se de explantes foliares. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar respostas de genitores *Pisifera* (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) inicialmente quanto a aquisição de competência embriogênica e, posteriormente, a regeneração de plantas por embriogênese somática. Durante o estudo,

a caracterização anatômica e histoquímica dos materiais também é avaliada, buscando-se caracterizar as diferentes etapas envolvidas no processo.

## 2 – Material e métodos

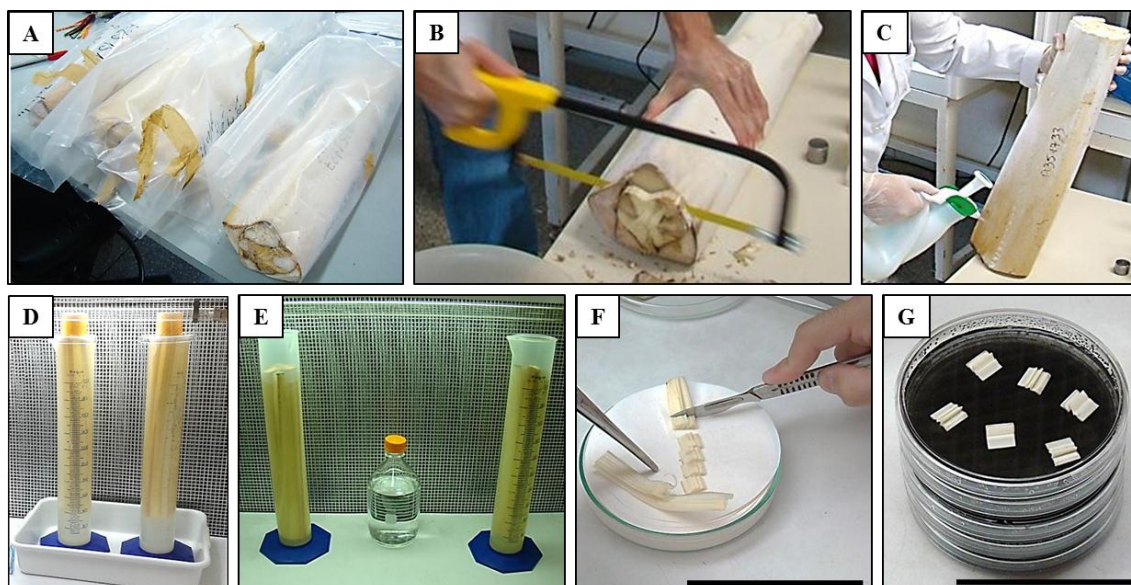
O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF. Explantes foliares aclorofilados de *E. guineensis* Jacq. var. *pisifera* foram coletados logo acima do meristema apical do palmito de quatro genótipos: A251424, A251427, A251512 e A251513 (Fig. 1). A coleta foi feita neste ponto, para evitar a perda por morte da planta.



**Figura 1.** Aspecto geral de um dos quatro palmitos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*) e as regiões utilizadas para o cultivo *in vitro*. \* Região basal não foi utilizada.

Os genótipos utilizados foram de plantas genitoras adultas, fornecedoras de pólen em cruzamentos controlados da espécie, tendo sido 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.

Quando coletados, os palmitos foram embalados em sacos plásticos e acondicionados em caixas de isopor, sendo imediatamente enviados por transporte aéreo até Brasília, DF. Uma vez recebidos no laboratório, o material foi reduzido para aproximadamente 30 cm e em seguida foi realizada aspersão com álcool 70% em cada palmito para sua manipulação em capela. Posteriormente foi iniciado o processo de desinfestação, onde primeiramente retirou-se as folhas mais externas, com auxílio de bisturi em câmara de fluxo laminar. O material foi submerso em solução de álcool (70%) por 3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e três lavagens em água destilada autoclavada (Fig. 2A-E).



**Figura 2.** Etapas do estabelecimento *in vitro* de folhas aclorofiladas de genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera*) para a indução da embriogênese somática. **A** – Palmitos de genótipos de dendezeiro recebidos em laboratório; **B** – eliminação da região basal fibrosa dos palmitos; **C** – aspersão de álcool 70% no palmito, antes de sua manipulação em câmara de fluxo laminar; **D** – material em condições de câmara de fluxo laminar submerso nas soluções de álcool 70% (3 min.) e hipoclorito de sódio 2,5% de cloro ativo (20 min.), respectivamente; **E** – enxágue do material com água destilada e autoclavada; **F** – folhas aclorofiladas sendo separadas e excisadas em explantes de tamanho de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>; e **G** – explantes foliares em número de seis por placa de petri inoculados em meio de cultura para indução da embriogênese somática. Barras: 8 cm.

### 2.1 – Indução de calos

Após o processo de desinfestação, explantes foliares de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foram inoculados com auxílio de pinças e bisturis em placas de petri (15 x 90 mm), contendo 25 mL de meio de cultura de indução de calos (MI) (Fig. 2F-G). Em cada placa, foram cultivados seis explantes foliares. O meio MI foi composto pelos sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glutamina, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma®), conforme Balzon et al. (2013). O meio de cultura teve o pH ajustado em 5,8±0,1 com 0,1 N de NaOH ou HCl, antes da adição do Phytigel, sendo em seguida esterilizado por autoclavagem a 121 °C em 1,3 atm de pressão por 20 minutos.

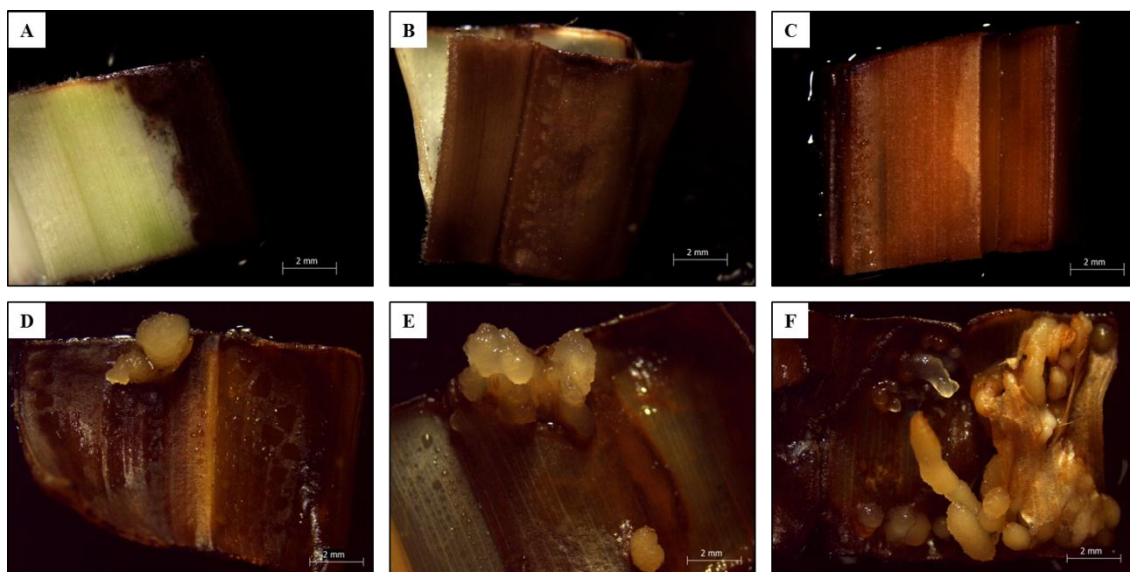
Uma vez em cultura, o material foi acondicionado em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C em condição de escuro por até 360 dias, com subcultivos a

cada 150 dias. O delineamento experimental utilizado nesta etapa foi o inteiramente casualizado, composto por pelo menos 100 repetições para cada genótipo, sendo cada parcela constituída de uma placa de petri contendo 6 explantes foliares.

### *2.1.1 – Coleta de dados durante a indução de calos*

Nesta etapa, os explantes foliares foram avaliados quanto à formação de calos e oxidação aos 90, 180, 270 e 360 dias. Também foram atribuídas notas (1, 3 e 5) durante cada avaliação para melhor caracterizar os processos de oxidação e formação de calos dos explantes, sendo oxidação com nota 1 caracterizada como inicial, onde o explante foliar apresentava as regiões da periferia oxidadas; nota 3 como oxidação parcial, em que o explante apresentava oxidação até a região central do mesofilo; e nota 5 como oxidação total do explante foliar, a qual era possível ser visualizada por todo o explante (Fig. 3A-C). Já para a formação de calos, os explantes foliares foram caracterizados da seguinte maneira: nota 1 caracterizava a baixa formação de calos em um dos lados e numa única região do explante foliar; nota 3 caracterizava a média formação de calos, os quais estavam distribuídos num dos lados do explante em mais de uma região; e nota 5 a qual se referia a alta formação de calos, estando estes distribuídos por todo o explante foliar (Fig. 3D-F).





**Figura 3.** Caracterização dos níveis de oxidação e da posição e intensidade de formação dos calos nos explantes foliares do genótipo A251424 de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*). **A-** oxidação com nota 1 (inicial); **B-** oxidação com nota 3 (parcial); **C-** oxidação com nota 5 (total); **D-** produção de calos nota 1 (baixa formação de calo em um dos lados do explante e numa única região); **E-** produção de calos nota 3 (média formação de calos distribuídos num dos lados do explante em mais de uma região); e **F-** produção de calos nota 5 (alta formação de calos distribuídos por todo o explante).

## 2.2 – Multiplicação de calos

Os calos obtidos a partir de 180 dias da etapa de indução foram coletados por meio de raspagem dos explantes foliares. Uma vez coletados os calos, os explantes foliares foram novamente colocados em placas de petri (15 x 90 mm) que continham 25 mL de meio MI para nova formação de calos, e novas coletas foram feitas também aos 270 e 360 dias.

Após a coleta, os calos foram pesados com auxílio de balança analítica de precisão, em condições assépticas, e transferidos para o meio de multiplicação de calos (MM), sem adição de carvão ativado, mas contendo 40  $\mu\text{M}$  de Picloram, 10  $\mu\text{M}$  de 2-isopenteniladenina (2iP) e 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  de Phytigel (Balzon et al. 2013). Neste meio de cultura, os calos permaneceram por 90 dias, em sala de crescimento à temperatura de  $25 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$  e no escuro. Em seguida, os calos foram avaliados quanto ao incremento de biomassa fresca por meio de nova pesagem em balança analítica de precisão e conforme a fórmula:  $P_c = \frac{P_f}{P_i}$ , onde:  $P_c$  é o peso do calo (incremento de biomassa fresca);  $P_f$  é o peso final do calo após 90 dias em meio MM; e  $P_i$  é o peso inicial do calo, após sua

coleta do explante foliar. Os dados de peso inicial obtidos foram utilizados para avaliar a influência do peso inicial sobre a multiplicação dos calos ao longo do tempo, a partir do estabelecimento de nove intervalos de classes, assim distribuídos: calos com peso entre 1,1 e 10,6 mg; 10,7 e 20,0 mg; 20,1 e 30,9 mg; 31,0 a 44,5 mg; 44,6 a 56,5 mg; entre 56,6 e 98,2 mg; 98,3 e 130,0 mg; 130,1 a 200,0 mg; e maior que 200,0 mg.

### 2.3 – Diferenciação de embriões somáticos

Os calos obtidos durante a etapa de multiplicação (90 dias) foram transferidos para novas placas de petri (15 x 90 mm), as quais continham 25 mL de meio de diferenciação de embriões somáticos (MD). Este meio foi composto por sais e vitaminas do meio de MS e suplementado com 12,3  $\mu\text{M}$  de 2iP, 0,54  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenoacético (ANA) e de 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  de Phytigel, sem a adição de carvão ativado (Balzon et al. 2013). Nesta etapa, o material foi mantido em sala de crescimento nas mesmas condições de temperatura e ausência de luz descritas anteriormente, até o início de diferenciação dos embriões somáticos.

### 2.4 – Regeneração de embriões somáticos

Embriões somáticos diferenciados foram transferidos para tubos de ensaio tamanho médio contendo 10 mL de meio de regeneração de embriões somáticos (MR). Este meio foi constituído pelo meio de MS, 2,5  $\text{g.L}^{-1}$  de Phytigel e carvão ativado e desprovido de reguladores de crescimento (Balzon et al. 2013). O material foi acondicionado em sala de crescimento à  $25 \pm 2$  °C com intensidade luminosa de 52  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e, nestas condições, mantidos para continuarem seu desenvolvimento. Registros fotográficos para caracterizar o desenvolvimento dos embriões somáticos em relação ao tempo foram feitos em estereoscópio (Leica, Mod. EZ4 HD) acoplado ao computador contendo software para captura de imagens (Software LAS EZ 2.0).

## 2.5 – Análise de dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com as médias dos diferentes genótipos comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para as análises, utilizou-se o programa de análises estatísticas Sisvar 4.4 (Ferreira 2011).

## 2.6 – Análises morfo-anatômicas e histoquímicas

A análise morfológica dos diferentes tipos de calos obtidos foi realizada durante a etapa de indução de calos de forma visual e com auxílio de um estereoscópio (Leica, Mod. EZ4 HD), acoplado ao computador contendo software de captura de imagens (Software LAS EZ 2.0). Para a análise anatômica e histoquímica, amostras de cada tipo de calo foram coletadas, fixadas, desidratadas e emblocadas conforme protocolo a seguir. A fixação foi realizada em FAA 70% (formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool etílico 70%, 1:1:18 v/v) (Johansen 1940), durante 24 h, com uso da bomba a vácuo; a desidratação em série etanólica crescente (70-100%, 1 hora cada) e a infiltração em historresina (Leica, Heidelberg, Germany), seguindo as especificações do fabricante. Utilizando-se micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), cortes seriados longitudinais e transversais de 7 µm foram obtidos, distendidos e aderidos às lâminas microscópicas com uso de placa aquecedora a 40 °C. Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,5%) (O'Brien et al. 1964). Testes histoquímicos também foram realizados para verificar a presença de proteínas e amido, respectivamente, utilizando-se Xilidine Ponceau (XP) e Lugol (Johansen 1940; Vidal 1969).

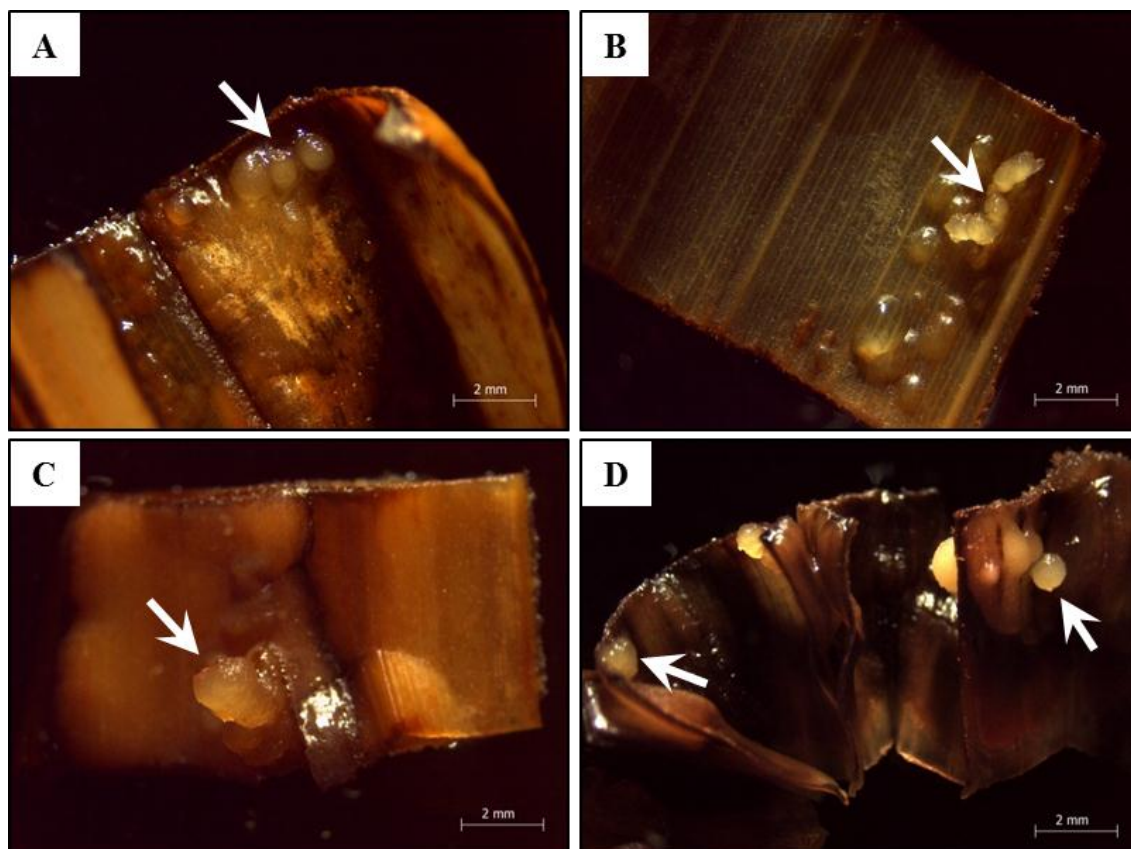
As imagens foram registradas por meio de microscópio (Leica, Mod. DM 300) acoplado ao computador contendo software de captura de imagens (Software LAS EZ 2.0). As mesmas análises foram realizadas nas etapas posteriores da embriogênese somática, ou seja, multiplicação de calos, diferenciação e regeneração de embriões somáticos.

### 3 – Resultados e discussão

#### 3.1 – Indução de calos

A análise dos genótipos mostrou o surgimento dos calos primários aos 180 dias de cultivo (Fig. 4). Ao longo do tempo (180, 270 e 360 dias), a indução de calos apresentou resultados estatisticamente superiores para o genótipo A251424 em relação aos demais genótipos. Nos genótipos A251427 e A251513, os resultados foram estatisticamente iguais na indução de calos nos tempos 180, 270 e 360 dias de cultivo. Nestes mesmos tempos de cultivo, o genótipo A251512 foi o menos responsivo à indução de calos, mantendo-se com valores estáveis e próximos de zero (Tabela 1).

Diferentes respostas quanto à formação de calos em diferentes genótipos de *E. guineensis* também têm sido relatadas na literatura (Sanputawong e Te-chato 2008; Thawaro e Te-chato 2009; Thuzar et al. 2011; Silva et al. 2012; Jayanthi et al. 2015). De fato, a frequência de indução de calos com competência embriogênica não depende somente das condições de cultivo, como por exemplo, os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, mas também e principalmente dos genótipos (Jiménez 2001; Rival e Parveez 2004; Thuzar et al. 2012; Constantin et al. 2015). O certo é que a taxa de indução de calos em *E. guineensis* geralmente é baixa (menor que 5%) devido a respostas diferentes entre os genótipos, mesmo sob condições semelhantes de cultivo (Soh et al. 2011; Constantin et al. 2015).



**Figura 4.** Formação de calos primários (setas brancas) em explantes foliares de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) aos 180 dias de cultivo. **A-** genótipo A251424; **B-** genótipo A251427; **C-** genótipo A251512; e **D-** genótipo A251513.

Com relação à oxidação, os explantes foliares apresentaram níveis altos, a partir dos 90 dias de cultivo (acima de 80%), não tendo sido observadas diferenças estatísticas significativas entre os genótipos (Tabela 1). A produção de compostos fenólicos normalmente inibe o crescimento e desenvolvimento dos explantes, que podem ser levados à morte (Costa et al. 2006). Com isso, alguns autores indicam a adição de carvão ativado ao meio de indução devido à sua capacidade de adsorver compostos, como metabólitos secundários e reguladores de crescimento, a fim de minimizar o processo de oxidação e também induzir a germinação de embriões somáticos e ou zigóticos (Fridborg et al. 1978; Owen et al. 1991; Teixeira et al. 1993; Teixeira et al. 1994; Dumas e Monteuis 1995; Pan e Van Staden 1998; Thomas 2008; Scherwinski-Pereira et al. 2010; Suranthran et al. 2011; de Carvalho Silva et al. 2012; Scherwinski-Pereira et al. 2012).

**Tabela 1.** Formação de calos e oxidação dos explantes em quatro genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) avaliados em diferentes tempos de cultivo.

| Genótipo                    | Tempo de cultivo (dias) |              |              |              | Total acumulado<br>ao final das re-coletas |
|-----------------------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--|
|                             | 90                      | 180          | 270          | 360          |  |
| <b>Formação de calo (%)</b> |                         |              |              |              |  |
| <b>A251424*</b>             | 0,0±0,0 aC              | 11,4±2,09 aB | 20,6±2,88 aA | 13,8±2,60 aB | 45,8±5,83                                  |
| <b>A251427</b>              | 0,0±0,0 aB              | 2,7±1,09 bA  | 4,3±1,27 bA  | 4,3±1,27 bA  | 11,3±2,78                                  |
| <b>A251512</b>              | 0,0±0,0 aA              | 0,2±0,17 bA  | 0,2±0,17 cA  | 0,2±0,17 cA  | 0,6±0,39                                   |
| <b>A251513</b>              | 0,0±0,0 aB              | 0,6±0,33 bB  | 2,9±0,79 bA  | 4,2±0,90 bA  | 7,7±1,42                                   |
| <b>Oxidação (%)</b>         |                         |              |              |              |  |
| <b>A251424</b>              | 96,9±1,52 aA            | 100,0±0,0 aA | 100,0±0,0 aA | 100,0±0,0 aA | 100,0±0,0                                  |
| <b>A251427</b>              | 80,1±3,16 aA            | 90,9±2,98 aA | 90,9±2,98 aA | 90,9±3,11 aA | 90,9±3,11                                  |
| <b>A251512</b>              | 84,9±2,89 aA            | 87,0±3,49 aA | 87,0±3,49 aA | 87,0±3,49 aA | 87,0±3,49                                  |
| <b>A251513</b>              | 88,6±2,68 aA            | 88,6±2,68 aA | 99,4±0,52 aA | 99,4±0,52 aA | 99,4±0,52                                  |

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúsculas na vertical (entre os genótipos dentro de cada tempo de cultivo) e maiúsculas na horizontal (entre os tempos dentro de cada genótipo) ± erro padrão, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). \*Indica o genótipo no qual foram feitas re-coletas dos calos nos explantes a partir de 180 dias de indução, justificando a menor formação de calos aos 360 dias.

### 3.1.1 – Coleta de dados durante a indução de calos

Somente o genótipo A251424 apresentou calos classificados em três notas de acordo com sua posição e intensidade de formação nos explantes foliares ao longo do tempo (90 a 360 dias), ou seja, calo com nota 1 (baixa formação de calo em um dos lados do explante e numa única região), 3 (média formação de calos distribuídos num dos lados do explante em mais de uma região) e 5 (alta formação de calos distribuídos por todo o explante). Destes, o calo de nota 1 foi o único diferente quando comparado aos demais genótipos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Classificação dos calos em notas (1, 3 e 5\*) quanto à sua posição e intensidade de formação nos explantes foliares dos genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) avaliados nos diferentes tempos de cultivo.

| Genótipo  | Tempo (dias) | Nota quanto ao tipo de calo (%) |           |           |
|-----------|--------------|---------------------------------|-----------|-----------|
|           |              | 1                               | 3         | 5**       |
| A251424** | 90           | -----                           | -----     | -----     |
|           | 180          | 66,7±10,81                      | 23,7±9,64 | 9,6±5,88  |
|           | 270          | 58,9±8,85                       | 12,7±6,06 | 28,4±7,86 |
|           | 360          | 80,3±7,78                       | 11,2±5,68 | 8,5±5,11  |
| A251427   | 90           | -----                           | -----     | -----     |
|           | 180          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |
|           | 270          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |
|           | 360          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |
| A251512   | 90           | -----                           | -----     | -----     |
|           | 180          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |
|           | 270          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |
|           | 360          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |
| A251513   | 90           | -----                           | -----     | -----     |
|           | 180          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |
|           | 270          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |
|           | 360          | 100,0±0,0                       | 0,0±0,0   | 0,0±0,0   |

\*1 (baixa formação de calos); 3 (média formação de calos); 5 (alta formação de calos); \*\*Indica o genótipo no qual foram feitas re-coletas dos calos nos explantes a partir de 180 dias de indução, justificando a menor formação de calos com nota 5 aos 360 dias.

Para caracterizar os níveis de oxidação nos explantes foliares de cada genótipo ao longo do tempo de cultivo (90 a 360 dias), notas foram atribuídas durante as avaliações dos explantes na etapa de indução de calos. Assim, aos 90 dias de cultivo os genótipos apresentaram mais de 11% dos explantes com oxidação inicial (nota 1), a qual evoluiu para oxidação total (nota 5) em até 82% dos explantes neste período. Aos 360 dias de indução, todos os genótipos apresentaram oxidação total entre 90 e 100% dos explantes (Tabela 3).

Em palmeiras, a oxidação dos tecidos em cultivo *in vitro* é um acontecimento recorrente (Sugimura e Salvaña 1989; Teixeira et al. 1994; Sáenz et al. 2006) e já foi descrita para várias espécies (Verdeil et al. 1994; Fki et al. 2003; Steinmacher et al. 2007), assim como em *E. guineensis* (Teixeira et al. 1994). A liberação de compostos fenólicos *in vitro*, logo após a injúria do tecido, resulta na oxidação do explante (Van Winkle et al. 2003) e isto poderia ser um dos motivos para a redução da formação de calos primários *in vitro* das palmeiras (Viñas e Jiménez 2011). Porém, em alguns casos, a oxidação parece ser um requisito para a formação de calos, podendo assim não ser prejudicial às culturas (Silva et al. 2012; Jayanthi et al. 2015). No presente estudo, foi observado que a formação de calos ocorria durante ou após um evento de oxidação do explante.



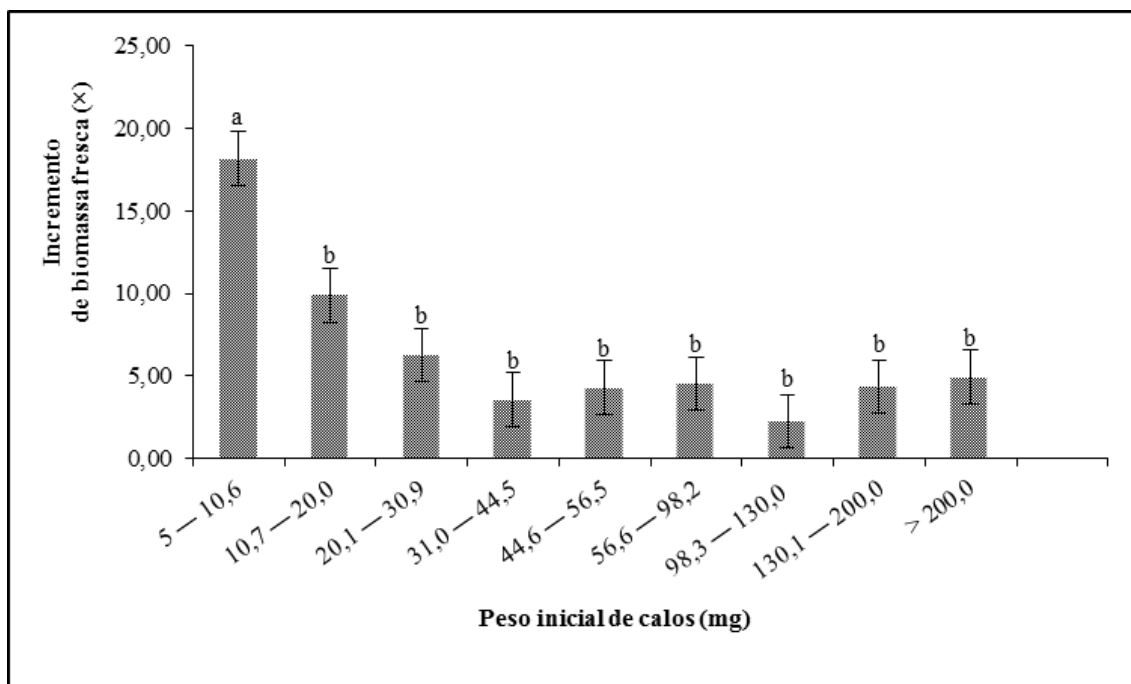
**Tabela 3.** Classificação da oxidação em notas\* (1, 3 e 5), de acordo com a distribuição em explantes foliares de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) avaliados nos diferentes tempos de cultivo.

| Genótipo | Tempo (dias) | Nota de oxidação (%) |             |             |
|----------|--------------|----------------------|-------------|-------------|
|          |              | 1                    | 3           | 5           |
| A251424  | 90           | 21,8±3,86 a          | 7,7±2,74 b  | 70,5±4,58 c |
|          | 180          | 1,2±0,71 c           | 0,0±0,0 c   | 98,8±0,71 a |
|          | 270          | 0,0±0,0 c            | 0,0±0,0 c   | 100,0±0,0 a |
|          | 360          | 0,0±0,0 c            | 0,0±0,0 c   | 100,0±0,0 a |
| A251427  | 90           | 11,2±2,50 c          | 6,6±1,82 b  | 82,2±3,14 b |
|          | 180          | 1,1±0,54 c           | 3,3±1,24 c  | 95,6±1,51 a |
|          | 270          | 1,3±0,96 c           | 0,4±0,31 c  | 98,3±1,01 a |
|          | 360          | 0,0±0,0 c            | 0,0±0,0 c   | 100,0±0,0 a |
| A251512  | 90           | 14,3±2,61 b          | 7,1±1,77 b  | 78,6±3,02 c |
|          | 180          | 0,0±0,0 c            | 0,0±0,0 c   | 100,0±0,0 a |
|          | 270          | 0,0±0,0 c            | 0,0±0,0 c   | 100,0±0,0 a |
|          | 360          | 0,0±0,0 c            | 0,0±0,0 c   | 100,0±0,0 a |
| A251513  | 90           | 28,0±0,0 a           | 17,0±0,0 a  | 55,0±0,0 d  |
|          | 180          | 27,9±4,13 a          | 16,5±2,68 a | 55,6±4,32 d |
|          | 270          | 6,0±1,94 c           | 6,5±2,15 b  | 87,5±2,89 b |
|          | 360          | 2,6±1,19 c           | 6,8±2,25 b  | 90,6±2,54 b |

Médias seguidas por letras distintas dentro de cada item, minúsculas na vertical (entre os genótipos dentro de cada tempo de cultivo e tipo de oxidação) ± erro padrão, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). \*Notas: 1 (oxidação inicial do explante); 3 (oxidação parcial do explante); 5 (oxidação total do explante).

### 3.2 – Multiplicação de calos

Dos genótipos avaliados, o A251424 foi o que apresentou a maior taxa de formação de calos na etapa de indução, os quais foram utilizados para a etapa de multiplicação. É possível observar que durante 90 dias em meio de multiplicação (MM), calos com peso inicial de até 10 mg (primeiro intervalo de classe) apresentaram maior incremento de biomassa fresca e diferiram estatisticamente quando comparados às demais classes, que mostram menores incrementos (Fig. 5).



**Figura 5.** Incremento de biomassa fresca em função do peso inicial de calos representado por intervalos de classe para os calos do genótipo A251424 em dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*), após 90 dias de cultivo em meio de multiplicação. Médias seguidas por letras distintas  $\pm$  erro padrão, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

De Touchet et al. (1991) trabalhando com culturas embriogênicas em suspensão de *E. guineensis* por até 18 meses, observaram aumento no incremento de biomassa fresca de até 4 vezes para calos com peso inicial entre 0,05 e 0,1 g (50 e 100 mg), e com o meio de cultura sendo renovado a cada 4-6 semanas. Esses dados são semelhantes aos observados no presente trabalho entre 1,1 e 10,7 mg em 3 meses de cultivo. Por outro lado, estes mesmos autores verificaram que se utilizando calos com peso inicial a partir de 0,3 g (300 mg) há uma diminuição no incremento de biomassa fresca.

Sumaryono et al. (2007) utilizando sistema de imersão temporário para crescimento de calos e diferenciação de embriões somáticos em dendezeiro, observaram incrementos de até duas vezes para calos com peso inicial de 0,5 g (500 mg) num período de 4 semanas. Este aumento foi contínuo por até 6 semanas, mas diminuiu a partir da oitava semana de cultivo. Segundo os autores, esta taxa de incremento depende do peso inicial do calo a ser utilizado.

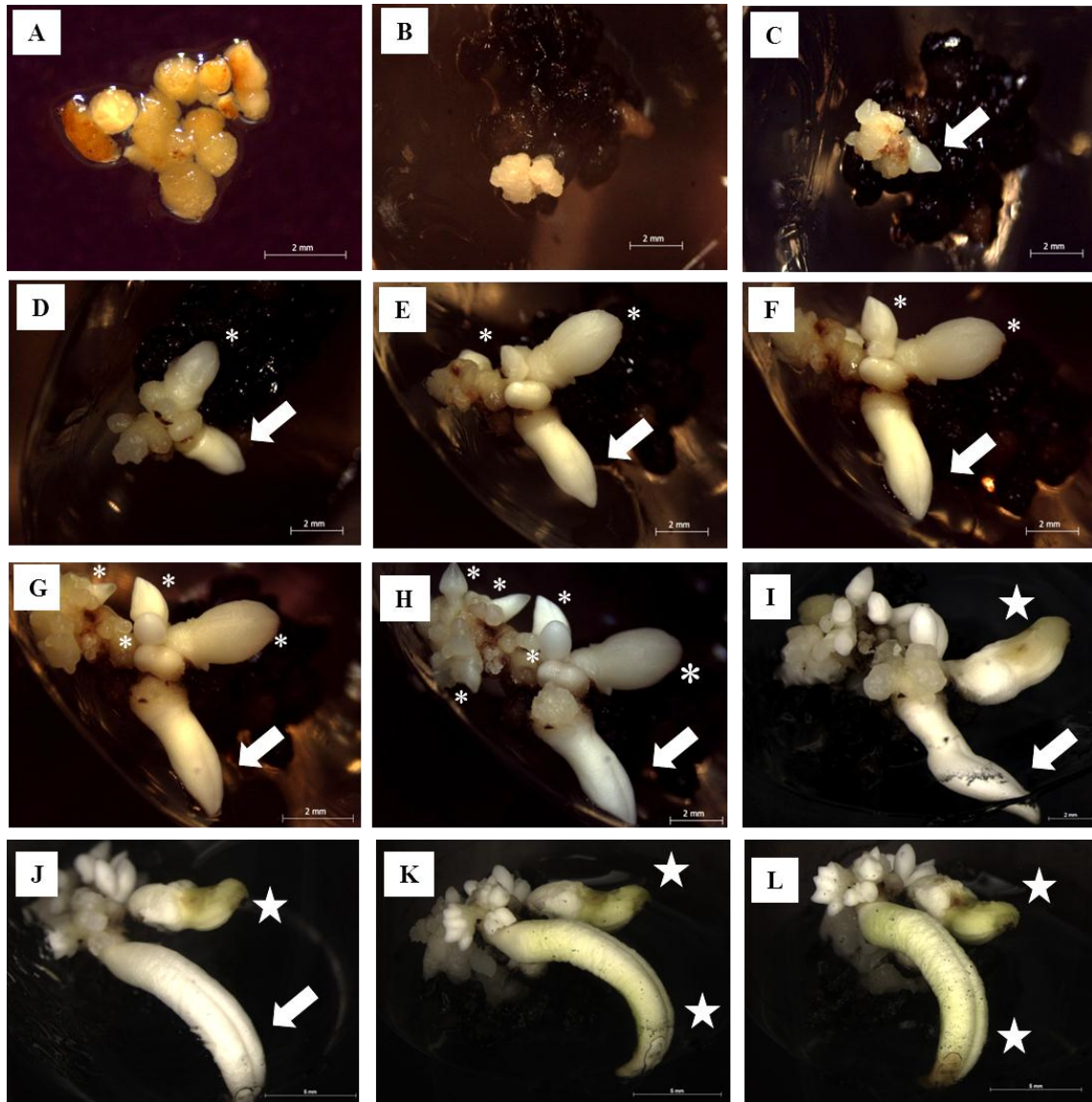
Estudos de Teixeira et al. (1995), Tarmizi et al. (2008) e Marbun et al. (2015) também apresentaram as mesmas respostas com relação ao incremento de biomassa para calos em suspensão com mais de 300 mg de peso fresco inicial e utilizados para a

multiplicação em diferentes sistemas. Os resultados do presente estudo estão em acordo com aqueles obtidos pelos autores em questão, mostrando que, de maneira geral, quanto maior o peso dos calos, menor será o seu incremento em biomassa fresca.

### 3.3 – Diferenciação e regeneração de embriões somáticos

Após 90 dias em meio de MM, calos nodulares amarelados (Fig. 6A) foram transferidos para o meio de diferenciação (MD). Aos 90 dias em meio MD, quando já embriogênicos, estes calos se diferenciaram em embriões somáticos (Fig. 6B-C). O material permaneceu em meio MD por aproximadamente 130 dias (Fig. 6D-H) quando agregados de embriões somáticos puderam ser observados. Uma vez diferenciados, os embriões somáticos foram transferidos para o meio de regeneração (MR) e continuaram seu desenvolvimento, inclusive com o surgimento de novos embriões somáticos com o passar do tempo (Fig. 6 I-L).

Balzon et al. (2013) observaram a formação de calos nodulares a partir de embriões zigóticos. Estes calos, depois de multiplicados, também permaneceram durante 12 semanas (90 dias) em meio de diferenciação de embriões, gerando, assim, os primeiros embriões somáticos. Konan et al. (2010) em estudo sobre conservação de embriões somáticos obtidos de folhas do palmito em dendezeiro também observaram o surgimento destes após permanência dos calos nodulares durante 90 dias em MD. Em outros estudos, também foi constatada a formação de embriões a partir de calos nodulares (Kanchanapoom e Domyoas 1999; Silva et al. 2012; Silva et al. 2014a; Constantin et al. 2015).



**Figura 6.** Diferenciação e regeneração de embriões somáticos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) ao longo do tempo de cultivo em meios de diferenciação e regeneração. **A:** calos nodulares amarelados em meio de multiplicação, após 90 dias; **B - C:** calos embriogênicos e embrião somático torpeda (seta branca) em início de desenvolvimento, respectivamente, a partir de calos nodulares amarelados submetidos ao meio de diferenciação por 90 dias; **D - H:** desenvolvimento do embrião somático (seta branca) aos 30, 71, 90, 113 e 130 dias, e surgimento de novos embriões (\*) em meio de diferenciação; **I - L:** desenvolvimento de embriões somáticos aos 150, 163, 177 e 192 dias em meio de regeneração e início do esverdeamento dos primeiros embriões somáticos (estrela branca), indicando início da regeneração.

### 3.4 – Análises morfo-anatômicas e histoquímicas

#### 3.4.1 – Indução de calos

Após 180 dias em meio de indução, foi observada a ocorrência de quatro tipos de calos, os quais foram classificados como: alongados, nodulares branco, nodulares amarelados e esponjosos (Fig. 7A-D). A análise histológica demonstrou em todos os calos, células meristemáticas intensamente coradas na região meristemática, local de ocorrência de alta divisão celular. Nestes mesmos calos foram observadas células vacuoladas na periferia da região meristemática, levemente coradas, com características parenquimáticas e de aspecto desuniforme (Fig. 7E-H). Nota-se nesta mesma região e em cada tipo de calo (Fig. 7I-L) a presença de núcleos e nucléolos bem evidentes (setas).

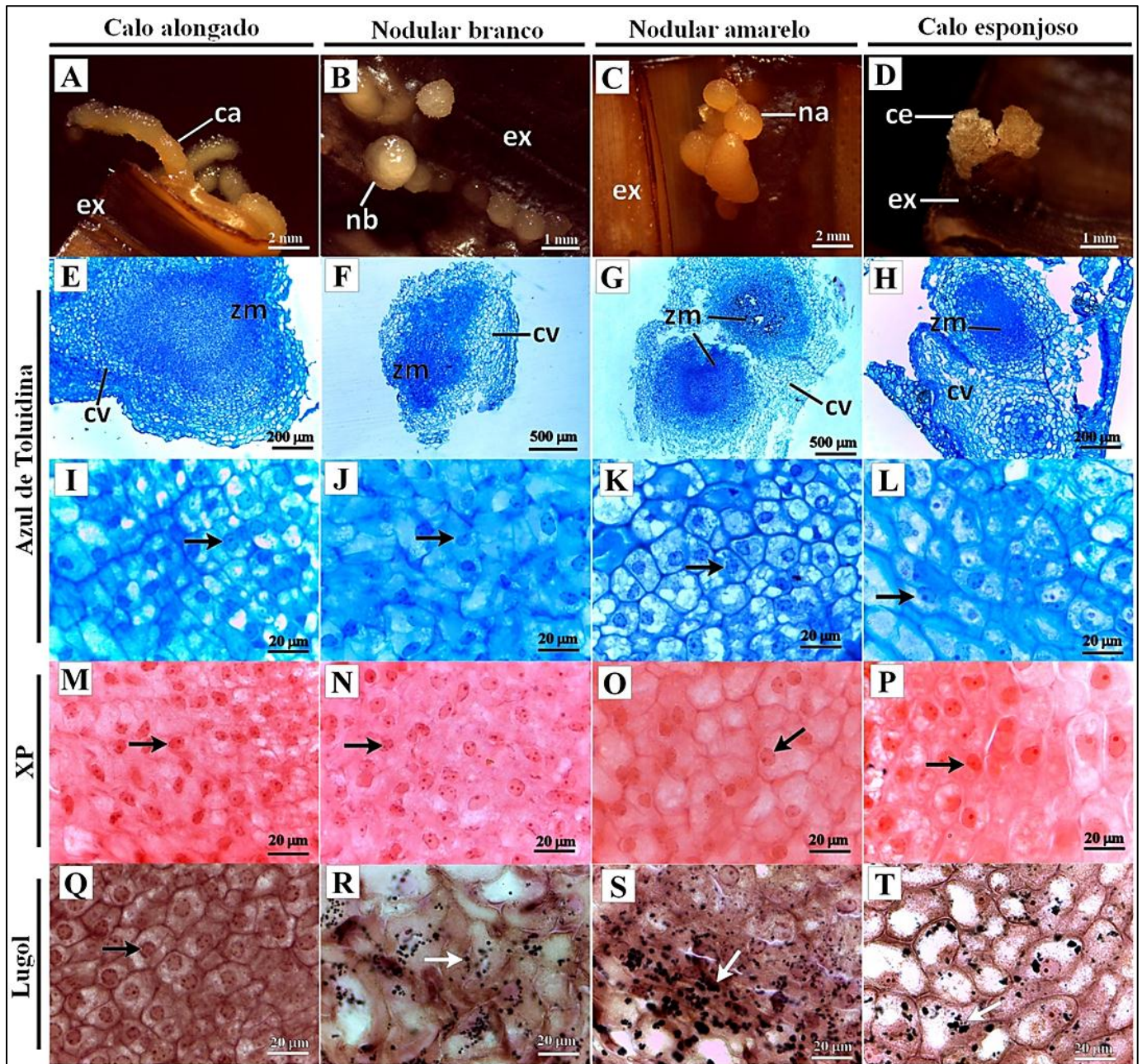
Kanchanapoom e Domyoas (1999) observaram a ocorrência de células pequenas, citoplasma denso e núcleos bem corados em estudo histológico utilizando calos formados a partir de embriões zigóticos de dendê. Os autores também verificaram centros de atividade meristemática, onde as células eram menores do que em outras partes do calo e coravam mais intensamente, além de conterem núcleos proeminentes. Mesmo em se tratando de estruturas diferentes – calos a partir de embriões zigóticos para os autores da literatura e calos formados de explantes foliares do palmito no presente estudo – dadas as suas similaridades, as células observadas em ambos os casos são características do processo de ES.

O teste histoquímico não mostrou a presença de proteínas de reserva, embora as zonas com características meristemáticas fossem coradas evidenciando os núcleos celulares indicados pelas setas (Fig. 7M-P). Rocha et al. (2012), em estudo com embriões zigóticos de *Passiflora cincinnata* Masters, relataram que as reservas proteicas foram totalmente consumidas quando as células epidérmicas adquiriram características meristemáticas.

Grãos de amido não foram detectados no calo alongado (Fig. 7Q), mas foram evidentes nos calos nodulares brancos, amarelados e esponjosos (setas brancas) (Fig. 7R-T). A reserva de amido apareceu tanto nos plastídios das células evidentes no calo nodular branco, quanto nas células vacuoladas, evidentes no calo nodular amarelado e esponjoso (Fig. 7R-T), estando mais adensada no segundo (Fig. 7S). Pádua et al. (2013)

também observaram o acúmulo de amido em calos nodulares beges, que neste estudo foi caracterizado como nodular amarelado.

Outros trabalhos também constataram a presença de grãos de amido como marcadores bioquímicos da aquisição de competência embriogênica por células individuais, das quais se originaram os embriões somáticos (Thomas et al. 1972; Kanchanapoom e Domyoas 1999; Verdeil et al. 2001). Considerando que os primeiros embriões somáticos surgiram a partir do calo nodular amarelado, possivelmente seja necessário que o amido esteja presente em grandes quantidades no tecido durante a transição calo embriogênico para o embrião somático. Outros autores relataram que a reserva de amido durante a ES em palmeiras está frequentemente relacionada à diferenciação das células embriogênicas (Schwendiman et al. 1988).



**Figura 7.** Caracterização morfo-anatômica e histoquímica dos diferentes tipos de calos observados durante a indução da embriogênese somática em dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*) aos 180 dias de cultivo. **A:** calo alongado; **B:** nodular branco; **C:** nodular amarelado; **D:** calo esponjoso; **E - H:** corte transversal dos quatro tipos de calos corados com azul de toluidina mostrando regiões meristemáticas e células vacuoladas; **I - L:** visualização de células com características meristemáticas (setas pretas indicam núcleos evidentes); **M - P:** células da zona meristemática coradas com XP (setas pretas indicando núcleos); **Q:** células com núcleo evidente (seta preta) coradas com lugol e ausência de amido; **R - T:** visualização de grãos de amido (setas brancas) nas células meristemáticas e parenquimáticas. **Ca:** calo alongado; **nb:** calo nodular branco; **na:** calo nodular amarelado; **ce:** calo esponjoso; **ex:** explante; **cv:** células vacuoladas; **zm:** zona meristemática.

### 3.4.2 – Multiplicação de calos

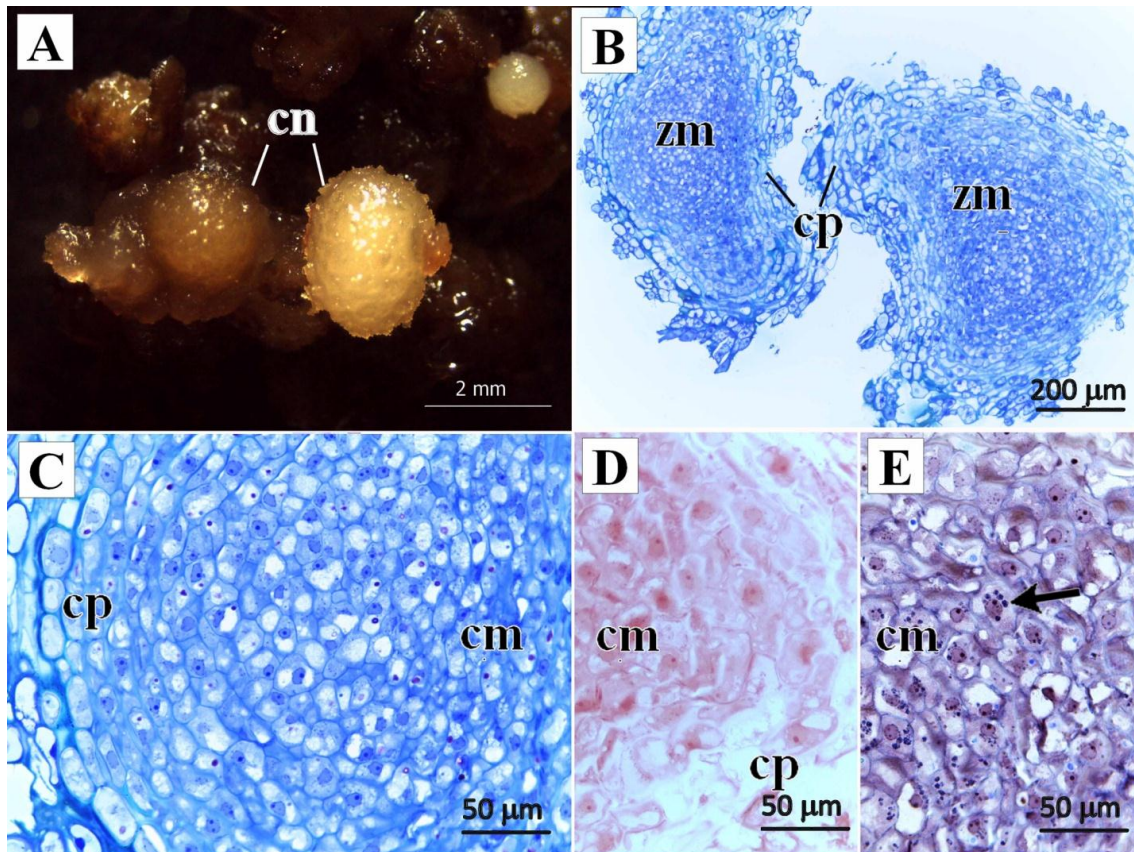
Com 90 dias em meio de multiplicação, calos nodulares de coloração amarelada (Fig. 8A) foram submetidos às análises histológicas e histoquímicas. Na análise histológica duas regiões foram evidentes nos calos: a zona meristemática, contendo células meristemáticas intensamente coradas, e a região periférica apresentando células parenquimáticas levemente coradas (Fig. 8B). As células da zona meristemática, além da presença de vacúolos, possuem núcleos e nucléolos bem evidentes e uma parede celular delgada, diferentemente das células parenquimáticas, que apresentam aspecto desuniforme, vacúolos preenchendo todo seu espaço interno e parede celular espessa (Fig. 8C).

Resultados semelhantes foram observados quando a embriogênese somática foi obtida a partir de inflorescências imaturas de coco (Verdeil et al. 1994; 2001). Em seu estudo, os autores observaram que a zona meristemática se caracterizava pela presença de células com núcleo central aumentado, nucléolo proeminente e pequenos vacúolos. Já a região periférica era composta por células individualizadas com citoplasma denso, grandes vacúolos e também a ocorrência de células degenerativas, o que caracteriza o desenvolvimento do calo. A presença de citoplasma denso e nucléolos bem evidentes indicam a aquisição de competência embriogênica (Moura et al. 2008; Silva et al. 2014b).

Na análise histoquímica não foram detectadas proteínas de reserva nesta etapa do processo de ES no calo nodular, sendo possível apenas a observação de núcleos, nucléolos e vacúolos citoplasmáticos nas células (Fig. 8D). Por outro lado, na análise com lugol verificou-se grãos de amido distribuídos nos plastídios das células meristemáticas (setas pretas) (Fig. 8E).

Amido também foi observado em calos de coco e explantes foliares de dendezeiro submetidos ao processo de ES (Verdeil et al. 2001; Pádua et al. 2013). É possível que os grãos de amido estejam substituindo a reserva de proteínas nos estágios iniciais da embriogênese (Rocha et al. 2012). Alguns autores relatam que a formação de amido durante a embriogênese *in vitro* é devido, em parte, à presença de sacarose no meio de cultura, pois os altos níveis deste açúcar no citosol estimula a síntese de amido (Pinto et al. 2010).





**Figura 8.** Caracterização morfo-anatômica e histoquímica de calos nodulares amarelados de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*), coletados após 90 dias em meio de multiplicação. **A:** calo nodular amarelado; **B:** Visão geral do calo nodular amarelado corado com Azul de Toluidina; **C:** células parenquimáticas e meristemáticas coradas com Azul de Toluidina; **D:** células parenquimáticas e meristemáticas coradas com Xilidine Ponceau; **E:** células meristemáticas apresentando grãos de amido intensamente corados com Lugol (seta preta); **cn:** calo nodular amarelado; **zm:** zona meristemática; **cp:** células parenquimáticas; **cm:** células meristemáticas.

### 3.4.3 – Diferenciação de calos

Calos embriogênicos friáveis, com superfícies irregulares (Fig. 9A) foram coletados para análise durante a etapa de diferenciação de calos. De maneira geral, a análise histológica evidenciou a presença de células embriogênicas em toda superfície do calo e pró-embriões distribuídos na periferia (Fig. 9B). Intensa formação de pró-embriões também foi observada na periferia de calos embriogênicos, que foram obtidos na ES a partir de embriões zigóticos de dendezeiro (Thuzar et al. 2011; Silva et al. 2012; Silva et al. 2014b).

As células embriogênicas são caracterizadas pela presença de parede celular delgada que as separam (Fig. 9C – seta), núcleo celular acompanhado de nucléolo, e é

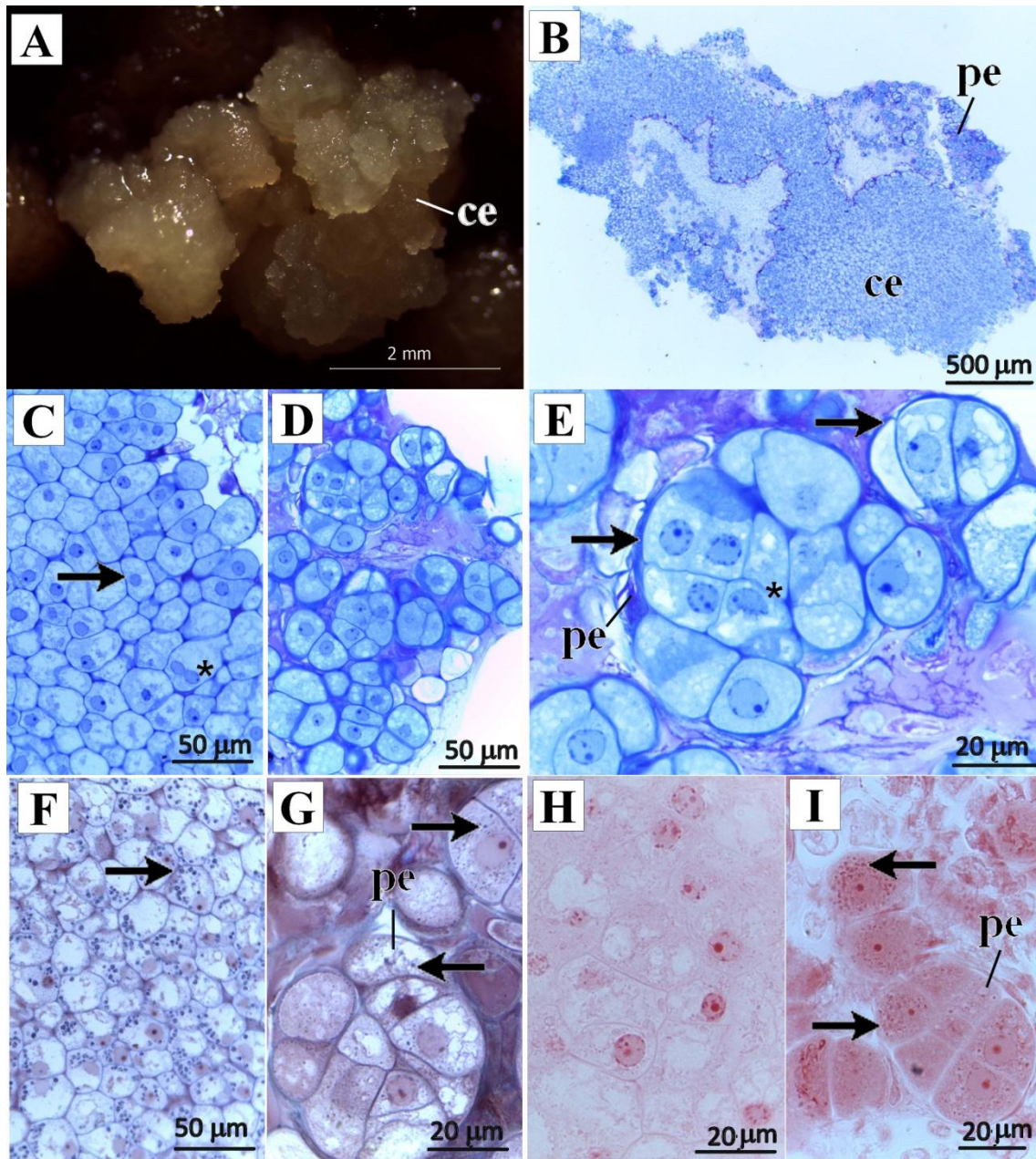
possível notar, em alguns casos, a presença de dois núcleos em uma mesma célula (Fig. 9C – asterisco), o que caracteriza o processo de divisão celular. Os pró-embriões (Fig. 9D-E) são compostos por duas ou mais células embriogênicas agrupadas (Fig. 9E – asterisco), e também apresentam núcleo e nucléolo bem evidentes, delimitados uns dos outros pela parede celular espessa (Fig. 9E – seta). Os resultados corroboram aqueles encontrados na literatura, em que a parede celular que rodeia cada pró-embrião é mais espessa do que as paredes das células internas (Verdeil et al. 1994; 2001).

Na análise histoquímica, os grãos de amido representados pela seta preta na Fig. 9F, são bem evidentes nos plastídios de células embriogênicas que ocupam a região central do calo embriogênico. Já os pró-embriões apresentam grãos de amido menos evidentes, quase ausentes (Fig. 9G – setas) no citoplasma de suas células, possivelmente devido à sua degradação e uso.

O acúmulo de grãos de amido também foi observado no meristema fundamental de calos obtidos a partir de embrião zigótico em macaúba, principalmente naquelas células que apresentavam citoplasma menos denso, mas não foram encontrados nos pró-embriões (Moura et al. 2008). A presença de grãos de amido ao redor do núcleo de células embriogênicas já foi relatada por outros autores (Scherwinski-Pereira et al. 2012), sendo esta uma característica que as células apresentam quando adquirem competência para formarem pró-embriões (Lu e Vasil 1985; Schwendiman et al. 1988; Verdeil et al. 2001; Sané et al. 2006; Balzon et al. 2013). Dessa forma, o amido pode ser considerado um indicador do desenvolvimento dos tecidos em direção à ES (Thomas et al. 1972; Lu e Vasil 1985).

Proteínas de reserva não foram evidenciadas nas células embriogênicas (Fig. 9H), mas foram evidentes no citoplasma das células dos pró-embriões, sendo representadas pelas setas pretas (Fig. 9I). É possível que o armazenamento de proteínas inicie durante a formação dos pró-embriões e, posteriormente, elas sejam utilizadas como compostos de reserva para o desenvolvimento do embrião. Verdeil et al. (1994) relatam a presença de reservas proteicas nas células embriogênicas, mas que desaparecem destas com o desenvolvimento de pró-embriões. Outros autores relatam que as proteínas estão envolvidas nos processos de expansão celular e são comumente consumidas durante a indução da embriogênese e disponibilizadas para a rediferenciação de células somáticas (Cangahuala-Inocente et al. 2009). Assim, é

importante ressaltar que compostos de reserva são necessários para a reorganização e diferenciação celular (Zienkiewicz et al. 2011).



**Figura 9.** Caracterização morfo-anatômica e histoquímica de calos embriogênicos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*), coletados após 90 dias em meio de diferenciação. **A:** calo embriogênico; **B:** Visão geral do calo embriogênico corado com Azul de Toluidina mostrando a localização das células embriogênicas e pró-embriões; **C:** células embriogênicas com parede celular delgada (seta preta) e núcleo em divisão (asterisco); **D:** visão geral de pró-embriões corados com Azul de Toluidina; **E:** pró-embriões com parede celular espessa (setas pretas) e compostos por duas ou mais células embriogênicas (asterisco). **F:** visualização dos grãos de amido (seta preta) distribuídos nas células embriogênicas coradas com Lugol; **G-** pró-embriões com grãos de amido menos evidentes (setas pretas); **H:** ausência de proteínas nas células embriogênicas coradas com Xilidine Ponceau; **I:** pró-embriões contendo proteínas representadas pelas setas pretas; **ce:** calo embriogênico; **pe:** pró-embriões.

#### 3.4.4 – Regeneração de embriões somáticos

Embriões somáticos com 90 dias de idade foram coletados durante a etapa de regeneração para análise histológica e histoquímica. Morfologicamente, o embrião somático se apresentava em estágio torpedo, medindo aproximadamente 5 mm, com duas regiões: distal e proximal (Fig. 10A).

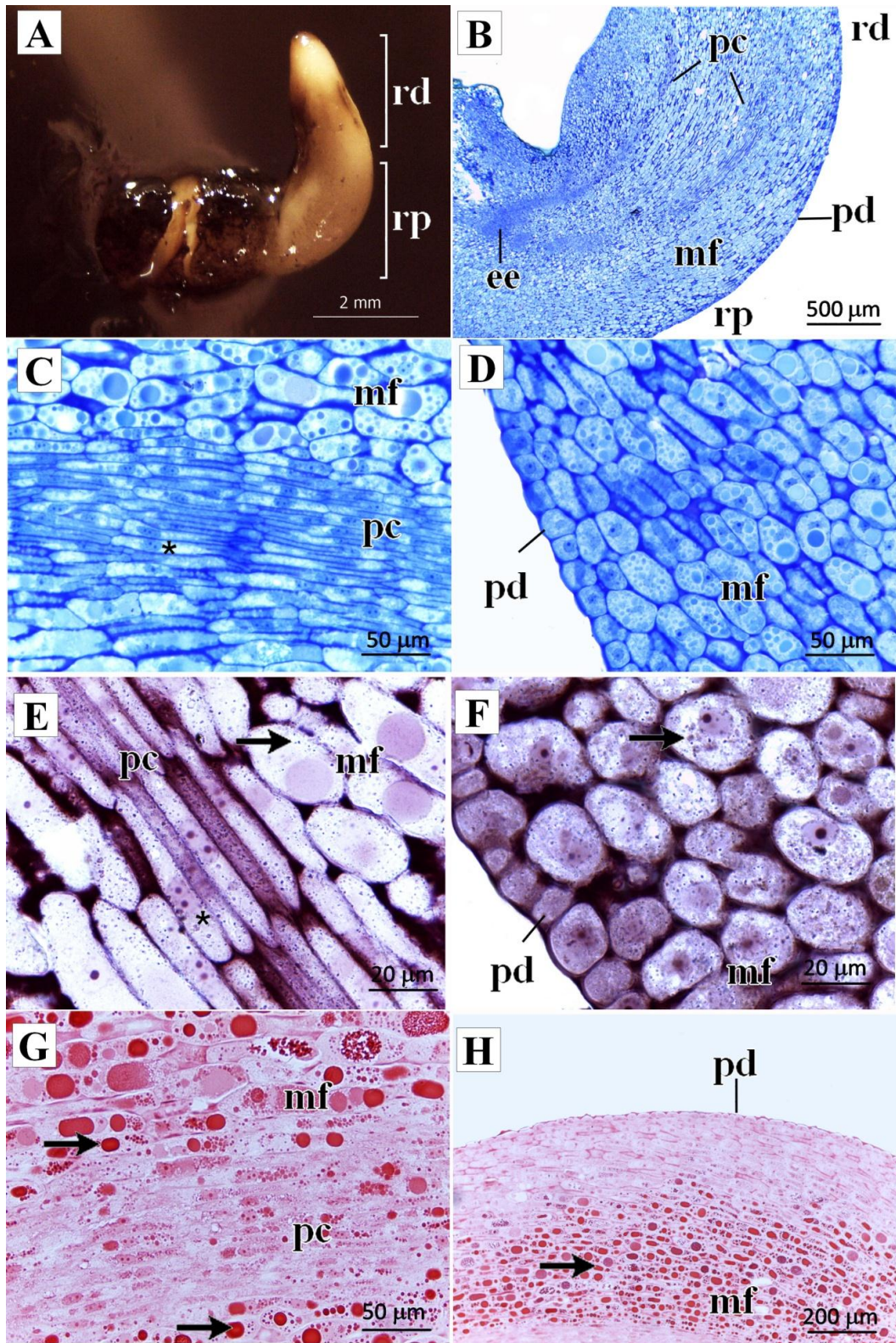
A região distal é caracterizada pela presença das células do procâmbio (tecido vascular), meristema fundamental e protoderme, enquanto que a região proximal apresenta o eixo embrionário (Fig. 10B), responsável pelo crescimento da planta. Estes resultados corroboram aqueles encontrados na literatura em que o embrião zigótico de dendezeiro apresenta as mesmas estruturas (Thuzar et al. 2011; Silva et al. 2012; Silva et al. 2014b), e assim confirmam que o material obtido se trata de um embrião somático.

As células do procâmbio se apresentam alongadas e em intenso processo de divisão celular, pois o núcleo se encontra em cariocinese e possui mais de um nucléolo (Fig. 10C, E). Na protoderme, camada externa que envolve o embrião e origina a epiderme vegetal, as células são isodiamétricas, dispostas em fileira, apresentam núcleo e nucléolos evidentes, mas não dispõem de grãos de amido (Fig. 10D, F). As células parenquimáticas do meristema fundamental, por outro lado, não possuem forma definida, e assim como no procâmbio e protoderme, também não possuem grãos de amido (Fig. 10E-F).

O amido geralmente não ocorre em embriões somáticos, mas no embrião zigótico de dendezeiro ele é encontrado no tecido parenquimático (Silva et al. 2014b) e seus níveis podem mudar dependendo da fase de desenvolvimento do embrião, pois a divisão e diferenciação celular consomem grandes quantidades de carbono e ATP (Silveira et al. 2004b). Alguns autores relatam que o amido é considerado uma fonte primária de energia para a proliferação e crescimento celular, fornecendo dessa forma energia para o desenvolvimento dos embriões (Stamp 1987; Pinto et al. 2010). Assim, os níveis de amido também se alteram durante as etapas da ES (indução, multiplicação, diferenciação e regeneração), pois as células estão em intensa divisão (Gomes et al. 2014).

Ainda sobre as reservas, tanto as células do procâmbio como do meristema fundamental são dotadas de proteínas de reserva, indicadas pelas setas (Fig. 10G, H). Nas células parenquimáticas do meristema fundamental, as proteínas de reserva se

apresentam mais íntegras, enquanto que nas células do procâmbio mais degradadas, o que sugere a sua quebra para uso e transporte nos tecidos vasculares. A presença de nitrogênio orgânico aumenta as proteínas de reserva em dendezeiro (Morcillo et al. 1999), o que resulta em embriões somáticos de alta qualidade (Steinmacher et al. 2007). Dessa forma, é possível que o acúmulo de proteínas no embrião somático do presente estudo esteja também relacionado com a fonte de nitrogênio (nitrato de amônio –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), a qual faz parte do meio basal de MS utilizado na etapa de regeneração de embriões somáticos.



**Figura 10.** Caracterização morfo-anatômica e histoquímica do embrião somático de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *pisifera*), coletado com 180 dias de idade. **A:** Aspecto geral do embrião somático apresentando região distal e região proximal; **B:** Visão geral do embrião somático corado com Azul de Toluidina e apresentando as regiões distal e proximal, onde se encontram o eixo embrionário, o meristema fundamental e as células do procâmbio; **C:** detalhe das células do procâmbio, que são

mais alongadas em relação àquelas do meristema fundamental e apresentam núcleo em divisão (asterisco); **D**: células da protoderme justapostas apresentando núcleo e nucléolo evidentes; **E**- ausência de amido nas células do procâmbio (asterisco) e do meristema fundamental (seta preta), ambas coradas com Lugol; **F**: ausência de amido (seta preta) nas células próximas à protoderme; **G**: células do meristema fundamental e procâmbio apresentando reservas proteicas (setas pretas), ambas coradas com Xilidine Ponceau; e **H**: ausência de reservas proteicas nas células da protoderme em relação àquelas do meristema fundamental (seta preta); **rd**: região distal; **rp**: região proximal; **ee**: eixo embrionário; **mf**: meristema fundamental; **pc**: procâmbio; **pd**: protoderme.

#### 4 – Conclusões

Pelo presente estudo foi identificado que dos quatro genótipos testados (A251424, A251427, A251512 e A251513), o A251424 é o mais responsivo à embriogênese somática, pois formou mais calos ao longo do tempo. Assim, a resposta ao processo da ES é genótipo-dependente.

Com relação à etapa de multiplicação de calos, este é o primeiro relato deste tipo de análise que se utiliza de uma nova abordagem para a avaliação dos dados, que são os intervalos de classes baseados no peso inicial (peso fresco) dos calos. Assim, calos com maior peso apresentaram, de maneira geral, menor incremento de biomassa fresca, sendo mais indicados para a diferenciação de embriões somáticos.

Na análise morfo-anatômica e histoquímica dos tipos de calos, o calo nodular amarelado analisado durante a indução foi o que apresentou o maior adensamento de amido e seguiu a rota para a diferenciação de calos e embriões somáticos. Nas etapas de multiplicação e diferenciação o amido também esteve presente. Estes resultados indicam que os calos nodulares amarelados e o amido são potenciais marcadores morfológico e bioquímico, respectivamente, do processo de ES.

Sobre as reservas proteicas, estas foram identificadas somente nos pró-embriões da etapa de diferenciação e, posteriormente, no embrião somático na etapa de regeneração. Isto sugere o seu armazenamento prévio para posterior uso no desenvolvimento do embrião somático.

Por fim, a estrutura embriogênica obtida na etapa de regeneração, tratou-se de um embrião por apresentar as mesmas estruturas anatômicas que o embrião zigótico e, principalmente, as reservas proteicas que são características de um embrião em desenvolvimento. Como foi obtido de tecido somático (explantes foliares), pode-se afirmar que se trata do primeiro embrião somático (clone) da variedade *pisifera* em dendezeiro obtido no Brasil.



**Análise proteômica durante a aquisição de competência embriogênica em explantes foliares de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*) com respostas contrastantes ao processo**

**Resumo**

A palma de óleo africana ou dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), originária da Costa Oeste da África, é uma das espécies de plantas com maior produção de óleo vegetal no mundo. Embora seja conhecido que durante a aquisição de competência embriogênica por células somáticas ocorra reprogramação celular com a ativação de vários genes, ainda são poucos os estudos realizados sobre metabolismo celular e expressão de proteínas e genes durante a embriogênese somática (ES) em dendezeiro. A compreensão desses eventos poderá auxiliar na otimização dos protocolos de propagação clonal. O objetivo deste trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas durante a indução da embriogênese somática em genótipos elites de *E. guineensis* com respostas contrastantes ao processo. Explantes foliares aclorofilados foram obtidos de dois genótipos (responsivo e não responsivo) e submetidos à indução da ES utilizando-se o meio de Murashige e Skoog (MS) modificado. O material permaneceu nessa condição por 180 dias e durante este período foi realizada sua coleta em triplicatas biológicas aos 0 (controle), 14, 90 e 150 dias de indução para a extração de proteínas. As proteínas foram extraídas com fenol, quantificadas por Bradford e em seguida analisadas por eletroforese bidimensional (2-DE). As análises foram focadas em 14 e 150 dias de indução, por serem o tempo inicial e tardio de aquisição de competência embriogênica. Proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas por espectrometria de massa e anotadas utilizando-se as plataformas AgBase e Revigo. Os resultados revelaram 52 proteínas diferencialmente expressas em 14 dias, incluindo 17 proteínas aumentadas e 14 diminuídas no genótipo responsivo em relação ao não-responsivo. Já aos 150 dias de indução, 74 proteínas diferenciais foram detectadas, incluindo 19 aumentadas e 13 diminuídas também no genótipo responsivo em relação ao não-responsivo. Um total de 40 proteínas exclusivas foi observado no genótipo responsivo aos 150 dias de indução,

enquanto que o genótipo não-responsivo apresentou somente duas. A anotação funcional evidenciou menos processos biológicos nas categorias de resposta ao estresse e metabolismo energético aos 14 dias para o genótipo responsivo, e mais processos aos 150 dias, quando comparado ao genótipo não-responsivo. Adicionalmente, esta análise permitiu a identificação de dez proteínas importantes relacionadas com a aquisição de competência embriogênica, entre elas a isoenzima catalase 2 (*spot* 254), mono-dehidroascorbato-redutase isoforma cloroplástica X2 (*spot* 150), subunidade beta da pirofosfatofrutose-6-fosfato-1-fosfotransferase (*spot* 338).

**Palavras-chave:** Embriogênese somática, 2-DE, proteínas, espectrometria de massa.

## Abstract

African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), originally from the West Coast of Africa, is one of the plant species with the highest production of vegetable oil in the world. Although it is known that cellular reprogramming occurs with the activation of several genes during the acquisition of embryogenic competence from somatic cells, there are still few studies on cell metabolism and expression of proteins and genes during somatic embryogenesis (SE) in oil palm. Thus, understanding the molecular events that initiate this process may help in the optimization of the clonal propagation protocols in oil palm. The goal of this work was to identify differentially expressed proteins during the induction of somatic embryogenesis in elite genotypes of *E. guineensis* with contrasting responses to the SE process. Leaf explants without chlorophyll were obtained from two genotypes (responsive and non-responsive) and submitted to SE induction using modified Murashige and Skoog (MS) medium. The material remained in this condition for 180 days and during this period it was collected in biological triplicates at 0 (control), 14, 90 and 150 days of induction for the extraction of proteins. Proteins were extracted with phenol, quantified by Bradford and then analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Analyses were focused at 14 and 150 days of induction, representing the initial and late stages of embryogenic competence acquisition, respectively. Differential proteins were identified by mass spectrometry and functional annotation of the proteins was performed using the AgBase and Revigo platforms. The results revealed 52 differentially expressed proteins at 14 days, including 17 increased and 14 decreased proteins in the responsive genotype when compared to the non-responsive. At 150 days of induction, 74 proteins were detected, including 19 increased and 13 decreased also in the responsive genotype when compared to the non-responsive. A total of 40 unique proteins were observed in the responsive genotype at 150 days of induction, while the non-responsive genotype showed only two. Functional annotation showed less biologic process in categories of stress response and energetic metabolism at 14 days for the responsive genotype, and more processes at 150 days, when compared to the non-responsive genotype. Additionally, this analysis allowed the identification of ten important proteins related to the acquisition of embryogenic competence, among which are *Catalase isozyme 2 (spot 254)*, *Monodehydro ascorbate reductase*

*chloroplastic isoform X2 (spot 150), Pyrophosphatefructose-6-phosphate-1-phosphotransferase subunit beta like (spot 338).*

**Key words:** Somatic embryogenesis, 2-DE, proteins, mass spectrometry.

## 1 – Introdução

A palma de óleo africana ou dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), originária da Costa Oeste da África, é uma das espécies de plantas com maior produção de óleo vegetal do mundo e tem a vantagem de ser explorada comercialmente por pelo menos 25 anos, quando cultivada sob condições adequadas (Jaligot et al. 2011). Desde a introdução da cultura de tecidos em dendezeiro, em meados da década de 60, a propagação clonal tem se mostrado útil, não somente para a produção de plantas uniformes, mas também por acelerar programas de melhoramento genético, fixar ganhos genéticos em ciclos de seleção e obter plantas elites com características de interesse, como as de maior produtividade (Jones 1974; Zamzuri et al. 2007; Lin et al. 2009; Beulé et al. 2011).

Uma das alternativas para clonagem do dendezeiro é a micropropagação, via embriogênese somática (ES) (Duval et al. 1988; Scherwinski-Pereira et al. 2010; Silva et al. 2014a). Esta técnica tem como vantagens, a possibilidade de multiplicar em larga escala genótipos superiores, obter maior número de embriões somáticos em espaços físicos reduzidos (laboratório), sincronizar a produção das mudas, permitir o armazenamento de propágulos por longo período de tempo por criopreservação, além da produção de sementes sintéticas (Konan et al. 2006; Konan et al. 2010; Soh et al. 2011).

Embora a ES seja usada para micropropagação em *E. guineenses*, ainda há poucos estudos sobre metabolismo celular e expressão de proteínas durante este processo (Silva et al. 2014a). Dessa forma, entender os eventos moleculares que iniciam a ES pode auxiliar no melhoramento dos protocolos de propagação clonal, especialmente para plantas recalcitrantes ao cultivo *in vitro* (Mahdavi-Darvari et al. 2015).

A análise proteômica é uma das abordagens que vêm sendo utilizada para investigar mudanças moleculares em muitas espécies vegetais (Choi e Sung 1984; Kuroda 1995; Imin et al. 2005; Noah et al. 2013). Assim, a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) é a metodologia clássica ainda utilizada em estudos de proteômica apresentando como vantagens a avaliação rápida da qualidade da preparação da amostra, identificação e sequenciamento de proteínas para organismos os quais não se tem informação genômica disponível ou estas são escassas, além da visualização e quantificação de proteínas intactas e suas isoformas (Rogowska-Wrzesinska et al. 2013). Todavia, trabalhos utilizando esta técnica para estudos do processo embriogênico em palmeiras são limitados (Silva et al. 2014a; Sin et al. 2016). Além disso, não há relatos na literatura reportando a utilização da análise proteômica para

entender a resposta de genótipos de dendezeiro contrastantes quanto à indução da embriogênese somática.

Desta forma, no presente trabalho, dois híbridos *tenera* de dendezeiro foram investigados por proteômica uma vez que apresentaram respostas contrastantes quanto à aquisição de competência embriogênica. A técnica 2-DE e a espectrometria de massa foram utilizadas buscando a identificação de proteínas possivelmente relacionadas a estas respostas contrastantes. Assim, espera-se que os resultados aqui encontrados auxiliem os estudos de otimização e entendimento de protocolos de propagação clonal de genótipos elites em *E. guineenses*, dada sua importância mundial como fonte de óleo vegetal.

## 2 – Material e métodos

### 2.1 – Material vegetal e condições de cultivo

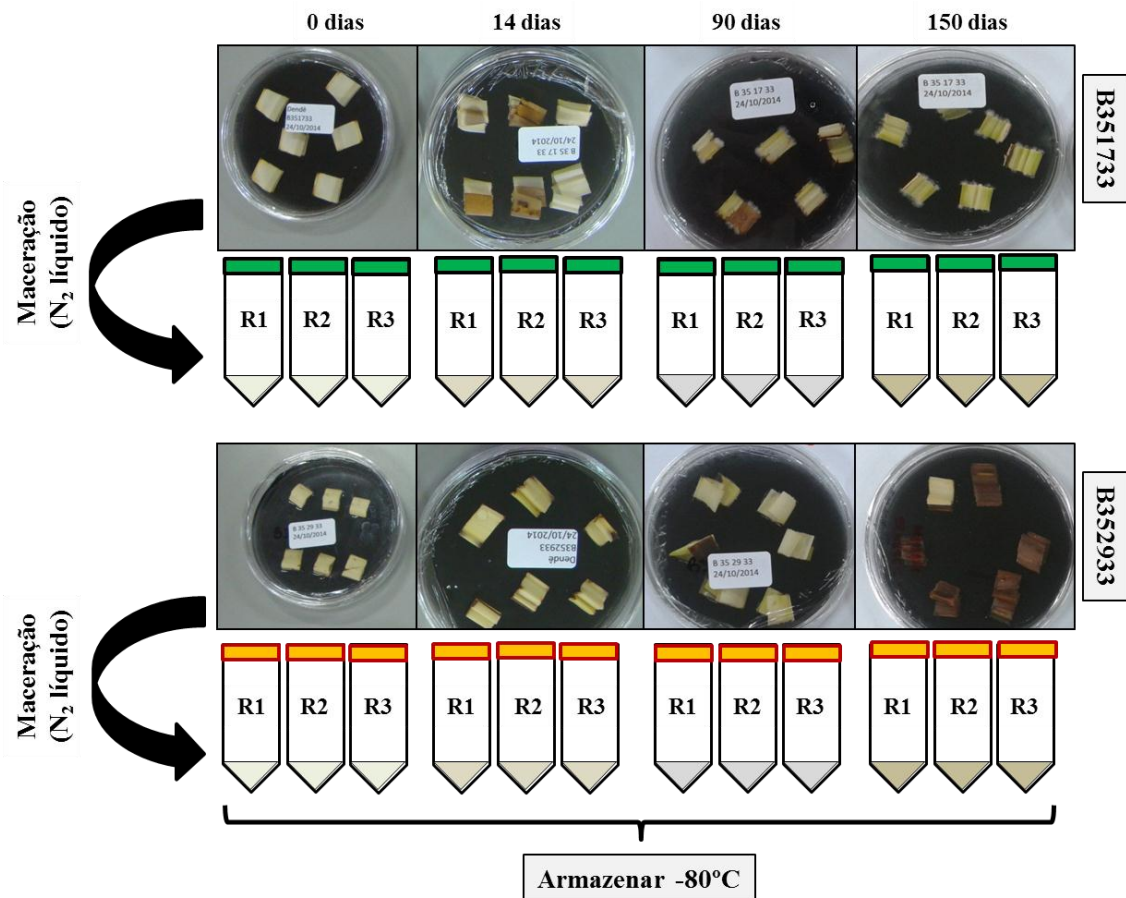
Explantos foliares aclorofilados de dois híbridos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) – B351733 (responsivo à embriogênese somática) e B352933 (não responsivo à embriogênese somática) – foram coletados a partir do palmito de plantas adultas.

Os palmitos foram submetidos ao processo de assepsia em laboratório, onde primeiramente 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 autoclavada.

Após assepsia, os explantes foliares do palmito foram retirados com auxílio de pinça e bisturi 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<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glutamina, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 450 µM de Picloram e solidificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma®), conforme Balzon et al. (2013).

A coleta do material em ambos os genótipos (B351733 e B352933) foi realizada aleatoriamente nos tempos 0 ou controle (antes da inoculação em meio MI), 14, 90 e 150 dias após a inoculação em meio MI em triplicatas biológicas (R1, R2 e R3) para realização da análise 2-DE. A partir dos 14 dias de indução a oxidação se iniciava nos materiais de ambos os genótipos, assim as coletas continuaram a ser aleatórias, independente da oxidação dos

explantes. Cada réplica foi composta por seis placas selecionadas aleatoriamente, que continham seis explantes os quais foram macerados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até seu uso (Fig. 1).



**Figura 1.** Esquema representativo dos tempos de coleta, obtenção e acondicionamento do macerado das triplicatas biológicas proveniente dos explantes foliares dos híbridos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*), B351733 e B352933, responsivo e não-responsivo à indução da embriogênica somática, respectivamente.

## 2.2 – Análise proteômica

### 2.2.1 – Extração de proteínas, quantificação e SDS-PAGE

As amostras dos diferentes tempos de coleta para ambos os genótipos (B351733 e B352933) foram extraídas separadamente. A extração de proteínas foi realizada utilizando-se 100 mg de material macerado que foi transferido para microtubos de 1,5 mL. Em seguida, 750  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (0,7 M de sacarose, 0,5 M Tris HCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0,1 M KCl e 40 mM DTT) foi adicionado às amostras, que permaneceram à temperatura ambiente por 15 minutos.

Posteriormente, as amostras receberam 850  $\mu\text{L}$  de fenol equilibrado com pH 8.0 e permaneceram sobre agitação por 15 minutos em vórtex, sendo então centrifugadas a 12000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi recuperado, transferido para novo tubo e a etapa repetida mais três vezes. As proteínas foram precipitadas com 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol, lavadas com acetona 80% e depois de secos, os precipitados foram suspensos em um tampão de solubilização (7 M uréia; 1 M tiourea; 4% (m/v) chaps; 2 % IPG buffer com pH 3-10 NL ou 4-7; 40 mM DTT).

A quantificação da concentração final das proteínas foi realizada conforme (Bradford 1976), seguida da leitura em espectrofotômetro a 595 nm. O aparelho foi previamente calibrado a partir da curva de BSA (Soro de Albumina Bovina) ( $1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

### 2.2.2 – Eletroforese bidimensional (2-DE)

A hidratação das tiras (*Immobiline DryStrip*, 13 cm, pH 3-10 NL) foi realizada por um período de 16 h com aproximadamente 400  $\mu\text{g}$  de proteínas em 280  $\mu\text{l}$  de tampão de solubilização (7 M uréia; 2 M tiourea; 2 % chaps; 2 % IPG Buffer pH 3-10; 0,002% azul de bromofenol). A separação das proteínas por ponto isoelétrico foi realizada pelo sistema de eletroforese *IPGphor* III (GE Healthcare).

A eletroforese foi conduzida por cerca de 5 h e 30 min, sendo que a variação de voltagem e amperagem foi feita em etapas de acordo com o manual do fabricante. Na primeira etapa, a voltagem foi de 500 V, amperagem de 2 mA, potência de 0.5 KWh e o tempo de 1 h, enquanto na segunda etapa a voltagem foi de 1000 V, a potência de 0.8 KWh e o tempo de corrida foi de 1 h. Na terceira e quarta etapas, a voltagem subiu linearmente até 8000 V e se manteve por um período de aproximadamente 3 h e 30 min.

Após a eletroforese, as tiras foram equilibradas por 15 min sob fraca agitação em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 1, 5M pH 8,8; uréia 6 M; glicerol 30%; SDS 2%; azul de bromofenol 1 %) contendo 1 M de DTT, seguido por 15 min em tampão de equilíbrio contendo 2,5 % de iodoacetamida. A segunda dimensão foi realizada em gel de poli(acrilamida) 12 % e a eletroforese foi executada em um sistema vertical, com a utilização de tampão glicina (Tris-HCl 20 mM, glicina 0.192 mM e SDS 0.1% pH 8.3) e 10  $\mu\text{L}$  do marcador de massa molecular “Benchmark Protein Ladder” (Invitrogen). A corrida durou aproximadamente 6 horas à temperatura ambiente e pelo menos 3 géis (R1, R2 e R3) de cada amostra (0, 14, 90 e 150 dias de indução) em cada genótipo, foram preparados.



### 2.2.3 – Análise de imagem

Por meio do programa de análise de imagem Image Master Platinum<sup>®</sup> (GE Healthcare) os mapas 2D foram analisados. Em todas as análises foram utilizadas triplicatas técnicas com géis corados com solução de Coomassie Coloidal composta por 10 g de sulfato de amônio, 0,1g de Coomassie G250 Blue, 2 µl de ácido fosfórico e 20 ml de metanol em 100 ml de água Milli Q. A coloração dos géis durou 24 h e logo após, enxágues usando água MilliQ eram realizados e os spots visualizados em transluminador.

Para o estudo da relação entre os híbridos (genótipo responsivo × genótipo não-responsivo), os perfis foram comparados 2 a 2 nos tempos amostrados, totalizando 4 análises, ou seja: primeira análise (T0 × T0), segunda análise (T14 × T14), terceira análise (T90 × T90) e quarta análise (T150 × T150). Dois testes estatísticos foram utilizados para validação dos *spots* diferenciais: primeiramente foi utilizado o teste  $r^2$  para avaliar a correlação existente entre os géis e posteriormente o teste Anova para verificar a existência de diferenças significativas entre as amostras utilizando o valor de  $p < 0,05$ .

### 2.2.4 – Digestão das proteínas e análise por espectrometria de massa

A digestão das proteínas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Shevchenko et al. (1996). Os *spots* considerados diferenciais foram excisados dos géis e posteriormente lavados por 15 min em 50 % de acetonitrila e 25 mM de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), seguido de acetonitrila a 100 %, por 10 min. Após o enxágue com acetonitrila, os fragmentos de géis foram secos e reidratados com adição de 15 µl de tripsina e com 650 ng de tripsina *Sequencing Grade* (Promega) eles foram diluídos em 20 µl de ácido acético 50 mM e 180 µl de NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM.

Os fragmentos de géis foram incubados a 37° C durante 22 h. Um total de 1 µl de cada digestão foi misturado a 1 µl de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg.ml<sup>-1</sup> em acetonitrila 50% e TFA 0,1%) e aplicado na placa de aço Anchor chip (Bruker Daltonics). A análise dos peptídeos foi realizada em espectrômetro de massa MALDI TOF-TOF Auto Flex II (Bruker Daltonics) operando nos modos refletido positivo (MS) e LIFT (MS/MS).

As listas dos perfis de massa foram geradas utilizando-se o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics), e as buscas realizadas a partir do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), através do programa MASCOT

(<http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros utilizados foram: tolerância de massa do peptídeo de 150 ppm; 1 perda de clivagem; carboamidometil considerada como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

### 2.3 – Anotação funcional – GO (Ontologia Gênica)

Após identificação das proteínas, seus GIs (Gene Identifiers) foram utilizados para obtenção de suas sequências FASTA no banco de dados NCBI. Posteriormente, estas sequências foram utilizadas na plataforma AgBase v2.0 (McCarthy et al. 2006) para a obtenção dos GOs (Gene Ontology) e anotação funcional das proteínas.

Na plataforma AgBase foi utilizada a ferramenta *GoAnna* com o arquivo FASTA gerado no NCBI para obtenção dos dados de entrada “sliminput”. Estes dados foram utilizados na ferramenta *GoSlim viewer* e os termos GOs e o número de proteínas anotadas para cada termo GO foram obtidos. O software REVIGO (Supek et al. 2011) foi utilizado para sumarizar e remover termos GO redundantes. Posteriormente, para fins de comparação entre os genótipos, os valores de frequência relativa para cada termo GO foram obtidos por meio da divisão entre o número de proteínas em cada termo pelo número total de proteínas em cada genótipo, incluindo as exclusivas. Isto foi feito para as amostras T14 e T150 uma vez que apresentaram maior variação no perfil proteico quando comparadas às demais amostras, T0 e T90. Logo após, os termos GOs foram agrupados em 4 categorias principais de acordo com sua anotação e as proteínas alocadas em determinada categoria de acordo com a literatura. Assim, foram gerados os gráficos para processo biológico (PB) em ambos os genótipos (responsivo e não-responsivo) contendo os termos GOs e as categorias principais onde as proteínas estavam inseridas.

## 3 – Resultados e Discussão

### 3.1 – Análise proteômica

Um total de 225 *spots* diferenciais foi obtido na comparação entre o genótipo responsivo e não-responsivo. As proteínas mais abundantes estavam presentes na faixa de pI 4-7 e massa molecular entre 20 e 100 kDa. Foi interessante observar um grupo de *spots* variando em massa de 15 a 25 kDa e pI de 3-10 em T0 (controle) para ambos os genótipos

(responsivo e não-responsivo), cuja abundância foi reduzida ao longo do tempo (Fig. 2a e Fig. 2b).

Em T0 os genótipos não apresentaram significativa variação no número de proteínas diferenciais. Contudo é notório que ao longo do tempo de cultivo *in vitro* (14 a 150 dias), o número destas proteínas sofreu alterações em ambos os genótipos (Tabela 1). Com 14 e 90 dias de indução (Fig. 2a e Fig. 2b), o genótipo responsivo apresentou menor diversidade de proteínas em relação ao genótipo não-responsivo. Entretanto, aos 150 dias de indução o genótipo responsivo apresentou maior diversidade de proteínas (Fig. 2b) e neste período a formação de calos se iniciou para este genótipo (Fig. 3), o que não foi observado no genótipo não-responsivo. Assim, para a análise de espectrometria de massa, foram escolhidos os períodos de 14 e 150 dias de indução por apresentarem maior variação no perfil proteico e representarem os tempos inicial e tardio de aquisição de competência embriogênica.

**Tabela 1.** Spots diferenciais detectados na comparação entre os genótipos B351733 (responsivo) e B352933 (não-responsivo) de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) ao longo do tempo (T0-T150)

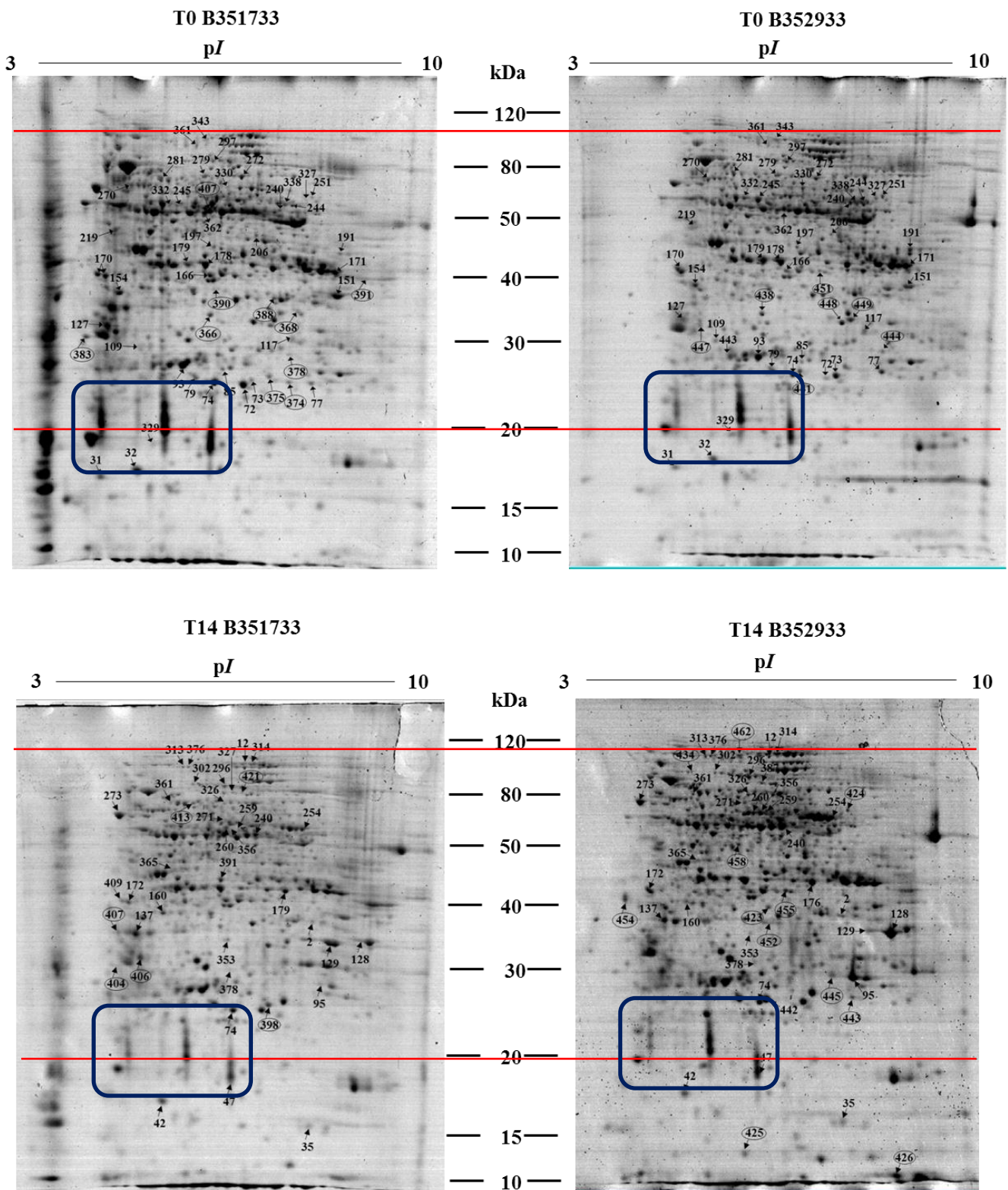
| Tempos<br>(R e NR) | Proteínas<br>Aumentadas<br>(R) | Proteínas<br>Diminuídas<br>(R) | Proteínas exclusivas          |                                    | Proteínas<br>diferenciais<br>(Total) |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
|                    |                                |                                | Genótipo<br>responsivo<br>(R) | Genótipo<br>Não-responsivo<br>(NR) |                                      |
| T0                 | 11                             | 29                             | 10                            | 8                                  | 58                                   |
| T14                | 17                             | 14                             | 10                            | 11                                 | 52                                   |
| T90                | 19                             | 8                              | 9                             | 5                                  | 41                                   |
| T150               | 19                             | 13                             | 40                            | 2                                  | 74                                   |

R- responsivo e NR- não responsivo.

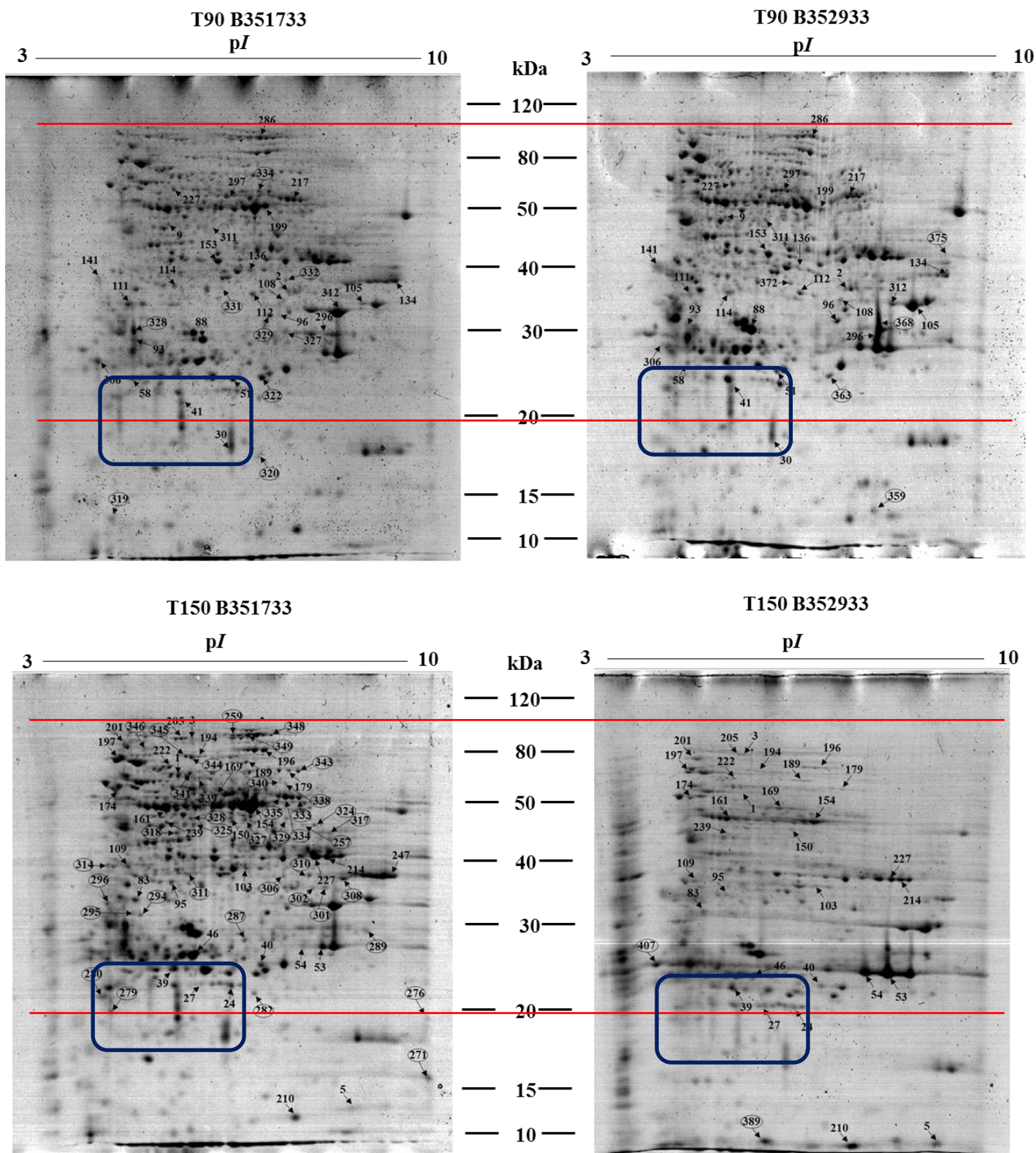
Alguns trabalhos na literatura têm apresentado padrão de resposta semelhante ao do presente estudo em relação ao perfil proteômico durante a ES de espécies como *Medicago truncatula* Gaerth. (Imin et al. 2005; Almeida et al. 2012), *Picea glauca* (Moench) Voss (Lippert et al. 2005), *Vitis vinifera* L. (Marsoni et al. 2008), *Theobroma cacao* L. (Noah et al. 2013) e *Elaeis guineensis* Jacq. (Silva et al. 2014a; Sin et al. 2016).

Especificamente em dendezeiro, Silva et al. (2014a) identificaram proteínas envolvidas na indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos da espécie. Os autores observaram entre 200 e 500 *spots* totais com pI de 3 a 10 e massa molecular entre 10 e 160 kDa para o perfil proteômico dos estágios embriogênicos analisados: E1 (embrião zigótico), E2 (explante com 14 dias de indução), E3 (calo primário com 60 dias) e E4 (calo pró-embriogênico com 150 dias). Sin et al. (2016) também analisaram o perfil proteômico

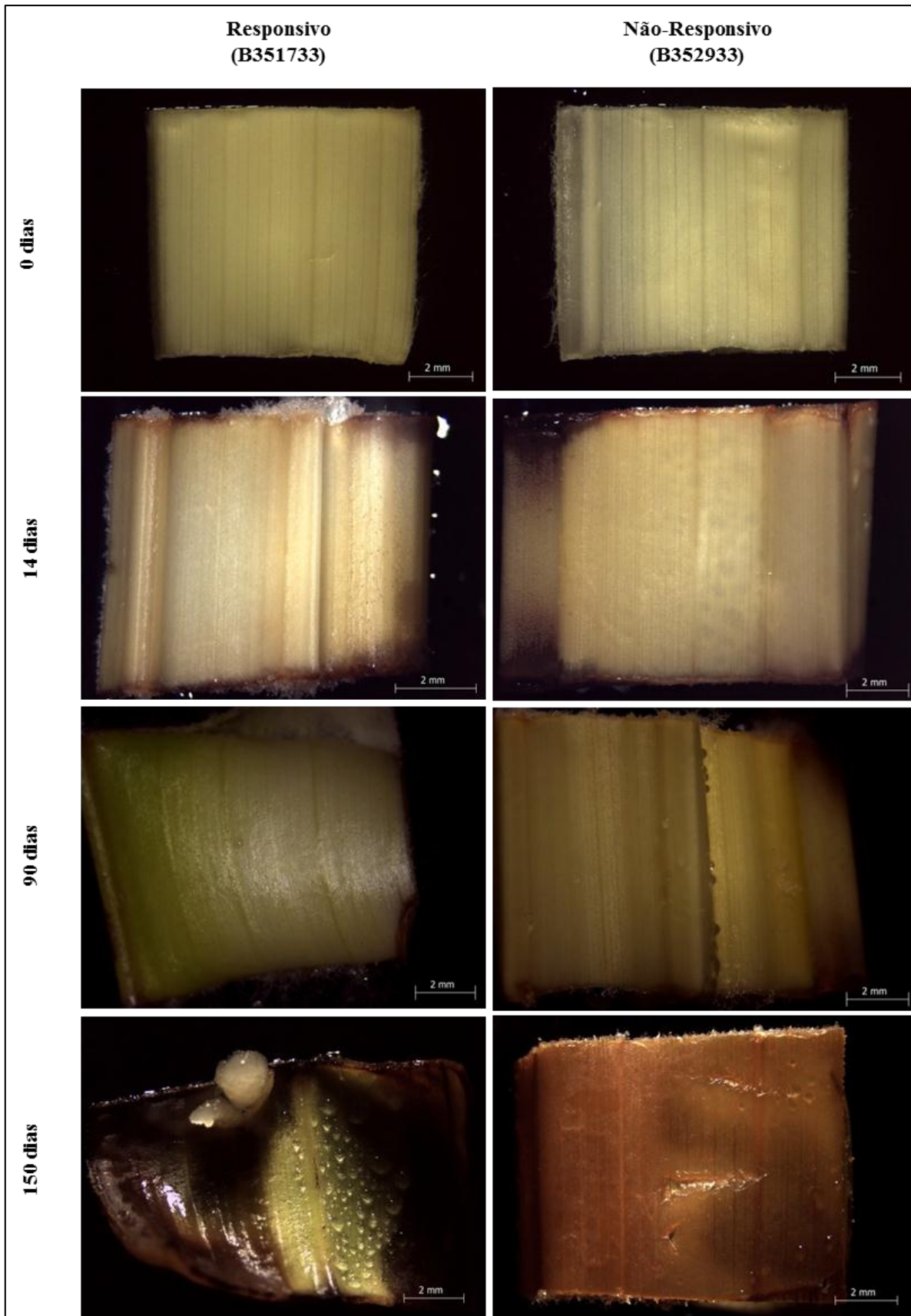
durante a embriogênese somática a partir de explantes foliares de dendezeiros com alta e baixa proliferação de calos. Em ambos os trabalhos, o perfil proteômico obtido é similar ao do presente estudo, contudo, a literatura ainda carece de trabalhos que avaliem o perfil proteômico durante a aquisição de competência embriogênica em dendezeiro, principalmente quando genótipos responsivo e não-responsivo são avaliados.



**Figura 2a.** Eletroforese bidimensional (2-DE) para os genótipos B351733 (responsivo à aquisição de competência embriogênica) e B352933 (não-responsivo à aquisição de competência embriogênica) em dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) comparando a abundância proteica entre os tempos 0 e 14 dias de indução de calos. **Números circulos** indicam spots exclusivos; **linhas vermelhas** indicam localização da abundância de proteínas entre pI 3 a 10; e **retângulo** exemplifica um grupo de proteínas que apresentaram abundância reduzida ao longo do tempo.



**Figura 2b.** Eletroforese bidimensional (2-DE) para os genótipos B351733 (responsivo à aquisição de competência embriogênica) e B352933 (não-responsivo à aquisição de competência embriogênica) em dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) comparando a abundância proteica entre os tempos 90 e 150 dias de indução de calos. **Números circulados** indicam spots exclusivos; **linhas vermelhas** indicam localização da abundância de proteínas entre pI 3 a 10; e **retângulo** exemplifica um grupo de proteínas que apresentaram abundância reduzida ao longo do tempo.



**Figura 3.** Comportamento de genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*) submetidos ao meio de indução de calos com picloram 450  $\mu$ M ao longo do tempo. Em 150 dias de indução a formação de calos inicia para o genótipo responsivo.

Das 52 proteínas diferenciais observadas neste trabalho aos 14 dias de indução (Tabela 1), 39 (75%) foram identificadas, sendo 13 diminuídas e 16 aumentadas no genótipo responsivo em relação ao não-responsivo. Um total de 10 proteínas foram identificadas como exclusivas, sendo 2 no genótipo responsivo e 8 no genótipo não-responsivo (Tabela 2).

Em 150 dias de cultivo, das 74 proteínas diferenciais observadas (Tabela 1), 56 (75,6%) foram identificadas, sendo 12 diminuídas e 16 aumentadas no genótipo responsivo em relação ao não-responsivo. Dentre as proteínas identificadas, 28 foram exclusivas, das quais 26 compõem o perfil proteico do genótipo responsivo e 2 o perfil do genótipo não-responsivo (Tabela 3).

Estes resultados indicam, possivelmente, que as respostas contrastantes de aquisição de competência embriogênica entre os genótipos estejam relacionadas àquelas proteínas exclusivas presentes principalmente no genótipo responsivo, uma vez que entre 14 e 150 dias de indução, o número destas proteínas aumentou. Interessantemente, Silva et al. (2014a) também obtiveram este aumento de proteínas exclusivas entre os estágios E2 e E3 (14 e 60 dias de indução de calos, respectivamente) e o relacionam à intensa atividade mitótica celular e desdiferenciação das células somáticas. Neste contexto, é importante ressaltar que o ciclo celular depende da síntese de novas proteínas envolvidas com mudanças morfológicas e bioquímicas que estão associadas com a atividade mitótica (Silveira et al. 2004a).



**Tabela 2.** Proteínas diferencialmente abundantes identificadas por MS e MS/MS nos genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. tenera) B351733 e B352933 (responsivo e não-responsivo, respectivamente) aos 14 dias de indução

| Nº spot | Identificação da proteína                                  | Organismo                  | Acesso (NCBI nr) | Massa (kDa) teórica/ experimental | pI teórico/ experimental | Sequência do peptídeo  | Pontuação Mascot | Tipo de pesquisa | Razão R/NR |
|---------|--|----------------------------|------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|------------------|------------------|------------|
| 2       | Actin-101-like   | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743764405     | 41/35                             | 5,31/7,73                | K.SYELPDGQVITIGAER.F   | 107              | MS/MS            | 0,57       |
| 12      | Probable linoleate 9S-lipoxygenase 5                       | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743830998     | 99/100                            | 5,88/6,45                | R,GEGETETLQEWDR,V  | 53               | MS/MS            | 2,9        |
| 35      | Pathogenesis-related protein 1-like                        | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743844417     | 17/15                             | 6,73/7,65                | -  | 90               | MS               | 0,12       |
| 42      | Hypothetical protein POPTR_0021s00910g, partial            | <i>Populus trichocarpa</i> | gi 566260177     | 46/15                             | 5,97/4,79                | -  | 79               | MS               | 1,41       |
| 47      | Uncharacterized protein LOC100795664                       | <i>Glycine max</i>         | gi 571452372     | 15/17                             | 6,19/6,17                | -  | 91               | MS               | 1,41       |
| 74      | Glutathione S-transferase 3                                | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743844790     | 23/24                             | 6,10/6,21                | K,GLDYELVPVDLR,T   | 88               | MS/MS            | 2          |
| 95      | Acidic endochitinase-like                                  | <i>Phoenix dactylifera</i> | gi 672157904     | 31/27                             | 8,13/7,89                | K,YGGIMVWNR,F  | 72               | MS/MS            | 0,15       |
| 128     | Glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like                      | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743875093     | 36/32                             | 8,91/8,57                | K,YIYVGNEVIPGAQAQYVLPAMR,N<br>K,TYNQNLINHVGGTTPR,R                 | 124              | MS/MS<br>MS/MS   | 0,33       |
| 129     | glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like                      | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743785384     | 36/32                             | 9,19/8,16                | K,TYNQNLINHVGGTTPR,R<br>R,NIYSALSSAGLQNIQI,V<br>R,LYDPNQAAALQALK,G | 202              | MS/MS            | 3,42       |
| 137     | Ricin-like   | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743787208     | 63/33                             | 5,05/4,33                | R,SALVLSAESGNSGTTTLTVETNIYASR,Q                                    | 101              | MS/MS            | 1,6        |
| 160     | Tuliposide A-converting enzyme 2, chloroplastic-like       | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743860456     | 34/36                             | 5,32/4,84                | K,DVVIDQETGASVR,L  | 57               | MS/MS            | 1,71       |
| 172     | Uncharacterized protein LOC105049817                       | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743806915     | 34/39                             | 4,83/4,23                | -  | 95               | MS               | 0,57       |
| 176     | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic-like | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743893211     | 36/40                             | 6,68/7,21                | -  | 79               | MS               | 0,75       |

| Nº spot   | Identificação da proteína                                       | Organismo                                       | Acesso (NCBINr) | Massa (kDa) teórica/experimental | pI teórico/experimental | Sequência do peptideo | Pontuação Mascot | Tipo de pesquisa | Razão R/NR |
|-----------|---|---|-----------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------|
| 240       | Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit    | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 359393062    | 42/55                            | 6,42/6,67               | K,TFQGPPIHQSER,D<br>- | 67<br>67         | MS/MS<br>MS      | 1,17       |
| 254       | Catalase isozyme 2  | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 985701095    | 57/57                            | 6,47/7,54               | -                     | 85               | MS               | 0,58       |
| 259       | polyphenol oxidase, chloroplasticlike                           | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 743886465    | 66/59                            | 6,42/6,29               | -                     | 82               | MS               | 0,53       |
| 260       | BAHD acyltransferase DCR  | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 743835361    | 48/59                            | 5,35/6,01               | -<br>K,VIDAHDAGAIR,K  | 127<br>69        | MS<br>MS/MS      | 0,41       |
| 271       | Tcomplex protein 1 subunit alpha-like                           | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 743778262    | 59/65                            | 5,81/6,12               | R,AYHHTAQTK,A         | 56               | MS/MS            | 1,57       |
| 273       | Protein disulfide-isomerase-like                                | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 743816536    | 61/65                            | 4,87/3,99               | -<br>YLKPNVEADQIATWVK | 114<br>45        | MS<br>MS/MS      | 1,41       |
| 296       | Retrovirusrelated Pol polyprotein from transposon 17.6, partial | <i>Cajanus cajan</i>                            | gi 1012318733   | 101/81                           | 6,01/6,08               | -                     | 80               | MS               | 0,66       |
| 313 (MIX) | Chaperone protein ClpB 1  | <i>Zostera marina</i>                           | gi 901808951    | 101/101                          | 5,95/5,19               | -                     | 87               | MS               | 1,5        |
|           | Hypothetical protein BRADI_3g55070                              | <i>Brachypodium distachyon</i>                  | gi 944065717    | 41/101                           | 6,56/5,19               | -                     | 58               | MS               |            |
| 314       | Pre-mRNA-splicing factor 38B-like isoform X2                    | <i>Musa acuminata</i> subsp, <i>Malaccensis</i> | gi 695032027    | 49/87                            | 9,72/6,60               | -                     | 68               | MS               | 1,52       |
| 326       | 2hydroxyacylCoA lyaselike                                       | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 743794401    | 62/70                            | 5,82/6,07               | -                     | 86               | MS               | 0,59       |
| 353       | Isoflavone reductaselike protein                                | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 743871601    | 34/32                            | 5,72/6,09               | R,FLPSEFGLDVDR,I      | 63               | MS/MS            | 5,28       |
| 356       | Polyphenol oxidase, chloroplasticlike                           | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 743886465    | 66/59                            | 6,42/6,17               | -                     | 81               | MS               | 1,85       |
| 361       | 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase     | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 743789069    | 61/71                            | 5,42/4,96               | K,ALEYEDFDKFDV,V      | 80               | MS/MS            | 0,14       |
| 365       | Actin-101-like Actin3like                                       | <i>Elaeis guineensis</i>                        | gi 985701063    | 41/44                            | 5,24/5,04               | K,SYELPDGQVITIGAER,F  | 65               | MS/MS            | 1,55       |
|           |   |   |                 |                                  |                         | -                     | 65               | MS               |            |

| Nº spot | Identificação da proteína   | Organismo                                     | Acesso (NCBI nr) | Massa (kDa) teórica/ experimental | pI teórico/ experimental | Sequência do peptideo     | Pontuação Mascot | Tipo de pesquisa | Razão R/NR                     |
|---------|---|---|------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| 376     | ATPdependent Clp protease ATPbinding subunit clpA homolog CD4B, chloroplasticlke isoform X1 | <i>Nelumbo nucifera</i>                       | gi 719982757     | 104/101                           | 5,91/5,37                | -                         | 82               | MS               | 1,66                           |
| 387     | Uncharacterized protein LOC106320830  | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i> | gi 922572634     | 65/77                             | 9,28/6,29                | -                         | 82               | MS               | 0,70                           |
| 404     | Heat shock protein 81 llike   | <i>Elaeis guineensis</i>                      | gi 743765988     | 80/29                             | 5,01/3,86                | K,HNDDEQYVWESQAGGSFTVTR,D | 48               | MS/MS            | Unique to T14 (responsivo)     |
| 409     | Uncharacterized protein LOC105049817  | <i>Elaeis guineensis</i>                      | gi 743806915     | 34/38                             | 4,83/4,10                | K,KGEIPVYPKPDVDVEK,I      | 64               | MS/MS            | Unique to T14 (responsivo)     |
| 413     | 2,3bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase                                  | <i>Elaeis guineensis</i>                      | gi 743789069     | 61/69                             | 5,42/5,53                | K,ALEYEDFDKFR,V           | 72               | MS/MS            | Unique to T14 (responsivo)     |
| 423     | Malate dehydrogenase, mitochondrial-like  | <i>Elaeis guineensis</i>                      | gi 743770628     | 36/36                             | 7,62/6,37                | K,ALEGSDVVPIIPAGVPR,K     | 81               | MS/MS            | Unique to T14 (não responsivo) |
| 425     | Pathogenesis-related protein PRB1-3-like  | <i>Elaeis guineensis</i>                      | gi 743856849     | 17/11                             | 6,48/5,94                | -                         | 79               | MS               | Unique to T14 (não responsivo) |
| 434     | Protein high chlorophyll fluorescent 107-like   | <i>Nicotiana tabacum</i>                      | gi 1025006264    | 79/85                             | 7,58/4,94                | -                         | 85               | MS               | Unique to T14 (não responsivo) |
| 442     | Probable glutathione S-transferase parA   | <i>Elaeis guineensis</i>                      | gi 743792908     | 25/25                             | 6,16/6,33                | -<br>R,FWADFVDK,K         | 107<br>57        | MS<br>MS/MS      | Unique to T14 (não responsivo) |
| 443     | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-2   | <i>Phoenix dactylifera</i>                    | gi 672172054     | 18/26                             | 8,43/7,86                | -                         | 83               | MS               | Unique to T14 (não responsivo) |
| 454     | Endochitinase A-like  | <i>Nelumbo nucifera</i>                       | gi 720083283     | 35/38                             | 6,08/3,66                | R,VPGYGVITNIINGGNECGR,G   | 49               | MS/MS            | Unique to T14 (não responsivo) |
| 455     | Cation/H(+) antiporter 17-like  | <i>Camelina sativa</i>                        | gi 727520270     | 52/39                             | 6,45/6,68                | -                         | 82               | MS               | Unique to T14 (não responsivo) |

**Tabela 3.** Proteínas diferencialmente abundantes identificadas por MS e MS/MS nos genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. tenera) B351733 e B352933 (responsivo e não-responsivo, respectivamente) aos 150 dias de indução

| Nº spot | Identificação da proteína                                 | Organismo                  | Acesso (NCBI nr) | Massa (kDa) teórica/ experimental | pI teórico/ experimental | Sequência do peptídeo  | Pontuação Mascot  | Tipo de pesquisa              | Razão R/NR |
|---------|---|----------------------------|------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|-------------------|-------------------------------|------------|
| 1       | 2,3bisphosphoglycerateindependent phosphoglycerate mutase | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743789069     | 61/71                             | 5,42/5,62                | K.ALEYEDFDKFDR.V   | 80                | MS/MS                         | 9          |
| 5       | pathogenesisrelated protein PRB13-like                    | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743856853     | 18/104                            | 8,48/8,79                | K.CNSGAIFIICNYKPR.G<br>K.QWYDYNTNTCAAGK.V<br>-   | 116<br>116<br>105 | MS/MS<br>MS/MS<br>MS          | 0,20       |
| 24      | 23 kDa jasmonateinduced protein-like                      | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743780066     | 24/23                             | 5,70/6,46                | R.WGNDNTVYTEIR.E   | 95                | MS/MS                         | 0,56       |
| 27      | 23 kDa jasmonateinduced protein-like                      | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743780066     | 24/23                             | 5,70/5,90                | R.WGNDNTVYTEIR.E   | 89                | MS/MS                         | 0,24       |
| 39      | glutathione Stransferase 3like                            | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743785020     | 24/25                             | 5,35/5,40                | -<br>LYGTPNSTNATR  | 92<br>47          | MS<br>MS/MS                   | 0,82       |
| 40      | Predicted protein   | <i>Micromonas commode</i>  | gi 255086337     | 92/26                             | 6,42/6,94                | R.GAEEGEEKSR.E   | 60                | MS/MS                         | 0,33       |
| 46      | Putative cytosolic ascorbate peroxidase protein           | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 374256065     | 27/27                             | 5,51/5,76                | -<br>K.YAAEDAFFADYAEHLK.L<br>R.EDKPEPPEEGR.L<br>R.IAWHSAGTYDVK.T<br>K.ALLTDPVFRPLVEK.Y | 163<br>222        | MS<br>MS/MS<br>MS/MS<br>MS/MS | 1,51       |
| 53      | Acidic endochitinase-like                                 | <i>Phoenix dactylifera</i> | gi 672157904     | 31/27                             | 8,13/8,02                | R.YYDEQNYSATVK.N   | 134               | MS/MS                         | 0,23       |
| 54      | Acidic endochitinase-like                                 | <i>Phoenix dactylifera</i> | gi 672157904     | 31/27                             | 8,13/7,69                | R.YYDEQNYSATVK.N<br>K.YGGIMVWNR.Y  | 119               | MS/MS                         | 0,28       |
| 83      | Protein SUPPRESSOR OF K(+) TRANSPORT GROWTH DEFECT 1like  | <i>Brassica napus</i>      | gi 923640607     | 48/34                             | 6,65/4,83                | -  | 79                | MS                            | 0,60       |
| 95      | Cysteine synthase   | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743774724     | 34/37                             | 5,51/5,43                | K.IHYETTGPPIWK.G   | 66                | MS/MS                         | 4,29       |
| 103     | Myrcene synthase  | <i>Morus notabilis</i>     | gi 703149261     | 68/39                             | 7,21/6,79                | -  | 85                | MS                            | 7,32       |
| 150     | Monodehydroascorbate reductase, chloroplastic isoform X2  | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743854818     | 54/51                             | 7,62/6,46                | -  | 118               | MS                            | 6,33       |

| Nº spot | Identificação da proteína  | Organismo                | Acesso (NCBINr) | Massa (kDa) teórica/ experimental | pI teórico/ experimental | Sequência do peptídeo  | Pontuação Mascot | Tipo de pesquisa     | Razão R/NR |
|---------|--|--------------------------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------|--|------------------|----------------------|------------|
| 154     | Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit                | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 11558717     | 53/54                             | 6,00/6,83                | -<br>R.GGLDFTKDDENVNSQPFMR.W<br>K.TFQGPPIHGIQSER.D<br>R.DNGLLLHIHR.A | 191<br>158       | MS<br>MS/MS          | 2,46       |
| 161     | Enolase-like   | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743877540    | 48/55                             | 5,33/5,35                | R.GNPTVEVDCCLSDGSDGFCR.A   | 92               | MS/MS                | 1,81       |
| 169     | Polyphenol oxidase, chloroplast-like   | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743886465    | 66/60                             | 6,42/6,19                | -  | 104              | MS                   | 0,18       |
| 174     | RuBisCO large subunit binding protein subunit alpha isoform X2               | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743776540    | 61/65                             | 5,11/4,54                | -<br>R.GYVSPQFVTNPEK.L   | 185<br>57        | MS<br>MS/MS          | 2          |
| 179     | NADPdependent malic enzyme isoform X2  | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743756149    | 65/73                             | 6,31/7,49                | -  | 89               | MS                   | 2,63       |
| 189     | Hsp70/Hsp90 organizing protein   | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743827946    | 65/79                             | 5,99/6,64                | -  | 84               | MS                   | 0,47       |
| 196     | 5-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine methyltransferase 1-like     | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743774958    | 89/88                             | 6,47/7,09                | K.YGAGIGPGVYDIHSPR.I   | 57               | MS/MS                | 8,9        |
| 197     | Stromal 70 kDa heat shock related protein, chloroplast                       | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743814517    | 75/84                             | 5,40/4,55                | K.DIDEVILVGGSTR.I  | 74               | MS/MS                | 1,3        |
| 201     | Heat shock protein 81 l like   | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743807690    | 80/85                             | 5,02/4,69                | -  | 147              | MS                   | 0,47       |
| 205     | ATPdependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplast | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743858564    | 10/10                             | 6,16/5,57                | -  | 117              | MS                   | 2,66       |
| 210     | Pathogenesis related protein PRB13-like                                      | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743856849    | 17/8                              | 6,48/7,49                | -<br>K.QWYDYNTNTCAAGK.V<br>K.VCGHYTQVVWR.D                           | 90<br>120        | MS<br>MS/MS<br>MS/MS | 0,32       |
| 214     | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like isoform X1          | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743877054    | 37/40                             | 7,71/8,24                | -<br>K.AGIALNDHFVK.L   | 87<br>78         | MS<br>MS/MS          | 2,3        |

| Nº spot | Identificação da proteína   | Organismo                  | Acesso (NCBI nr) | Massa (kDa) teórica/ experimental | pI teórico/ experimental | Sequência do peptideo                        | Pontuação Mascot | Tipo de pesquisa     | Razão R/NR                  |
|---------|---|----------------------------|------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|------------------|----------------------|-----------------------------|
| 222     | Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial                            | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743828155     | 72/78                             | 6,24/5,42                | -  | 113              | MS                   | 7,11                        |
| 227     | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like isoform X1 | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743877054     | 37/40                             | 7,71/8,03                | -<br>K.GILGYTEDDLVSTDFIGDSR.S                | 141<br>171       | MS<br>MS/MS          | 1,91                        |
| 247     | Protochlorophyllide reductaselike                                   | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743776090     | 43/36                             | 9,19/9,16                | -  | 108              | MS                   | 7,25                        |
| 259     | Polyphenol oxidase, chloroplastic-like                              | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743886465     | 66/68                             | 6,42/6,53                | -  | 114              | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 271     | Haloacid dehalogenaselike hydrolase domaincontaining protein 3      | <i>Cucumis melo</i>        | gi 659085144     | 34/15                             | 7,01/9,84                | -  | 80               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 280     | MLPlike protein 423   | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743809321     | 16/20                             | 4,67/4,32                | -  | 83               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 282     | Proteasome subunit beta type2B                                      | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743760653     | 22/21                             | 5,96/6,91                | R.LVVAPPNFVIK.I                              | 69               | MS/MS                | Unique to T150 (responsivo) |
| 287     | Proteasome subunit alpha type-6                                     | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743840653     | 27/28                             | 6,01/6,76                | -<br>R.VLSTEEIDEHLTAISERD.<br>R.HITIFSPEGR.L | 84<br>76<br>76   | MS<br>MS/MS<br>MS/MS | Unique to T150 (responsivo) |
| 289     | Mitochondrial outer membrane protein porin 1like                    | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743755082     | 29/29                             | 7,83/8,83                | K.ASALIQHEWRPK.S                             | 64               | MS/MS                | Unique to T150 (responsivo) |
| 294     | Oxygenevolving enhancer protein 1, chloroplastic                    | <i>Elaeis guineensis</i>   | gi 743794420     | 35/32                             | 6,25/4,98                | -  | 105              | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 295     | Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like              | <i>Phoenix dactylifera</i> | gi 672128345     | 35/32                             | 6,24/4,86                | -  | 87               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |

| Nº spot | Identificação da proteína                              | Organismo                        | Acesso (NCBI nr) | Massa (kDa) teórica/ experimental | pI teórico/ experimental | Sequência do peptídeo                                     | Pontuação Mascot | Tipo de pesquisa     | Razão R/NR                  |
|---------|--|----------------------------------|------------------|-----------------------------------|--------------------------|---|------------------|----------------------|-----------------------------|
| 296     | Hypothetical protein POPTR_0011s17090g                 | <i>Populus trichocarpa</i>       | gi 566195964     | 26/33                             | 9,02/4,40                | -   | 85               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 301     | catalase isozyme 2                                     | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 985701095     | 56/35                             | 6,47/8,13                | NEEVDYFPSR  | 50               | MS/MS                | Unique to T150 (responsivo) |
| 302     | putative ferredoxin NADP+ reductase protein, partial   | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 374255993     | 23/35                             | 6,11/7,9                 | K.EPYTATIVSVER.L  | 52               | MS/MS                | Unique to T150 (responsivo) |
| 308     | Annexin D1like   | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 743849454     | 35/36                             | 8,24/8,40                | -<br>K.VPATVPSPSEDAEQLR.K                                 | 122<br>81        | MS<br>MS/MS          | Unique to T150 (responsivo) |
| 310     | 2alkenal reductase (NADP(+)-dependent)like             | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 743765064     | 76/37                             | 6,12/7,84                | R.SFPDGIDIFYFENVGGR.M                                     | 93               | MS/MS                | Unique to T150 (responsivo) |
| 314     | Uncharacterized protein LOC105049817                   | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 743806915     | 34/40                             | 4,83/4,42                | -<br>K.STYDDIKPGSHIIPYR.I                                 | 88<br>51         | MS<br>MS/MS          | Unique to T150 (responsivo) |
| 317     | Peroxidase 12like, partial                             | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 743890051     | 23/46                             | 8,75/8,23                | -   | 97               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 318     | 10 deacetylbaecatin III 10O acetyltransferase like     | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 743890187     | 46/47                             | 5,49/5,57                | -<br>K.LAEGLVVPSEPTPTGNLPLSSIDQTPGLR.D<br>K.ALVPYYPLAGR.I | 94<br>88         | MS<br>MS/MS<br>MS/MS | Unique to T150 (responsivo) |
| 324     | Citrate synthase, mitochondrial isoform X              | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 743767268     | 52/48                             | 7,29/7,95                | -   | 79               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 325     | Fumarylacetoacetase                                    | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 743767417     | 47/48                             | 5,56/5,89                | -   | 83               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 327     | Hypothetical protein OsL_11875                         | <i>Oryza sativa Indica Group</i> | gi 218192964     | 16/49                             | 7,4/6,74                 | -   | 85               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |
| 329     | 6phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1like | <i>Elaeis guineensis</i>         | gi 743826793     | 53/50                             | 6,38/7,49                | -   | 91               | MS                   | Unique to T150 (responsivo) |

| Nº spot | Identificação da proteína   | Organismo                | Acesso (NCBI nr) | Massa (kDa) teórica/ experimental | pI teórico/ experimental | Sequência do peptideo              | Pontuação Mascot | Tipo de pesquisa | Razão R/NR                      |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
|---------|---|--------------------------|------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------|------------------|---------------------------------|-----|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------|------------------------------------|-----------|----|-----------------------------|-----|-----------------------------|-----|------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------|------------------|-----------|-------|-----------------------------|-----|---|--------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------|-----------------|-----------|------------------|-----------------------------|-------|-----------------------------------|--------------------------|---|--------------------------|--------------|-------|-----------|-----------------|-----------------------------|-------|--|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------|-------------|---------------------------------|-----|-----------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--------------|-------------------|------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-----|---------------------------|--------------------------|--------------|-------|
| 333     | Catalase isozyme 2<br>Catalase 2, partial                             | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 985701095     | 57/58                             | 6,47/7,69                | -<br>R.VFAYADTQR.H                 | 90               | MS               | Unique to T150 (responsivo)     |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
|         |   |                          | gi 528079284     | 42/58                             | 6,16/7,69                |                                    | 54               | MS/MS            |                                 | 334 | Catalase isozyme 2 | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 985701095       | 57/58                    | 6,47/7,46    | -<br>K.SHIQEYWR.V<br>R.VFAYADTQR.Y | 228       | MS | Unique to T150 (responsivo) | 114 | MS/MS                       | 114 | MS/MS                        | 335                      | catalase isozyme 2 | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 985701095 | 57/58            | 6,47/7,39 | -     | 83                          | MS  | Unique to T150 (responsivo)   | 336                      | elongation factor 1, partial | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 353441128 | 25/58           | 8,16/9,48 | K.YYCTVIDAPGHR.D | 73                          | MS/MS | Unique to T150 (responsivo)       | 338                      | pyrophosphatefructose 6phosphate 1phosphotransferase subunit betalike | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743766355 | 61/64 | 6,52/7,47 | K.GQSHFFGYEGR.C | 72                          | MS/MS | Unique to T150 (responsivo)            | 341                      | phosphoglucomutase, cytoplasmic 2 | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743800771           | 63/71                              | 5,48/5,83 | -           | 79                              | MS  | Unique to T150 (responsivo) | 389                      | pathogenesisrelated protein PRB13-like | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743856849 | 17/41<br>17/41    | 6,48/5,92<br>6,48/5,92 | -<br>R.AAVGVGVPVSWDDTVAAYAQNANQR.I | 104<br>77                       | MS<br>MS/MS | Unique to T150 (não responsivo) | 407 | acidic endochitinase like | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743796702 | 31/28 |
| 334     | Catalase isozyme 2  | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 985701095     | 57/58                             | 6,47/7,46                | -<br>K.SHIQEYWR.V<br>R.VFAYADTQR.Y | 228              | MS               | Unique to T150 (responsivo)     |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
|         |   |                          |                  |                                   |                          |                                    | 114              | MS/MS            |                                 | 114 | MS/MS              | 335                      | catalase isozyme 2 | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 985701095 | 57/58                              | 6,47/7,39 | -  | 83                          | MS  | Unique to T150 (responsivo) | 336 | elongation factor 1, partial | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 353441128       | 25/58                    | 8,16/9,48    | K.YYCTVIDAPGHR.D | 73        | MS/MS | Unique to T150 (responsivo) | 338 | pyrophosphatefructose 6phosphate 1phosphotransferase subunit betalike | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743766355                 | 61/64                    | 6,52/7,47    | K.GQSHFFGYEGR.C | 72        | MS/MS            | Unique to T150 (responsivo) | 341   | phosphoglucomutase, cytoplasmic 2 | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743800771  | 63/71                    | 5,48/5,83    | -     | 79        | MS              | Unique to T150 (responsivo) | 389   | pathogenesisrelated protein PRB13-like | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743856849                      | 17/41<br>17/41           | 6,48/5,92<br>6,48/5,92 | -<br>R.AAVGVGVPVSWDDTVAAYAQNANQR.I | 104<br>77 | MS<br>MS/MS | Unique to T150 (não responsivo) | 407 | acidic endochitinase like   | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743796702                           | 31/28                    | 4,24/3,80    | R.YYDELNNYSATVK.S | 96                     | MS/MS                              | Unique to T150 (não responsivo) |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
| 335     | catalase isozyme 2  | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 985701095     | 57/58                             | 6,47/7,39                | -                                  | 83               | MS               | Unique to T150 (responsivo)     |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
| 336     | elongation factor 1, partial  | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 353441128     | 25/58                             | 8,16/9,48                | K.YYCTVIDAPGHR.D                   | 73               | MS/MS            | Unique to T150 (responsivo)     |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
| 338     | pyrophosphatefructose 6phosphate 1phosphotransferase subunit betalike | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743766355     | 61/64                             | 6,52/7,47                | K.GQSHFFGYEGR.C                    | 72               | MS/MS            | Unique to T150 (responsivo)     |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
| 341     | phosphoglucomutase, cytoplasmic 2                                     | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743800771     | 63/71                             | 5,48/5,83                | -                                  | 79               | MS               | Unique to T150 (responsivo)     |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
| 389     | pathogenesisrelated protein PRB13-like                                | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743856849     | 17/41<br>17/41                    | 6,48/5,92<br>6,48/5,92   | -<br>R.AAVGVGVPVSWDDTVAAYAQNANQR.I | 104<br>77        | MS<br>MS/MS      | Unique to T150 (não responsivo) |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |
| 407     | acidic endochitinase like   | <i>Elaeis guineensis</i> | gi 743796702     | 31/28                             | 4,24/3,80                | R.YYDELNNYSATVK.S                  | 96               | MS/MS            | Unique to T150 (não responsivo) |     |                    |                          |                    |                          |              |                                    |           |    |                             |     |                             |     |                              |                          |                    |                          |              |                  |           |       |                             |     |   |                          |                              |                          |              |                 |           |                  |                             |       |                                   |                          |   |                          |              |       |           |                 |                             |       |  |                          |                                   |                          |                        |                                    |           |             |                                 |     |                             |                          |  |                          |              |                   |                        |                                    |                                 |             |                                 |     |                           |                          |              |       |



### 3.2 – Anotação funcional – GO (Ontologia Gênica)

Aos 14 dias de cultivo as proteínas diferenciais identificadas foram categorizadas dentro de 19 processos biológicos, tanto para o genótipo responsivo, quanto para o genótipo não-responsivo (Fig. 4). Já aos 150 dias de cultivo, as proteínas identificadas em ambos os genótipos foram categorizadas dentro de 27 processos biológicos (Fig. 5). Interessantemente, a frequência relativa dos processos relacionados com a resposta ao estresse e metabolismo foi diminuída aos 14 dias e aumentada aos 150 dias para o genótipo responsivo, quando comparada ao genótipo não-responsivo (Fig. 4 e Fig. 5).

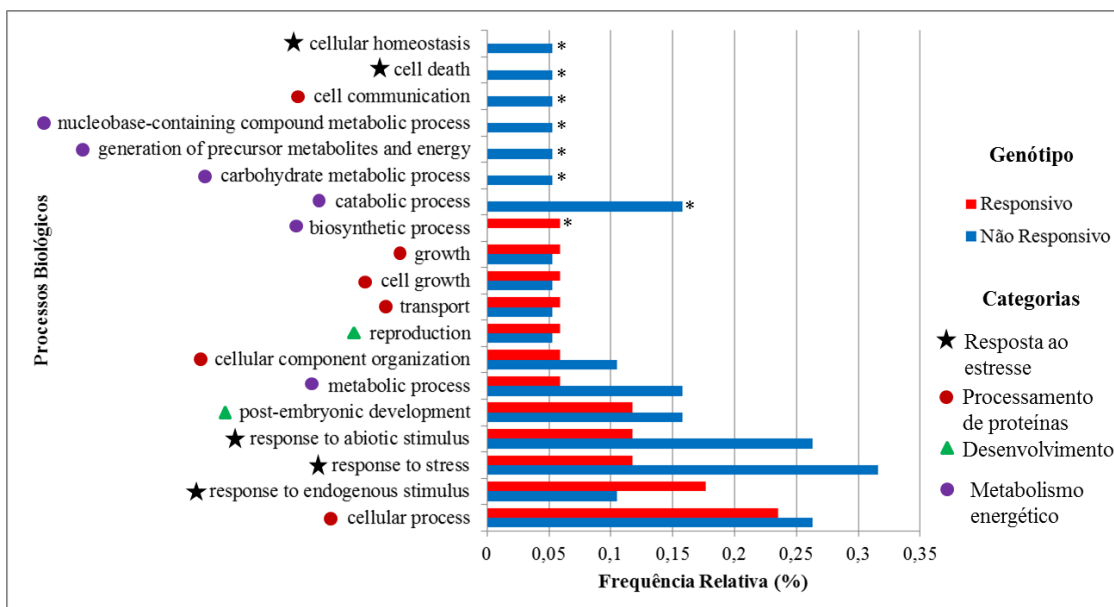
Resultados semelhantes foram observados durante a análise transcriptômica da embriogênese somática em *E. guineensis* em que os processos biológicos de respostas ao estresse e metabolismo energético foram aumentados para a condição de proliferação (células em meio líquido de multiplicação por 30 dias) em relação à condição de iniciação (células em meio líquido por 16 dias para a formação de embriões somáticos), (Lin et al. 2009). O maior número de proteínas envolvidas no metabolismo e resposta ao estresse também foi relatado por Sin et al. (2016).

Low et al. (2008) buscando identificar genes associados com a calogênese e embriogênese em dendezeiro a partir de calos não embriogênicos (NEC), calos embriogênicos (EC) e embriões (EMB), também observaram maior expressão das categorias de processo metabólico e resposta ao estresse, sendo que nesta última o número de ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags*) foi menor em NEC e aumentou gradativamente em EC e EMB. Segundo os autores, é possível que a expressão de genes de resposta ao estresse seja necessária para lidar com as condições impostas na cultura de tecidos, assim, a capacidade para suportar o estresse pode ajudar na proliferação das culturas.

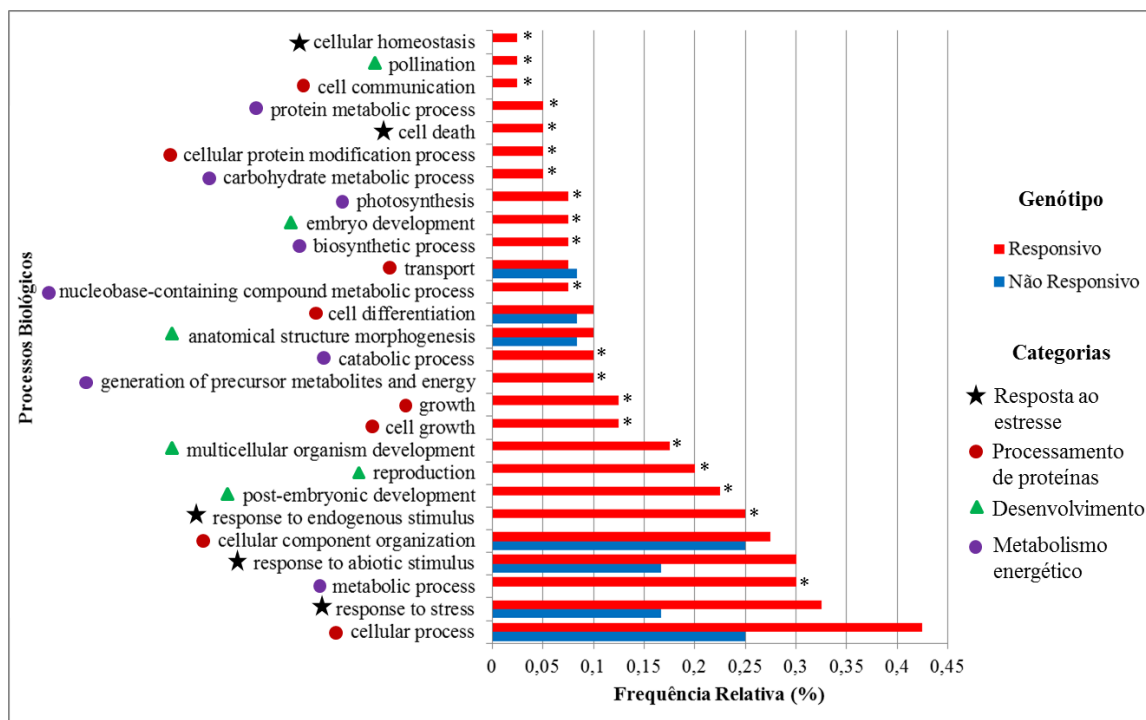
Os resultados do presente estudo indicam que a condição *in vitro* imposta aos genótipos levou ao evento de estresse, que parece ser necessário para o sucesso da aquisição de competência embriogênica, desde que o genótipo consiga se adaptar. Nesta situação, o genótipo responsivo parece ser o mais adaptável ao cultivo *in vitro* em relação ao genótipo não-responsivo.

Os processos biológicos obtidos aos 14 e 150 dias foram agrupados em 4 categorias que incluem proteínas envolvidas com resposta ao estresse, processamento de

proteínas, metabolismo energético e desenvolvimento (Fig. 4 e Fig. 5). Este agrupamento foi feito de acordo com o GO (Tabela Suplementar 1) e as proteínas foram alocadas em determinada categoria baseado na literatura, buscando compreender sua participação na aquisição da competência embriogênica.



**Figura 4.** Processos biológicos e categorias nas quais estão inseridas as proteínas durante a aquisição de competência embriogênica em genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) aos 14 dias de cultivo. Asteriscos (\*) indicam processos que podem apresentar proteínas exclusivas e/ou proteínas que estão aumentadas nos genótipos (ver cor da legenda).



**Figura 5.** Processos biológicos e categorias nas quais estão inseridas as proteínas durante a aquisição de competência embriogênica em genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*) aos 150 dias de cultivo. Asteriscos (\*) indicam processos que podem apresentar proteínas exclusivas e/ou proteínas aumentadas nos genótipos (ver cor da legenda).

### 3.2.1 – Proteínas envolvidas com resposta ao estresse

A resposta de plantas a diferentes estresses é complexa e envolve mudanças nos níveis transcriptômico, celular e fisiológico (Atkinson e Urwin 2012). Embora a relação entre o estresse e ES não seja bem compreendida, em algumas espécies vegetais o estresse pode reprogramar células somáticas para atuarem na embriogênese (Fehér et al. 2003; Quiroz-Figueroa et al. 2006; Liu et al. 2015).

Sabe-se que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e espécies reativas de oxigênio (ROS) agem como moléculas sinalizadoras importantes na resposta ao estresse biótico e abiótico, pois servem como mensageiros para a ativação de genes de defesa (Foyer e Noctor 2012). Adicionalmente, já foi relatado que alguns reguladores de crescimento vegetal, entre eles a auxina, produzem ROS por meio da ativação de NADPH oxidases (Joo et al. 2005; Xia et al. 2011).

Em nosso estudo, algumas das proteínas identificadas estão envolvidas com a resposta ao estresse atuando principalmente na resposta ao estresse oxidativo, resposta a auxina, injúria,  $H_2O_2$ , morte celular e ROS, são elas: actina-101 (spot 365), isoenzima

catalase 2 (spot 254, 301, 333, 334 e 335) e mono-dehidro-ascorbato-redutase isoforma cloroplástica X2 (spot 150). Entre estas proteínas, a actina foi aumentada e a catalase diminuída aos 14 dias de indução no genótipo responsivo, em relação ao não-responsivo (Tabela 2). Interessantemente, a actina está envolvida com a resposta a injúria, enquanto que catalase está envolvida com resposta a auxina e estresse oxidativo (Tabela Suplementar 1).

Actina tem sido implicada no processo de morte celular programada da célula vegetal (Smertenko e Franklin-Tong 2011) e, devido a isso, é considerada um efetivo marcador de sinalização durante este processo (Gourlay e Ayscough 2005). Silva et al. (2014a) já haviam relatado a participação dessa proteína aos 14 dias de indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de dendezeiro. Quanto à catalase (spot 254), trata-se de uma proteína antioxidante que age na regulação de ROS, e sua atividade reduzida resulta no acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Araldi et al. 2016; Zhou et al. 2016). Assim, é possível que a ocorrência destas proteínas aos 14 dias de indução esteja relacionada com a injúria do tecido que antecede o cultivo *in vitro*, e posteriormente à ação da auxina picloram durante a indução.

Já aos 150 dias de indução, a catalase (spots 301, 333, 334 e 335) foi exclusiva do genótipo responsivo e a proteína mono-dehidro-ascorbato-redutase isoforma cloroplástica X2 (spot 150) apresentou alta abundância neste genótipo e baixa para o genótipo não-responsivo (Tabela 3). Neste período, o genótipo responsivo apresentou menor nível de oxidação e induziu a formação de calos, quando comparado ao não-responsivo (Fig. 3). Isto pode ter ocorrido devido à alta abundância do spot 150, o qual gera ascorbato reduzido prevenindo o acúmulo do radical monodehidroascorbato que, por sua vez, pode interferir negativamente no processo embriogênico (De Gara e Tommasi 1999). Estes dados são interessantes, pois, assim como catalase, mono-dehidro-ascorbato também possui atividade antioxidante (Shohael et al. 2006; Zhang et al. 2010; Díaz-Vivancos et al. 2011; Zhang et al. 2015). Por outro lado, a baixa abundância de mono-dehidro-ascorbato-redutase no genótipo não-responsivo pode ter contribuído para os altos níveis de oxidação que pode ter sido a causa para a não formação de calos neste genótipo.

### 3.2.2 – *Processamento de proteínas*

Proteínas “heat shock” (HSP) compreendem uma família multigênica que tem estado envolvida com o dobramento, construção, translocação e degradação de proteínas (Reis et al. 2016). Além de participar da estabilização de proteínas e membranas, esta família mantém proteínas não nativas em um estado competente para subsequente redobramento sob condições de estresse (Wang et al. 2004; Zi et al. 2013).

Neste trabalho, aos 14 dias de indução foi identificada a proteína de choque térmico 81-1 (*spot* 404) que estava presente para o genótipo responsivo em relação ao não-responsivo. Já aos 150 dias de indução, esta proteína (*spot* 201) aparece para o genótipo responsivo, porém diminuída. Na literatura já foi relatado que proteínas HSPs são ativamente reguladas também durante a embriogênese, além de atuarem indiretamente na resposta ao estresse (Hajduch et al. 2006; Sharifi et al. 2012; Xu et al. 2012; Zi et al. 2013; Silva et al. 2014a). Assim, considerando sua expressão aos 150 dias para o genótipo responsivo, é possível que a atividade da proteína de choque térmico 81-1 esteja ocorrendo em direção à aquisição de competência embriogênica.

Outra proteína identificada em nosso estudo e relacionada ao processamento de proteínas foi cisteína sintase (*spot* 95), aumentada aos 150 dias de indução para o genótipo responsivo, quando comparada ao não-responsivo. Esta proteína catalisa a biossíntese do composto cisteína enxofre, que serve como um precursor para a síntese de vários metabólitos contendo enxofre, como por exemplo, a glutatona (Noctor et al. 1998), que por sua vez, devido a respostas de estresse biótico e abiótico, age removendo ROS (Foyer e Noctor 2005). Em alguns trabalhos, já foi relatado que em presença de auxina, cisteína sintase age na regulação do estresse oxidativo podendo estimular a diferenciação celular e promover a formação de embriões somáticos (Youssefian et al. 2001; Pan et al. 2010). Assim, isto pode explicar o aumento em quatro vezes desta proteína no genótipo responsivo em relação ao não-responsivo aos 150 dias de indução, sugerindo o seu papel na aquisição de competência embriogênica.

### 3.2.3 – Metabolismo energético

No presente estudo, várias proteínas relacionadas ao metabolismo energético foram identificadas (Tabela Suplementar 1), mas chamamos a atenção para cinco delas: enolase (*spot* 161), 6-fosfogluconato desidrogenase decarboxilase 1 (*spot* 329), subunidade beta da pirofosfatofrutose-6-fosfato-1-fosfotransferase (*spot* 338), 2,3-bisfosfoglicerato independente fosfoglicerato mutase (*spot* 1) e subunidade maior da rubisco isoforma X2 (*spot* 174). Enolase e rubisco foram aumentadas aos 150 dias de indução no genótipo responsivo quando comparado ao não-responsivo, e a proteína 6-fosfogluconato desidrogenase decarboxilase 1 foi exclusiva para o genótipo responsivo.

O principal papel da enolase é a conversão de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (PEP) na via glicolítica, convertendo glicose em piruvato, tendo como produto final NADH e ATP (Barkla et al. 2009). Porém, durante a via glicolítica, NAD<sup>+</sup> deve ser reduzido a NADH e para que isto ocorra são necessárias enzimas desidrogenases (Morel et al. 2014). Todo este processo de conversão ocorre, uma vez que grandes quantidades de PEP são necessárias para fornecer energia no desenvolvimento do tecido, dessa forma, uma alta abundância de enolase é esperada (Wold e Ballou 1957; Rode et al. 2011). Alguns trabalhos na literatura também relataram estas proteínas como envolvidas no processo de embriogênese, sendo que a enolase também se apresentou em alta abundância (Lippert et al. 2005; Andriotis et al. 2010; Silva et al. 2014a), corroborando assim os resultados deste estudo.

Também é importante ressaltar neste período de tempo (150 dias) a participação da proteína rubisco isoforma X2 (*spot* 174), uma vez que sua ocorrência não era esperada nos tecidos aclorofilados do palmito. Apesar de não ser esperada em tecidos aclorofilados, a rubisco já foi relatada como altamente abundante em tecidos heterotróficos (raízes) sobre condições de estresse, mas ainda há muito que se conhecer sobre sua funcionalidade nestes tecidos (Jacoby et al. 2013; Nunes-Nesi et al. 2014). Até então, para o presente, dado o seu aumento em abundância no genótipo responsivo e a condição *in vitro* imposta, é sugerido que a participação da rubisco aos 150 dias de indução esteja relacionada à fotorrespiração do tecido, a qual evita o acúmulo de produtos tóxicos como o 2-fosfoglicerato (Bauwe et al. 2012). Assim, este relato também pode explicar o baixo nível oxidativo dos tecidos neste genótipo, quando

comparado ao genótipo não-responsivo, uma vez que a rubisco poderia estar agindo no controle deste estresse.

Com relação à subunidade beta da pirofosfatofrutose-6-fosfato-1 fosfotransferase (*spot* 338) e 2,3 bisfosfoglicerato independente fosfoglicerato mutase (*spot* 1), são proteínas que apresentam atividade fosfatase e participam da degradação do carboidrato na via da glicólise (Graña et al. 1989; Liu et al. 2016). Ambas as proteínas já foram associadas com o fornecimento de energia durante a indução de calos em *Nelumbo nucifera* Gaertn. spp. *baijianlian*, na formação e desenvolvimento de embriões torpedo de *Coffea arabica* e também em suspensões celulares de *E. guineensis* em resposta a diferentes concentrações de auxina (Roowi et al. 2010; Tonietto et al. 2012; Liu et al. 2016). Interessantemente, em nosso estudo, estas proteínas aparecem aos 150 dias de indução, sendo o *spot* 338 exclusivo e o *spot* 1 aumentado em nove vezes para o genótipo responsivo quando comparados ao genótipo não-responsivo.

Os resultados aqui apresentados podem explicar a aquisição de competência embriogênica no genótipo responsivo aos 150 dias de indução, sugerindo que estas cinco proteínas (*spots* 161, 329, 338, 1 e 174) são necessárias para o sucesso do processo, fato não ocorrido no genótipo não-responsivo. Adicionalmente, o comportamento destas proteínas pode indicar um alto gasto energético na indução dos calos. Assim, para haver um alto consumo energético é necessário que haja uma alta produção de ATP, e isto pode explicar a alta abundância dos *spots* 161 e 1, e a ocorrência exclusiva dos *spots* 329 e 338 no genótipo responsivo.

#### 3.2.4 – Desenvolvimento

Entre as proteínas envolvidas com o desenvolvimento, várias foram identificadas aos 150 dias de indução. Algumas dessas proteínas parecem ter um papel importante no desenvolvimento dos calos em dendezeiro como é o caso da anexina D1 (*spot* 308).

Anexina D1 é uma proteína exclusiva do genótipo responsivo aos 150 dias de indução. Trata-se de uma proteína multifuncional que interage com os componentes de membrana, os quais estão envolvidos na organização estrutural da célula, agindo assim na sinalização e controle do crescimento intracelular (Gerke e Moss 2002; Moss e Morgan 2004). Adicionalmente, já foi relatado que as anexinas estão relacionadas a outros processos de desenvolvimento vegetal, como germinação do pólen e

alongamento das fibras de algodão (Dai et al. 2007; Zhao et al. 2010; Laohavisit e Davies 2011), além de atuarem nos estágios iniciais da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de dendezeiro; durante a embriogênese somática de *Coffea arabica* L. e como marcador molecular dos estágios de desenvolvimento de embriões somáticos de *Manihot esculenta* Crantz (Baba et al. 2008; Tonietto et al. 2012; Silva et al. 2014a). Desta forma, esta proteína pode estar relacionada com o processo de desenvolvimento ou formação de calos na embriogênese somática de dendezeiro.



#### 4 – Conclusões

A análise proteômica permitiu a visualização das mudanças no perfil proteico ao longo do tempo entre os genótipos, com os *spots* aumentando ou diminuindo sua abundância.

Um total de 52 proteínas diferenciais foram encontradas aos 14 dias de indução, e 74 aos 150 dias entre os genótipos responsivo e não-responsivo. Aos 14 dias, o genótipo responsivo apresentou 9 proteínas exclusivas e o genótipo não-responsivo 12. Já aos 150 dias, o genótipo responsivo apresentou 40 proteínas exclusivas, enquanto que o genótipo não-responsivo somente 2. Estes resultados sugerem a participação efetiva destas proteínas na aquisição de competência embriogênica, principalmente no genótipo responsivo que induziu a formação de calos aos 150 dias.

O agrupamento das proteínas de acordo com sua ontologia gênica (GO) revelou quatro categorias principais, que compreendem: proteínas envolvidas com resposta ao estresse, processamento de proteínas, metabolismo energético e desenvolvimento. No geral, 11 proteínas foram identificadas como importantes na aquisição de competência embriogênica: actina-101 (*spot* 365), isoenzima catalase 2 (*spot* 254), mono-dehidro-ascorbato-redutase isoforma cloroplástica X2 (*spot* 150), proteína de choque térmico 81-1 (*spot* 404), cisteína sintase (*spot* 95), enolase (*spot* 161), 6-fosfogluconato desidrogenase decarboxilada 1 (*spot* 329), anexina D1 (*spot* 308), subunidade beta da pirofosfatofrutose-6-fosfato-1-fosfotransferase (*spot* 338), 2,3 bisfosfoglicerato independente fosfoglicerato mutase (*spot* 1) e RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha isoform X2 (*spot* 174). Estas proteínas, por sua vez, apresentam importantes papéis relacionados principalmente com as respostas ao estresse e metabolismo energético, onde participam no controle da oxidação e adaptação dos genótipos à condição *in vitro* imposta durante a indução da embriogênese somática.

Assim, com este estudo foi possível identificar várias proteínas associadas à aquisição da competência embriogênica em dendezeiro. Estes resultados fornecem informações importantes para estudos futuros de validação de função e confirmação do envolvimento dessas proteínas na embriogênese somática. Adicionalmente, eles serão úteis em estudos de expressão gênica durante o processo de embriogênese somática e também no melhoramento da espécie, visando a otimização do protocolo e sua propagação em larga escala.

## Referências bibliográficas

- Adam H, Collin M, Richaud F, et al (2011) Environmental regulation of sex determination in oil palm: Current knowledge and insights from other species. *Ann Bot* 108:1529–1537. doi: 10.1093/aob/mcr151
- Adam H, Jouannic S, Escoute J, et al (2005) Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). *Am J Bot* 92:1836–1852. doi: 10.3732/ajb.92.11.1836
- Agriculture USD (2011) The oilseeds group - World markets and trade 2001-2011. <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>. Accessed 20 Jun 2012
- Ahé J, Arthuis P, Cas G, et al (1981) Du Palmier À Huile Par Embryogénèse Somatique. *Oléagineux* 36:113–118.
- Almeida AM, Parreira JR, Santos R, et al (2012) A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiol Plant* 146:236–249. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01633.x
- Alves S, Lemos O, Santos Filho B, Silva L (2011) In vitro protocol optimization for development of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H . B . K) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.). *J Biotechnol Biodivers* 2:1–6.
- Andriotis V, Kruguer N, Pike M, Smith A (2010) Plastidial glycolysis in developing *Arabidopsis* embryos. *New Phytol* 185:649–662.
- Araldi CG, Coelho CMM, Gaziola SA, Azevedo RA (2016) Storage elicits a fast antioxidant enzyme activity in *Araucaria angustifolia* embryos. *Acta Physiol Plant*. doi: 10.1007/s11738-016-2219-2
- Arolu IW, Rafii MY, Marjuni M, et al (2016) Genetic variability analysis and selection of pisifera palms for commercial production of high yielding and dwarf oil palm planting materials. *Ind Crops Prod* 90:135–141. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.06.006
- Atkinson N, Urwin P (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA genes to the field. *J Exp Bot* 63:695–703523–3544. doi: 10.1093/jxb/err313
- Baba A, Nogueira F, Pinheiro C, et al (2008) Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Sci* 175:717–723.
- Bakoumé C, Wickneswari R, Siju S, et al (2015) Genetic diversity of the world's largest oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) field genebank accessions using microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol* 62:349–360. doi: 10.1007/s10722-014-0156-8
- Balzon TA, Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2013) New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *Vitr Cell {&} Dev Biol - Plant* 49:41–50. doi: 10.1007/s11627-012-9479-3
- Barbosa NML, Cunha GAP da, Reinhardt DH, et al (2003) Indução De Alterações Morfológicas E Anatômicas Em Folhas De Abacaxizeiro “Pérola” Pelo Ácido 2-(3-Clorofenoxi) Propiônico. *Rev Bras Frutic* 25:386–389.
- Barcelos E, Amblard P, Berthaud J, Seguin M (2002) Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. *Pesqui Agropecu Bras* 37:1105–1114. doi: 10.1590/S0100-204X2002000800008
- Barcelos E, Chaillard H, Nunes CDM, et al (1995) A cultura do dendê. EMBRAPA–SPI, Brasília

- Barcelos E, Nunes CDM, Cunha RD (2000) Melhoramento genético e produção de sementes comerciais de dendezeiro. In: Viégas IJM, Muller AA (eds) cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Embrapa Amazônia Oriental/Embrapa Amazônia Ocidental, Belém, pp 145–174
- Barcelos E, Rios S de A, Cunha RN V., et al (2015) Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. *Front Plant Sci* 6:1–16. doi: 10.3389/fpls.2015.00190
- Barkla B, Vera-Estrella R, Hernandez-Coronado M, Pantojato O (2009) Quantitative Proteomics of the Tonoplast Reveals a Role for Glycolytic Enzymes in Salt Tolerance. *Plant Cell* 21:4044–4058.
- Basiron Y (2007) Palm oil production through sustainable plantations. *Eur J Lipid Sci Technol* 109:289–295. doi: 10.1002/ejlt.200600223
- Bauwe H, Hagemann M, Kern R, Timm S (2012) Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 15:269–275.
- Beirnaert A, Vanderweyen R (1941) Contribution à l'étude génétique et biométrique des variétés d'*Elaeis guineensis* Jacquin. I.N.E.A.C, Bruxelles
- Benson EE (2000) In vitro plant recalcitrance: an introduction. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 36:141–148. doi: 10.1007/s11627-000-0029-z
- Besse I, Verdeil JL, Duval Y, et al (1992) Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Clonal Fidelity: Endogenous Cytokinins and Indoleacetic Acid in Embryogenic Callus Cultures. *J Exp Bot* 43:983–989. doi: 10.1093/jxb/43.7.983
- Beulé T, Camps C, Debieesse S, et al (2011) Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormality in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Tree Genet Genomes* 7:169–182. doi: 10.1007/s11295-010-0323-9
- Billote N, Noyer JL, Kouamé B, et al (1999) Identification of a candidate marker for shell presence in the oil palm using amplified fragment length polymorphism (AFLP) by bulked segregant analysis (BSA). In: Plant and Animal Genomes Conference. pp 17–21
- Boari ADJ (2008) Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil. Embrapa Amaz Orient Doc 348–359.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Campostrini E, Otoni WC (1996) Aclimatização de plantas: abordagens recentes.
- Cangahuala-Inocente GC, Villarino A, Seixas D, et al (2009) Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. *Acta Physiol Plant* 31:501–514. doi: 10.1007/s11738-008-0259-y
- Carmo LST, Resende RO, Silva LP, et al (2013) Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics* 13:1947–1960. doi: 10.1002/pmic.201200547
- Chen AH, Yang JL, Niu Y Da, et al (2010) High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA3, and BA on somatic embryo development. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 102:357–364. doi: 10.1007/s11240-010-9740-6
- Chinchilla C (2008) The many faces of spear rots in oil palm: the need for an integrated management approach. *ASD Oil Palm Pap* 32:1–25.
- Choi J, Sung Z (1984) Two-dimensional gel analysis of carrot somatic embryonic proteins. *Plant Mol Biol Report* 2:19–25. doi: 10.1007/BF02885643

- Collares D (2011) Produção de cultivares e sementes de dendê na Embrapa. *Agroenergia em Rev* 2:30–31.
- Constantin M, Nchu W, Godswill N-N, et al (2015) Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *Tenera*) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. *J Appl Biol Biotechnol* 3:4–10. doi: 10.7324/JABB.2015.3402
- Corley R, Hereward V, Tinker P (2003) *The Oil Palm*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK
- Costa CJ, Marchi ECS (2008) Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. *Doc Embrapa Cerrados* 35.
- Costa FH da S, Pereira JES, Pereira MAA, Oliveira JP de (2006) Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). *Rev Bras Frutic* 28:280–283.
- Cunha RNV, Lopes R, Rocha RNC, et al (2012) Domestication and breeding of the American oil palm. In: Borém A, Lopes MTG, Clement CR, Noda H (eds) *Domestication and breeding: Amazonian species*. UFV, Viçosa, pp 275–296
- Dai S, Wang T, Yan X, Chen S (2007) Proteomics of pollen development and germination. *J Proteome Res* 6:4556–4563.
- De Carvalho AV, Rodrigues Alves BJ, Reis VM (2006) Resposta do dendezeiro à adição de nitrogênio e sua influência na população de bactérias diazotróficas. *Pesqui Agropecu Bras* 41:293–300. doi: 10.1590/S0100-204X2006000200014
- De Gara L, Tommasi F (1999) Ascorbate redox enzymes: a network of reactions involved in plant development. *Recent Res Dev Phytochem* 3:1–15.
- De Touchet B, Duval Y, Pannetier C (1991) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Rep* 10:529–532.
- Dewitte W, Murray A (2003) The plant cell cycle. *Annu Rev Biol* 54:235–5364. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828
- Di Carli M, Benvenuto E, Donini M (2012) Recent insights into plant-virus interactions through proteomic analysis. *J Proteome Res* 11:4765–4780. doi: 10.1021/pr300494e
- Dias LL, Santa-Catarina C, Floh EIS, Silveira V (2007) Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. *Rev Bras Horticult Ornament* 13:2002–2008.
- Díaz-Vivancos P, Majourhat K, Fernández JA, et al (2011) Study of the antioxidant enzymatic system during shoot development from cultured intercalary meristems of saffron. *Plant Growth Regul* 65:119–126. doi: 10.1007/s10725-011-9581-2
- Don Palmer C, Keller WA (2011) Somatic embryogenesis in *Crambe abyssinica* Hochst. ex R.E. Fries using seedling explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 104:91–100. doi: 10.1007/s11240-010-9808-3
- Dudits D, Györgyey J, Bögre L, Bakó L (1995) Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in plants*. Springer Netherlands, pp 267–308
- Dumas E, Monteouis O (1995) In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 40:231–235.
- Durzan DJ (1988) Somatic Polyembryogenesis for the Multiplication of Tree Crops. *Biotechnol Genet Eng Rev* 6:341–378. doi: 10.1080/02648725.1988.10647852
- Duval Y, Gasselín TD, Konan K, Pannetier C (1988) Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par culture in vitro. *Stratégie et résultats. Oléagineux* 43:39–47.
- Eeuwens CJ (1976) Mineral Requirements for Growth and Callus Initiation of Tissue

- Explants Excised from Mature Coconut Palms (*Cocos nucifera*) and Cultured in vitro. *Physiol Plant* 36:23–28. doi: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb05022.x
- Elhiti M, Stasolla C, Wang A (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 49:631–642. doi: 10.1007/s11627-013-9547-3
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:201–228. doi: 10.1023/A:1024033216561
- Ferreira DF (2011) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. 225–258.
- Ferwerda JD (1975) Ecophysiology of the african oil palm. In: *Ecophysiology of tropical crops*. Cplac, Ilhéus, pp 1–49
- Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep* 21:517–24. doi: 10.1007/s00299-002-0558-5
- Foyer C, Noctor G (2012) Managing the cellular redox hub in photosynthetic organisms. *Plant cell Environ* 35:191–201.
- Foyer C, Noctor G (2005) Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling : A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* 17:1866–1875. doi: 10.1105/tpc.105.033589
- Fridborg G, E. LL, Ericksson T (1978) The effect of Activated charcoal as an additive to the plant tissue cultures; absorbtion of metabolites inhibiting morphogenesis. 43:104–106.
- Gerke V, Moss S (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82:331–371.
- Glimn-Lacy J, Kaufman PB (2006) Plant family (Arecaceae). In: *Botany Illustrated – Introduction to plants, major groups, flowering plant families*. pp 125–126
- Gomes HT, Bartos PMC, Balzon TA, Scherwinski-Pereira JE (2016) Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. *Ind Crops Prod* 89:244–249. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.05.021
- Gomes HT, Bartos PMC, Silva CO, et al (2014) Comparative biochemical profiling during the stages of acquisition and development of somatic embryogenesis in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Growth Regul* 74:199–208. doi: 10.1007/s10725-014-9901-4
- Gonçalves ACR (2001) Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: *Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendezeiro e oliveira*. Stoller do Brasil, Cosmópolis, pp 95–112
- Gontijo TS, Fernandes EA, Saraiva MB (2011) Análise da volatilidade do retorno da commodity dendê: 1980-2008. *Rev Econ e Sociol Rural* 49:857–874. doi: 10.1590/S0103-20032011000400003
- Gourlay C, Ayscough K (2005) The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:583–589.
- Graña X, Ureña J, Ludevid D, et al (1989) Purification, characterization and immunological properties of 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase from maize (*Zea mays*) seeds. 2001 186:149–153.
- Grattapaglia D, Machado MA, Torres AC, et al (1998) Micropropagação. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. pp 183–260
- Guedes S, Loureiro T, Luis ZG (2011) Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. *African J Biotechnol* 10:10774–10780. doi: 10.5897/AJB11.152

- Guerra M, Handro W (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. *J Plant Res* 111:65–71.
- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB, et al (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. p 864
- Gueye B, Morcillo F, Collin M, et al (2009) Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 99:35–45. doi: 10.1007/s11240-009-9573-3
- Hajduch M, Casteel JE, Hurrelmeyer KE, et al (2006) Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* 141:32–46. doi: 10.1104/pp.105.075390
- Hilae A, Te-chato S (2005) Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm ( *Elaeis guineensis* Jacq ). *Songklanakarin J Sci Technol* 27:629–635.
- Huong LTL, Baiocco M, Huy BP, et al (1999) Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56:1–7. doi: 10.1023/A:1006231832555
- Imin N, Nizamidin M, Daniher D, et al (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* . Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiol* 137:1250–1260. doi: 10.1104/pp.104.055277
- Jacoby R, Millar A, Taylor N (2013) Application of selected reaction monitoring mass spectrometry to field-grown crop plants to allow dissection of the molecular mechanisms of abiotic stress tolerance. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2013.00020
- Jaligot E, Adler S, Debladis E, et al (2011) Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. *Ann Bot* 108:1453–1462. doi: 10.1093/aob/mcq266
- Jayanthi M, Susanthi B, Murali Mohan N, Mandal PK (2015) In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). *Springerplus* 4:256. doi: 10.1186/s40064-015-1025-4
- Jiménez VM (2001) Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev Bras Fisiol Veg* 13:196–223. doi: 10.1590/S0103-31312001000200008
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. New York
- Jones LH (1974) Propagation of clonal oil palms by tissue culture. *Oil Palm News* 17:1–8.
- Joo JH, Yoo HJ, Hwang I, et al (2005) Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett* 579:1243–1248.
- Joosen R, Cordewener J, Supena EDJ, et al (2007) Combined Transcriptome and Proteome Analysis Identifies Pathways and Markers Associated with the Establishment of Rapeseed Microspore-Derived Embryo Development. *Plant Physiol* 144:155–172. doi: 10.1104/pp.107.098723
- Jouannic S, Lartaud M, Hervé J, et al (2011) The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; Arecaceae): Developmental progression and dynamics. *Ann Bot* 108:1477–1487. doi: 10.1093/aob/mcr019
- Kanchanapoom K, Domyoas P (1999) The Origin and Development of Embryoids in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq) Embryo Culture. *ScienceAsia* 25:195–202.

- Karami O, Saidi A (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol Biol Rep* 37:2493–2507. doi: 10.1007/s11033-009-9764-3
- Karun A, Siril EA, Radha E, Parthasarathy VA (2004) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). *Curr Sci* 86:1623–1628.
- Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26:231–243. doi: 10.1007/BF00281458
- Konan EE, Durand-Gasselin T, Kouadio JY, et al (2006) A modeling approach of the in vitro conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 84:99–112. doi: 10.1007/s11240-005-9010-1
- Konan KE, Durand-Gasselin T, Kouadio YJ, et al (2010) In vitro conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: Characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Rep* 29:1–13. doi: 10.1007/s00299-009-0787-y
- Kuroda H (1995) Detection of embryogenesis- and organogenesis-specific glycoproteins in rice calli. Yoshida, KT Mizobuchi-Fukuoka, R Sakata, M Tak G 45:493–496. doi: 10.1248/cpb.37.3229
- Laohavisit A, Davies J (2011) Annexins. *New Phytol* 189:40–53.
- Ledo ADS, Lameira OA, Benbadis AK, et al (2002) Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Rev Bras Frutic* 24:601–603. doi: 10.1590/S0100-29452002000300004
- Legrand S, Hendriks T, Hilbert J-L, Quillet M-C (2007) Characterization of expressed sequence tags obtained by SSH during somatic embryogenesis in *Cichorium intybus* L. *BMC Plant Biol* 7:27. doi: 10.1186/1471-2229-7-27
- Levermann R, de Souza J (2014) Óleo de palma: o crescimento da indústria global. *Merc. Negócios - Agroanalysis* 13–15.
- Lin HC, Morcillo F, Dussert S, et al (2009) Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: Evidence for conserved gene functions in early development. *Plant Mol Biol* 70:173–192. doi: 10.1007/s11103-009-9464-3
- Lippert D, Zhuang J, Ralph S, et al (2005) Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* 5:461–473. doi: 10.1002/pmic.200400986
- Litz RE, Gray DJ (1995) Somatic embryogenesis improvement. *World J Microbiol Biotechnol* 11:416–425.
- Liu CP, Yang L, Shen HL (2015) Proteomic analysis of immature *Fraxinus mandshurica* cotyledon tissues during somatic embryogenesis: Effects of explant browning on somatic embryogenesis. *Int J Mol Sci* 16:13692–13713. doi: 10.3390/ijms160613692
- Liu Y, Chaturvedi P, Fu J, et al (2016) Induction and quantitative proteomic analysis of cell dedifferentiation during callus formation of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.spp. baijianlian). *J Proteomics* 131:61–70. doi: 10.1016/j.jprot.2015.10.010
- Lobato RFN (2016) GERMINAÇÃO DE SEMENTES E VIGOR DE MUDAS DE BRS MANICORÉ (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*). Universidade Federal do Amazonas
- López JL (2007) Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J Chromatogr B* 849:190–202. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.11.049
- Lorenzi H, Souza H, Costa JTM, et al (2004) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Instituto Plantarum, Nova Odessa

- Low E-T, Alias H, Boon S-H, et al (2008) Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. *BMC Plant Biol* 8:62. doi: 10.1186/1471-2229-8-62
- Lu C-Y, Vasil IK (1985) Histology of Somatic Embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea Grass). *Am J Bot* 72:1908–1913. doi: 10.2307/2443607
- Luis ZG, Bezerra KMG, Scherwinski-Pereira JE (2010) Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. *Brazilian Soc Plant Physiol* 22:209–215.
- Luis ZG, Scherwinski-Pereira JE (2014) An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118:485–496. doi: 10.1007/s11240-014-0500-x
- Maciel SA, Fermino Junior PCP, Silva RA, Scherwinski-Pereira JE (2010) Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Sci Agron* 32:263–267. doi: 10.4025/actasciagron.v32i2.3248
- Mahdavi-Darvari F, Noor NM, Ismanizan I (2015) Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 120:407–422. doi: 10.1007/s11240-014-0615-0
- Marbun CLM, Toruan-Mathius N, Utomo C, Liwang T (2015) Micropropagation of Embryogenic Callus of Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) Using Temporary Immersion System. *Procedia Chem* 14:122–129. doi: 10.1016/j.proche.2015.03.018
- Marsoni M, Bracale M, Espen L, et al (2008) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep* 27:347–356. doi: 10.1007/s00299-007-0438-0
- Mazri MA (2013) Effect of Basal Medium , Explants Size and Density on the In Vitro Proliferation and Growth of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivar “ 16-bis .” *Not Sci Biol* 5:332–337.
- McCarthy FM, Wang N, Magee GB, et al (2006) AgBase: A Functional Genomics Resource for Agriculture. In: *BMC Genomics*. <http://www.agbase.msstate.edu/>. Accessed 13 Sep 2016
- Monteoliva L, Albar JP (2004) Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3:220–239. doi: 10.1093/bfpg/3.3.220
- Morcillo F, Aberlenc-Bertossi F, Noirot M, et al (1999) Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos. *Plant Cell Rep* 18:868–872. doi: 10.1007/s002990050676
- Morel A, Trontin JF, Corbineau F, et al (2014) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240:1075–1095. doi: 10.1007/s00425-014-2125-z
- Moss S, Morgan R (2004) The annexins. *Genome Biol* 5:219.1-219.8.
- Moura EF, Motoike SY, Ventrella MC, et al (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Sci Hortic (Amsterdam)* 119:447–454. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.033
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY, et al (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 95:175–184. doi: 10.1007/s11240-008-9430-9



- Muniran F, Bhore SJ, Shah FH (2008) Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. "dura": Comparison of three basal media for efficient regeneration. *Indian J Exp Biol* 46:79–82.
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Murphy DJ (2007) Future prospects for oil palm in the 21st century: Biological and related challenges. *Eur J Lipid Sci Technol* 109:296–306. doi: 10.1002/ejlt.200600229
- Noah AM, Niemenak N, Sunderhaus S, et al (2013) Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J Proteomics* 78:123–133. doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.007
- Noctor G, Cyr RD Saint, Foyer CH (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE : Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249–279.
- Noiret J (1981) Application de la culture in vitro a l'amelioration et a la production de materiel clonal chez le palmier a huile. *Oléagineux* 36:123–126.
- Nunes-Nesi A, Florian A, Howden A, et al (2014) Is there a metabolic requirement for photorespiratory enzyme activities in heterotrophic tissues? *Mol Plant* 7:248–251. doi: 10.1093/mp/sst111
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373. doi: 10.1007/BF01248568
- O'Farrell PH (1975) High Resolution of Proteins \* Electrophoresis. *J Biol Chem* 250:4007–4021. doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.010
- Obisesan O, Fatunla T (1983) Genotype x environment interaction for bunch yield and its components in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor Appl Genet* 64:133–136.
- Othmani A, Bayouhd C, Drira N, et al (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 97:71–79. doi: 10.1007/s11240-009-9500-7
- Owen HR, Wengerd D, Miller AR (1991) Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. *Plant Cell Rep* 10:583–586.
- Pádua MS, Paiva L V., Labory CRG, et al (2013) Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. *An Acad Bras Cienc* 85:1545–1556. doi: 10.1590/0001-37652013107912
- Pan MJ, Van Staden J (1998) The use of charcoal in in vitro culture - A review. *Plant Growth Regul* 26:155–163. doi: 10.1023/A:1006119015972
- Pan Z, Zhu S, Guan R, Deng X (2010) Identification of 2,4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 103:145–153. doi: 10.1007/s11240-010-9762-0
- Pennington SR, Dunn MJ (2001) Proteomics: from protein sequence to function. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- Pereira AR, de Carvalho SP, Pasqual M, Santos FC (2007) Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: Efeito de cinetina e ácido giberélico. *Cienc e Agrotecnologia* 31:332–336.
- Perera PIP, Hoher V, Verdeil JL, et al (2007) Unfertilized ovary: A novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 26:21–28. doi:

- 10.1007/s00299-006-0216-4
- Perera PIP, Vidhanaarachchi VRM, Gunathilake TR, et al (2009) Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 99:73–81. doi: 10.1007/s11240-009-9577-z
- Phillips GC (2004) In vitro morphogenesis in plants - recent advances. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 40:342–345. doi: 10.1081/E-EPCS
- Pinto G, Silva S, Neves L, et al (2010) Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Trees* 24:763–769. doi: 10.1007/s00468-010-0446-5
- Portillo L, Santacruz-Ruvalcaba F, Gutiérrez-Mora A, Rodríguez-Garay B (2007) Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 43:569–575. doi: 10.1007/s11627-007-9046-5
- Puretzky AA, Geohegan DB (1998) Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid maldi-matrix plumes. *Chem Phys Lett* 286:425–432. doi: 10.1016/S0009-2614(98)00013-X
- Quiroz-Figueroa F, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos R, Loyola-Vargas V (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 86:285–301.
- Raberchault H, Ahee J, G. Guenin (1970) Colonies cellulaires et formes embryos in vitro a partir de cultures d'embryons de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) a l'aide de cultures de tissu foliaires. *Comptes Rendus l'Académie des Sci Paris Série D* 283:1735–1737.
- Raberchault H, Martin J (1976) Multiplication vegetative du palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) a l'aide de cultures de tissues foliaires. *C R Acad Sci* 283:1735–1737.
- Rabilloud T (2002) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2:3–10. doi: 10.1002/1615-9861(200201)2:1<3::AID-PROT3>3.0.CO;2-R
- Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81:93–107. doi: 10.1007/BF00022463
- Rajainadu N (1986) *Elaeis oleifera* collection in Central and South America. In: International Workshop on Oil Palm Germplasm and Utilisation. IPMKSM, Bangi, Selangor, pp 84–94
- Rajesh MK, Radha E, Karun A, Parthasarathy VA (2003) Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75:41–47. doi: 10.1023/A:1024679910085
- Ramalho-Filho A, Da Motta P, Freitas P, Teixeira W (2010) Zoneamento Agroecológico, Produção E Manejo Para a Cultura da Palma de Óleo na Amazônia. EMBRAPA, Rio de Janeiro
- Reis RS, Vale E de M, Heringer AS, et al (2016) Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *J Proteomics* 130:170–179. doi: 10.1016/j.jprot.2015.09.029
- Rezende JC, Ferreira EA, Pascoal M, et al (2008) Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. *Coffea Sci* 3:30–37.
- Rival A, Parveez G (2004) *Elaeis guineensis*, oil palm. In: Litz R (ed) *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 113–143
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, et al (2012) Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: Histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma* 249:747–758. doi: 10.1007/s00709-011-

- Rode C, Gallien S, Heintz D, et al (2011) Enolases: Storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol* 75:305–319. doi: 10.1007/s11103-010-9729-x
- Rodrigues LR, Marcelo J, Oliveira S De (2004) Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. *Rev Bras Biociências* 2:159–167.
- Rogowska-Wrzesinska A, Le Bihan MC, Thaysen-Andersen M, Roepstorff P (2013) 2D gels still have a niche in proteomics. *J Proteomics* 88:4–13. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.010
- Roowi SH, Ho CL, Alwee SSRS, et al (2010) Isolation and characterization of differentially expressed transcripts from the suspension cells of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxins. *Mol Biotechnol* 46:1–19. doi: 10.1007/s12033-010-9262-9
- Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, et al (2004) Tackling the plant proteome: Practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J* 39:715–733. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02182.x
- Sáenz L, Azpeitia a., Chuc-Armendariz B, et al (2006) Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 42:19–25. doi: 10.1079/IVP2005728
- Sallandrouze A, Faurobert M, Maataoui MEI, Espagnac H (1999) Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. *Electrophoresis* 20:1109–1119. doi: 10.1002/9783527613489.ch69
- Salvato F, Carvalho MDCG De (2010) Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciência Rural* 40:727–734.
- Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Diatta LID, et al (2012) Influence of Growth Regulators on Callogenesis and Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian Cultivars. *Sci World J* 2012:1–8. doi: 10.1100/2012/837395
- Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, et al (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Ann Bot* 98:301–308. doi: 10.1093/aob/mcl104
- Sanputawong S, Te-chato S (2008) Effect of genotypes of oil palm on callus, embryogenic callus and somatic embryo formation. *J Agric Technol* 4:147–156.
- Sanputawong S, Te-chato S (2011) Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of in vitro oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Agric Technol* 7:531–545.
- Scherwinski-Pereira JE, da Silva Guedes R, da Silva RA, et al (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 109:501–508. doi: 10.1007/s11240-012-0115-z
- Scherwinski-Pereira JE, Guedes RS, Fermino PCP, et al (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 46:378–385. doi: 10.1007/s11627-010-9279-6
- Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N (1988) Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Ann Bot* 62:43–52.
- Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, et al (2012) Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). *Proteome Sci* 10:1–15.

- Sharma SK, Millam S, Hein I, Bryan GJ (2008) Cloning and molecular characterisation of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta* 228:319–330. doi: 10.1007/s00425-008-0739-8
- Sharp WR, Sondahl MR, Caldas LS, Maraffa SB (1980) The Physiology of in Vitro Asexual Embryogenesis. In: *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 268–310
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850–858.
- Shohael AM, Chakrabarty D, Ali MB, et al (2006) Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. *Process Biochem* 41:512–518. doi: 10.1016/j.procbio.2005.09.005
- Silva AMDSE, Correa GC, Reis EM (2009) Proteomica-Uma abordagem funcional do estudo do genoma. *Saúde Ambient em Rev* 2:1–10.
- Silva R, Carmo L, Luis Z, et al (2014a) Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Proteomics* 104:1112–1127. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.013
- Silva R, Luis Z, Scherwinski-Pereira J (2012) Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 111:59–67. doi: 10.1007/s11240-012-0170-5
- Silva R, Luis Z, Scherwinski-Pereira J (2014b) The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Growth Regul* 72:67–80. doi: 10.1007/s10725-013-9837-0
- Silveira V, Balbuena TS, Santa-Catarina C, et al (2004a) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regul* 44:147–156. doi: 10.1023/B:GROW.0000049410.63154.ed
- Silveira V, Santa-catarina C, Iochevet E, Floh S (2004b) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 76:53–60.
- Sin T, Liddell S, Abdullah M, et al (2016) Differential proteomic analysis of embryogenic lines in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Proteomics* 143:334–345. doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.039
- Sizova D, Charbaut E, Delalande F, et al (2007) Proteomic analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Neurobiol Aging* 28:357–370. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.01.011
- Smertenko A, Franklin-Tong V (2011) Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death. *Cell Death Differ* 18:1263–1270.
- Soh AC, G W, CC T, et al (2011) Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones: research and development towards realization. *J Oil Palm Res* 23:935–952.
- Stamp JA (1987) Somatic Embryogenesis in Cassava: The Anatomy and Morphology of the Regeneration Process. *Ann Bot* 59:451–459.
- Staritsky G (1970) Tissue Culture of the Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) as a Tool for Its Vegetative Propagation. *Euphytica* 19:288–292. doi: 10.1007/BF01904205
- Stasolla C, Bozhkov P V, Chu T-M, et al (2004) Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiol* 24:1073–85. doi:

- 10.1093/treephys/24.10.1073
- Steinmacher DA, Clement CR, Guerra MP (2007) Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: Towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 89:15–22. doi: 10.1007/s11240-007-9207-6
- Steinmacher DA, Guerra MP, Saare-Surminski K, Lieberei R (2011) A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Ann Bot* 108:1463–1475. doi: 10.1093/aob/mcr033
- Subramaniam V, May CY, Muhammad H, et al (2010) LIFE CYCLE ASSESSMENT OF THE PRODUCTION OF CRUDE PALM KERNEL OIL ( Part 3 ). *J Oil Palm Res* 22:904–912.
- Suframa (2003) Potencialidades regionais estudos de viabilidade econômica: dendê. Manaus
- Sugimura Y, Salvaña M (1989) Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. *Can J Bot* 67:272–274.
- Sumaryono, Riyadi I, Kasi PD, Ginting G (2007) Pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dan embrio somatik kelapa sawit ( *Elaeis guineensis* Jacq . ) pada sistem perendaman sesaat [Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in a tempo. *Menara Perkebunan* 75:32–42.
- Sumathi S, Chai SP, Mohamed AR (2008) Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia. *Renew Sustain Energy Rev* 12:2404–2421. doi: 10.1016/j.rser.2007.06.006
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T (2011) Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0021800
- Suranthran P, Sinniah UR, Subramaniam S, et al (2011) Effect of plant growth regulators and activated charcoal on in vitro growth and development of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *Dura*) zygotic embryo. *African J Biotechnol* 10:10600–10606. doi: 10.5897/AJB11.964
- Surre C, Ziller R (1969) La palmera de aceite.
- Tang J, Gao M, Deng C, Zhang X (2008) Recent development of multi-dimensional chromatography strategies in proteome research. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 866:123–132. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.01.029
- Tarmizi AH, Samsul KR, Zaiton R, Rosli MY (2008) Multiplication of oil palm liquid cultures in bioreactors. *J Oil Palm Res* 44–50.
- Te-Chato S, Hilae A (2007) High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*). *J Agric Technol* 345–357.
- Teixeira JB, Söndahl MR, Kirby EG (1994) Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Rep* 13:247–250. doi: 10.1007/BF00233313
- Teixeira JB, Söndahl MR, Kirby EG (1993) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 34:227–233. doi: 10.1007/BF00029711
- Teixeira JB, Söndahl MR, Nakamura T, Kirby EG (1995) Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 40:105–111. doi: 10.1007/BF00037662
- Thawaro S, Te-chato S (2009) Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. *J Agric Technol* 5:167–177.
- Thomas E, Konar N, Street HE (1972) The fine structure of the embryogenic callus of *Ranunculus sceleratus* L. *J Cell Sci* 2:95–109.
- Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol*

- Adv 26:618–631. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003
- Thuzar M, Vanavichit A, Tragoonrung S (2012) Recloning of regenerated plantlets from elite oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cv. Tenera. *African J Biotechnol* 11:14761–14770. doi: 10.5897/AJB12.1351
- Thuzar M, Vanavichit A, Tragoonrung S, Jantasuriyarat C (2011) Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. “Tenera” through somatic embryogenesis. *Acta Physiol Plant* 33:123–128. doi: 10.1007/s11738-010-0526-6
- Tomlinson PB (2006) The uniqueness of palms. *Bot J Linn Soc* 151:5–14. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00520.x
- Tonietto Â, Sato JH, Teixeira JB, et al (2012) Proteomic Analysis of Developing Somatic Embryos of *Coffea arabica*. *Plant Mol Biol Report* 30:1393–1399. doi: 10.1007/s11105-012-0425-7
- Tregear JW, Rival A, Pintaud JC (2011) A family portrait: Unravelling the complexities of palms. *Ann Bot* 108:1387–1389. doi: 10.1093/aob/mcr269
- Urquiaga S, Alves BJR, Boodey RB (2005) Produção de biocombustíveis A questão do balanço energético. *Rev Política Agrícola* 14:42–46.
- Us-Camas R, Rivera-Solís G, Duarte-Aké F, De-la-Peña C (2014) In vitro culture: An epigenetic challenge for plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118:187–201. doi: 10.1007/s11240-014-0482-8
- Valois ACC (1997) Possibilidades da cultura do dendê na Amazônia. Brasília
- Van Winkle SC, Johnson S, Pullman GS (2003) The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Plant Cell Rep* 21:1175–1182. doi: 10.1007/s00299-003-0637-2
- Vasil V, Vasil IK (1981) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Tissue Cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* x *P. Purpureum* Hybrid. *Am J Bot* 68:864–872.
- Verdeil JL, Hocher V, Huet C, et al (2001) Ultrastructural Changes in Coconut Calli Associated with the Acquisition of Embryogenic Competence. *Ann Bot* 88:9–18. doi: 10.1006/anbo.2001.1408
- Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 13:218–221. doi: 10.1007/BF00239896
- Vicient CM, Martínez FX (1998) The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. *Review. Rev Bras Fisiol Veg* 10:1–12.
- Vidal BC (1969) Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. In: *Annales d’histochimie*. pp 289–296
- Viégas I de JM, Müller AA (2010) A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira. Embrapa
- Villela AA, Jaccoud DB, Rosa LP, Freitas M V. (2014) Status and prospects of oil palm in the Brazilian Amazon. *Biomass and Bioenergy* 67:270–278. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.05.005
- Viñas M, Jiménez VM (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Biotechnol (Colombia)* XIII:229–242.
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, et al (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:233–249. doi: 10.1023/a:1015673200621
- Wang H, Hanash S (2003) Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics. *J Chromatogr B* 787:11–18. doi: 10.1016/S1570-0232(02)00335-5
- Wang HC, Chen JT, Chang WC (2010) Morphogenetic routes of long-term

- embryogenic callus culture of *Areca catechu*. *Biol Plant* 54:1–5. doi: 10.1007/s10535-010-0001-7
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9:244–252.
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 14:61–5. doi: 10.1038/nbt0696-765
- Wilkins MR, Williams KL, Hochstrasser DF (1997) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann Bot* 57:443–462. doi: 10.1093/aob/mcg002
- Wold F, Ballou C (1957) Studies on the enzyme enolase. *J Biol Chem* 227:301–328.
- Wright P, Noirel J, Ow S, Fazeli A (2012) A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology* 77:738–765. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.012
- Xia X-J, Zhou Y-H, Ding J, et al (2011) Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus*. *New Phytol* 191:706–720.
- Xu H, Zhang W, Gao Y, et al (2012) Proteomic analysis of embryo development in rice (*Oryza sativa*). *Planta* 235:687–701. doi: 10.1007/s00425-011-1535-4
- Youssefian S, Nakamura M, Orudjev E, Kondo N (2001) Increased Cysteine Biosynthesis Capacity of Transgenic Tobacco Overexpressing an O -Acetylserine (thiol) Lyase Modifies Plant Responses to Oxidative Stress 1. *Plant Physiol* 126:1001–1011.
- Zamzuri I, Tarmizi AH, Rajinder S (2007) Improving the efficiency of oil palm tissue culture. *Oil Palm Bull* 55:26.
- Zeven AC (1964) On the origin of the oil palm ( *Elaeis guineensis* Jacq .). *Grana Palynol* 5:121–123. doi: 10.1080/00173136409429132
- Zhang D, Ren L, Chen G qun, et al (2015) ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*. *Plant Cell Rep* 34:1499–1513. doi: 10.1007/s00299-015-1802-0
- Zhang S, Han S, Yang W, et al (2010) Changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 100:21–29.
- Zhao P, Wang L, Han L, et al (2010) Proteomic identification of differentially expressed proteins in the Ligon lintless mutant of upland cotton. *Proteome Res* 9:1076–1087.
- Zhou T, Yan X, Guo K, et al (2016) ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. *Mol Cell Proteomics* 15:2108–2124. doi: 10.1074/mcp.M115.049338
- Zi J, Zhang J, Wang Q, et al (2013) Stress Responsive Proteins Are Actively Regulated during Rice (*Oryza sativa*) Embryogenesis as Indicated by Quantitative Proteomics Analysis. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0074229
- Zienkiewicz A, Jiménez-López JC, Zienkiewicz K, et al (2011) Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. *Protoplasma* 248:751–765. doi: 10.1007/s00709-010-0242-5

**Tabela Suplementar 1.** Ontologia gênica (GO) e categorização geral de proteínas identificadas aos 14 e 150 dias de indução dos genótipos de dendezeiro (*E. guineensis* Jacq. var. *tenera*). **Vários (\*)** compreendem os spots 301, 333, 334 e 335

| Proteínas envolvidas com a resposta ao estresse aos 14 dias de indução |  |                                 |   |                           |
|--|--|---------------------------------|---|---------------------------|
| Spot   | Slim_GO_Name                             | GI                              | Input_GO_Name                             | Proteína                  |
| 2  | response to endogenous stimulus          | gi 743764405 ref XP_010912406.1 | response to auxin                         | Actin-101-like            |
|  | response to abiotic stimulus             |                                 | response to light stimulus                |                           |
|  | response to stress                       |                                 | response to wounding                      |                           |
| 365  | response to endogenous stimulus          | gi 985701063 ref NP_001306835.1 | response to auxin                         | Actin-101-like Actin3like |
|  | response to abiotic stimulus             |                                 | response to light stimulus                |                           |
|  | response to stress                       |                                 | response to wounding                      |                           |
| 254  | cellular homeostasis                     | gi 985701095 ref NP_001306842.1 | cell redox homeostasis                    | Catalase isozyme 2        |
|  | response to endogenous stimulus          |                                 | response to auxin                         |                           |
|  | response to endogenous stimulus          |                                 | response to abscisic acid                 |                           |
|  | response to abiotic stimulus             |                                 | cold acclimation                          |                           |
|  | response to abiotic stimulus             |                                 | photoperiodism                            |                           |
|  | response to abiotic stimulus             |                                 | response to light stimulus                |                           |
|  | response to abiotic stimulus             |                                 | response to cold                          |                           |
|  | cell death                               |                                 | cell death                                |                           |
|  | response to stress                       |                                 | response to oxidative stress              |                           |
|  | response to stress                       |                                 | response to reactive oxygen species       |                           |
|  | response to stress                       |                                 | cellular response to sulfate starvation   |                           |
|  | response to stress                       |                                 | cold acclimation                          |                           |
|  | response to stress                       |                                 | cellular response to phosphate starvation |                           |
| response to stress   | response to cold                         |                                 |   |                           |
| response to stress   | response to hydrogen peroxide            |                                 |   |                           |
| response to stress   | cellular response to nitrogen starvation |                                 |   |                           |



|  |                                 |                                 |   |  |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---|--|
|  | response to abiotic stimulus    |                                 | response to heat  |  |
| 404  | response to stress              | gi 743765988 ref XP_010913223.1 | response to heat<br>defense response to bacterium, incompatible interaction | Heat shock protein 811like   |
| 376  | response to endogenous stimulus | gi 719982757 ref XP_010250552.1 | response to cytokinin   | ATPdependent Clp protease ATPbinding subunit clpA homolog CD4B, chloroplasticlike isoform X1 |
|  | response to abiotic stimulus    |                                 | response to heat  |  |
|  | response to abiotic stimulus    |                                 | response to salt stress   |  |
|  | response to abiotic stimulus    |                                 | response to anoxia  |  |
|  | response to stress              |                                 | response to heat  |  |
| 176  | response to stress              | gi 743893211 ref XP_010911739.1 | response to oxidative stress  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic-like                                   |
|  | response to stress              |                                 | response to salt stress   |  |
|  | response to stress              |                                 | response to anoxia  |  |
|  | response to stress              |                                 | defense response to bacterium   |  |
|  | response to stress              |                                 | response to hydrogen peroxide   |  |
| 454  | response to stress              | gi 720083283 ref XP_010242847.1 | defense response to fungus  | Endochitinase A-like   |
| 361/413  | response to abiotic stimulus    | gi 743789069 ref XP_010922826.1 | response to cold  | 2,3bisphosphoglycerateindependent phosphoglycerate mutase                                    |
|  | response to stress              |                                 | response to cold  |  |
| 172/409  | response to endogenous stimulus | gi 743806915 ref XP_010927880.1 | response to cytokinin   | Uncharacterized protein LOC105049817   |
|  | response to abiotic stimulus    |                                 | response to salt stress   |  |
|  | response to abiotic stimulus    |                                 | response to cold  |  |
| 423  | response to stress              | gi 743770628 ref XP_010915605.1 | response to salt stress   | Malate dehydrogenase, mitochondrial-like   |
|  | response to stress              |                                 | defense response to bacterium   |  |
|  | response to stress              |                                 | response to cold  |  |
| <b>Proteínas envolvidas com a resposta ao estresse aos 150 dias de indução</b> |                                 |                                 |   |  |
|  | response to endogenous stimulus |                                 | response to ethylene  |  |
|  | response to endogenous stimulus |                                 | response to cytokinin   |  |
|  | response to abiotic stimulus    |                                 | response to heat  |  |

|     |                                 |                           |                                     |   |
|-----|---------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
|     | response to abiotic stimulus    |                           | response to salt stress             |   |
| 46  | response to stress              | gi 374256065 gb AEZ00894  | response to heat                    | Putative cytosolic ascorbate peroxidase protein |
|     | response to stress              | .1                        | response to reactive oxygen species |   |
|     | response to stress              |                           | response to hydrogen peroxide       |   |
|     | response to stress              |                           | response to oxidative stress        |   |
|     | response to stress              |                           | response to salt stress             |   |
| 95  | response to endogenous stimulus | gi 743774724 ref XP_01091 | response to cytokinin               | Cysteine synthase                               |
|     | response to endogenous stimulus | 7723.1                    | response to abscisic acid           |   |
|     | response to abiotic stimulus    |                           | response to light stimulus          |   |
|     | response to abiotic stimulus    |                           | response to salt stress             |   |
|     | response to abiotic stimulus    |                           | response to cold                    |   |
|     | response to stress              |                           | response to salt stress             |   |
|     | response to stress              |                           | skeletal muscle tissue regeneration |   |
| 161 | response to stress              | gi 743877540 ref XP_01090 | response to cold                    | Enolase-like                                    |
|     | response to endogenous stimulus | 7928.1                    | response to abscisic acid           |   |
|     | response to abiotic stimulus    |                           | response to light stimulus          |   |
|     | response to abiotic stimulus    |                           | response to salt stress             |   |
|     | response to abiotic stimulus    |                           | response to cold                    |   |
|     | response to stress              |                           | response to salt stress             |   |
|     | response to stress              |                           | skeletal muscle tissue regeneration |   |
|     | response to stress              |                           | response to cold                    |   |
|     | cellular homeostasis            |                           | cell redox homeostasis              |   |
|     | response to endogenous stimulus |                           | response to auxin                   |   |
|     | response to endogenous stimulus |                           | response to abscisic acid           |   |
|     | response to abiotic stimulus    |                           | cold acclimation                    |   |
|     | response to abiotic stimulus    |                           | photoperiodism                      |   |

|            |                                 |                                 |   |   |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|---|---|
|            | response to abiotic stimulus    |                                 | response to light stimulus                |   |
| Vários (*) | response to abiotic stimulus    | gi 985701095 ref NP_001306842.1 | response to cold                          |   |
|            | cell death                      |                                 | cell death                                | catalase isozyme 2  |
|            | response to stress              |                                 | response to reactive oxygen species       |   |
|            | response to stress              |                                 | cellular response to sulfate starvation   |   |
|            | response to stress              |                                 | cold acclimation                          |   |
|            | response to stress              |                                 | cellular response to phosphate starvation |   |
|            | response to stress              |                                 | response to hydrogen peroxide             |   |
|            | response to stress              |                                 | response to oxidative stress              |   |
|            | response to stress              |                                 | response to cold                          |   |
|            | response to stress              |                                 | cellular response to nitrogen starvation  |   |
| 294        | response to abiotic stimulus    | gi 743794420 ref XP_010924166.1 | photoinhibition                           | Oxygenevolving enhancer protein 1, chloroplastic                              |
|            | response to stress              |                                 | defense response to bacterium             |   |
| 295        | response to abiotic stimulus    | gi 672128345 ref XP_008787656.1 | photoinhibition                           | Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like                        |
|            | response to stress              |                                 | defense response to bacterium             |   |
| 205        | response to endogenous stimulus | gi 743858564 ref XP_010942381.1 | response to cytokinin                     | ATPdependent Clp protease ATPbinding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic |
|            | response to abiotic stimulus    |                                 | cellular response to cold                 |   |
|            | response to abiotic stimulus    |                                 | response to heat                          |   |
|            | response to abiotic stimulus    |                                 | heat acclimation                          |   |
|            | response to abiotic stimulus    |                                 | response to high light intensity          |   |
|            | response to abiotic stimulus    |                                 | cellular response to heat                 |   |
| 189        | response to stress              | gi 743827946 ref XP_010933724.1 | cellular response to cold                 | Hsp70Hsp90 organizing protein   |
|            | response to stress              |                                 | response to wounding                      |   |
|            | response to stress              |                                 | response to heat                          |   |
|            | response to stress              |                                 | response to unfolded protein              |   |

|         |                                 |                           |   |   |
|---------|---------------------------------|---------------------------|---|---|
|         | response to stress              |                           | heat acclimation  |   |
|         | response to stress              |                           | response to hydrogen peroxide                           |   |
|         | response to stress              |                           | cellular response to heat                               |   |
| 201     | response to abiotic stimulus    | gi 743807690 ref XP_01092 | response to heat  |   |
|         | response to stress              | 8158.1                    | response to heat  | Heat shock protein 811like  |
|         | response to stress              |                           | defense response to bacterium, incompatible interaction |   |
| 338     | response to endogenous stimulus | gi 743766355 ref XP_01091 | response to cytokinin                                   | pyrophosphatefructose 6phosphate 1phosphotransferase subunit betalike |
| 1       | response to abiotic stimulus    | gi 743789069 ref XP_01092 | response to cold  | 2,3bisphosphoglycerateindependent phosphoglycerate mutase             |
|         | response to stress              | 2826.1                    | response to cold  |   |
|         | response to abiotic stimulus    |                           | response to heat  |   |
|         | response to abiotic stimulus    |                           | response to anoxia                                      |   |
|         | response to abiotic stimulus    |                           | response to salt stress                                 |   |
| 214/227 | response to stress              | gi 743877054 ref XP_01090 | response to heat  | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like isoform X1   |
|         | response to stress              | 7760.1                    | response to anoxia                                      |   |
|         | response to stress              |                           | response to hydrogen peroxide                           |   |
|         | response to stress              |                           | response to oxidative stress                            |   |
|         | response to stress              |                           | response to salt stress                                 |   |
|         | response to stress              |                           | defense response to bacterium                           |   |
| 325     | cell death                      | gi 743767417 ref XP_01091 | cell death  | Fumarylacetoacetase   |
|         | response to endogenous stimulus | 3971.1                    | response to abscisic acid                               |   |
|         | response to abiotic stimulus    |                           | response to water deprivation                           |   |
|         | response to abiotic stimulus    |                           | response to salt stress                                 |   |
| 329     | response to abiotic stimulus    | gi 743826793 ref XP_01093 | response to cold  | 6phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1like                |
|         | response to stress              | 3404.1                    | response to water deprivation                           |   |
|         | response to stress              |                           | response to salt stress                                 |   |
|         | response to stress              |                           | response to cold  |   |

|     |                                 |                                     |                         |  |
|-----|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|--|
|     | response to endogenous stimulus |                                     | response to cytokinin   |  |
|     | response to abiotic stimulus    |                                     | response to heat        |  |
| 222 | response to abiotic stimulus    | gi 743828155 ref XP_01093<br>3781.1 | response to salt stress | Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial                                 |
|     | response to stress              |                                     | response to heat        |  |
|     | response to stress              |                                     | response to salt stress |  |
| 247 | response to endogenous stimulus | gi 743776090 ref XP_01091<br>8444.1 | response to ethylene    | Protochlorophyllide reductaselike  |
| 314 | response to endogenous stimulus | gi 743806915 ref XP_01092<br>7880.1 | response to cytokinin   | Uncharacterized protein LOC105049817                                     |
|     | response to abiotic stimulus    |                                     | response to heat        |  |
| 197 | response to abiotic stimulus    | gi 743814517 ref XP_01093<br>0060.1 | response to cold        | Stromal 70 kDa heat shockrelated protein, chloroplastic                  |
|     | response to stress              |                                     | response to heat        |  |
|     | response to stress              |                                     | response to cold        |  |
| 196 | response to abiotic stimulus    | gi 743774958 ref XP_01091<br>7850.1 | response to salt stress | 5methyltetrahydropteroyltriglutamatehomocysteine methyltransferase 1like |
|     | response to stress              |                                     | response to salt stress |  |
| 150 | response to abiotic stimulus    | gi 743854818 ref XP_01094<br>1082.1 | response to cold        | Monodehydroascorbate reductase, chloroplastic isoform X2                 |
|     | response to stress              |                                     | response to cold        |  |

**Processamento de proteínas aos 14 dias de indução**

| Spot | Slim_GO_Name     | GI                                  | Input_GO_Name        | Proteína                  |
|------|------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------------|
|      | growth           |                                     | root hair elongation |                           |
|      | growth           |                                     | developmental growth |                           |
| 2    | cell growth      | gi 743764405 ref XP_01091<br>2406.1 | root hair elongation | Actin-101-like            |
|      | cell growth      |                                     | root hair elongation |                           |
|      | cellular process |                                     | root hair elongation |                           |
|      | cellular process |                                     | cell division        |                           |
|      | growth           |                                     | root hair elongation |                           |
| 365  | growth           | gi 985701063 ref NP_00130<br>6835.1 | developmental growth | Actin-101-like Actin3like |

|         |                                 |                                 |  |  |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|--|--|
|         | cellular process                |                                 | root hair elongation                           |  |
|         | cellular process                |                                 | cell division                                  |  |
|         | cellular component organization |                                 | protein homotetramerization                    |  |
|         | cellular process                |                                 | cellular response to sulfate starvation        |  |
|         | cellular process                |                                 | cell redox homeostasis                         |  |
|         | cellular process                |                                 | protein homotetramerization                    |  |
| 254     | cellular process                | gi 985701095 ref NP_001306842.1 | hydrogen peroxide catabolic process            | Catalase isozyme 2   |
|         | cellular process                |                                 | cellular response to phosphate starvation      |  |
|         | cellular process                |                                 | cellular response to nitrogen starvation       |  |
|         | cell communication              |                                 | cellular response to sulfate starvation        |  |
|         | cell communication              |                                 | cellular response to phosphate starvation      |  |
|         | cell communication              |                                 | cellular response to nitrogen starvation       |  |
|         | cellular component organization |                                 | chaperone-mediated protein complex assembly    |  |
| 404     | cellular process                | gi 743765988 ref XP_010913223.1 | chaperone-mediated protein folding             | Heat shock protein 81 like   |
|         | cellular process                |                                 | cellular response to calcium ion               |  |
|         | cellular process                |                                 | chaperone-mediated protein complex assembly    |  |
|         | cellular component organization |                                 | protein hexamerization                         |  |
|         | cellular component organization |                                 | chloroplast organization                       |  |
|         | cellular process                |                                 | protein hexamerization                         |  |
| 376     | cellular process                | gi 719982757 ref XP_010250552.1 | chloroplast organization                       | ATPdependent Clp protease ATPbinding subunit clpA homolog CD4B, chloroplasticlike isoform X1 |
|         | cellular process                |                                 | regulation of chlorophyll biosynthetic process |  |
|         | transport                       |                                 | protein import into chloroplast stroma         |  |
|         | transport                       |                                 | protein targeting to chloroplast               |  |
| 176     | cellular process                | gi 743893211 ref XP_010911739.1 | glycolytic process                             | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic-like                                   |
| 454     | cellular process                | gi 720083283 ref XP_010242847.1 | cell wall macromolecule catabolic process      | Endochitinase A-like   |
| 361/413 | cellular process                | gi 743789069 ref XP_010922826.1 | stomatal movement                              | 2,3bisphosphoglycerateindependent phosphoglycerate mutase                                    |

|   |                                 |                                 |  |   |
|---|---------------------------------|---------------------------------|--|---|
| 273   | cellular process                | gi 743816536 ref XP_010930670.1 | protein folding in endoplasmic reticulum | Protein disulfide-isomerase-like                |
| 455   | transport                       | gi 727520270 ref XP_010436415.1 | protein targeting to vacuole             | Cation/H(+) antiporter 17-like                  |
| <b>Processamento de proteínas aos 150 dias de indução</b> |                                 |                                 |  |   |
| 46  | growth                          | gi 374256065 gb AEZ00894.1      | seed trichome elongation                 | Putative cytosolic ascorbate peroxidase protein |
|   | cell differentiation            |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cell growth                     |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cellular component organization |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cellular process                |                                 | hydrogen peroxide catabolic process      |   |
|   | cellular process                |                                 | seed trichome elongation                 |   |
| 308   | growth                          | gi 743849454 ref XP_010939631.1 | seed trichome elongation                 | Annexin D1like                                  |
|   | cell differentiation            |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cell growth                     |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cellular component organization |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cellular process                |                                 | seed trichome elongation                 |   |
| 336   | growth                          | gi 353441128 gb AEQ94148.1      | seed trichome elongation                 | elongation factor 1, partial                    |
|   | cell differentiation            |                                 | seed trichome initiation                 |   |
|   | cell differentiation            |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cell growth                     |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cellular component organization |                                 | seed trichome elongation                 |   |
|   | cellular process                |                                 | seed trichome initiation                 |   |
| 95  | growth                          | gi 743774724 ref XP_010917723.1 | pollen tube growth                       | Cysteine synthase                               |
|   | cell differentiation            |                                 | pollen tube growth                       |   |
|   | cell growth                     |                                 | pollen tube growth                       |   |
|   | cellular component organization |                                 | pollen tube growth                       |   |
|   |                                 |                                 | pollen tube growth                       |   |

|     |                                 |                                 |   |  |
|-----|---------------------------------|---------------------------------|---|--|
|     | cellular process                |                                 | cysteine biosynthetic process                       |  |
|     | cellular process                |                                 | pollen tube growth                                  |  |
|     | growth                          |                                 | negative regulation of cell growth                  |  |
|     | growth                          |                                 | skeletal muscle tissue regeneration                 |  |
|     | cell growth                     |                                 | negative regulation of cell growth                  |  |
|     | cellular component organization |                                 | negative regulation of cell growth                  |  |
| 161 | cellular process                | gi 743877540 ref XP_010907928.1 | negative regulation of transcription, DNA-templated | Enolaselike  |
|     | cellular process                |                                 | negative regulation of cell growth                  |  |
|     | cellular process                |                                 | response to virus                                   |  |
|     | growth                          |                                 | negative regulation of cell growth                  |  |
|     | growth                          |                                 | skeletal muscle tissue regeneration                 |  |
| 83  | cell differentiation            | gi 923640607 ref XP_013641102.1 | trichome branching                                  | Protein SUPPRESSOR OF K(+) TRANSPORT GROWTH DEFECT 1like |
| 161 | cell growth                     | gi 743877540 ref XP_010907928.1 | negative regulation of cell growth                  | Enolaselike  |
|     | cellular component organization |                                 | negative regulation of cell growth                  |  |
| 83  | cellular component organization | gi 923640607 ref XP_013641102.1 | trichome branching                                  | Protein SUPPRESSOR OF K(+) TRANSPORT GROWTH DEFECT 1like |
|     | cellular component organization |                                 | vacuole organization                                |  |
|     | cellular component organization |                                 | endosome organization                               |  |
| 161 | cellular process                | gi 743877540 ref XP_010907928.1 | negative regulation of transcription, DNA-templated | Enolaselike  |
|     | cellular process                |                                 | negative regulation of cell growth                  |  |
|     | cellular process                |                                 | response to virus                                   |  |
| 83  | cellular process                | gi 923640607 ref XP_013641102.1 | trichome branching                                  | Protein SUPPRESSOR OF K(+) TRANSPORT GROWTH DEFECT 1like |
|     | cellular process                |                                 | vacuole organization                                |  |
|     | cellular process                |                                 | endosome organization                               |  |
|     | transport                       |                                 | vesicle-mediated transport                          |  |



|            |                                       |                                 |   |  |
|------------|---------------------------------------|---------------------------------|---|--|
|            | cellular component organization       |                                 | protein homotetramerization               |  |
|            | cellular process                      |                                 | cellular response to sulfate starvation   |  |
|            | cellular process                      |                                 | cell redox homeostasis                    |  |
| Vários (*) | cellular process                      | gi 985701095 ref NP_001306842.1 | hydrogen peroxide catabolic process       |  |
|            | cellular process                      |                                 | cellular response to phosphate starvation | catalase isozyme 2                                     |
|            | cellular process                      |                                 | protein homotetramerization               |  |
|            | cellular process                      |                                 | cellular response to nitrogen starvation  |  |
|            | cell communication                    |                                 | cellular response to sulfate starvation   |  |
|            | cell communication                    |                                 | cellular response to phosphate starvation |  |
|            | cell communication                    |                                 | cellular response to nitrogen starvation  |  |
|            | cellular component organization       |                                 | photosystem II assembly                   |  |
|            | cellular process                      |                                 | photoinhibition                           |  |
| 294        | cellular process                      | gi 743794420 ref XP_010924166.1 | regulation of protein dephosphorylation   | Oxygenevolving enhancer protein 1, chloroplastic       |
|            | cellular process                      |                                 | photosystem II assembly                   |  |
|            | cellular process                      |                                 | photosystem II stabilization              |  |
|            | cellular protein modification process |                                 | regulation of protein dephosphorylation   |  |
|            | cellular component organization       |                                 | photosystem II assembly                   |  |
|            | cellular process                      |                                 | photoinhibition                           |  |
| 295        | cellular process                      | gi 672128345 ref XP_008787656.1 | regulation of protein dephosphorylation   | Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like |
|            | cellular process                      |                                 | photosystem II assembly                   |  |
|            | cellular process                      |                                 | photosystem II stabilization              |  |
|            | cellular protein modification process |                                 | regulation of protein dephosphorylation   |  |
|            | cellular component organization       |                                 | protein homooligomerization               |  |
|            | cellular component organization       |                                 | protein homotetramerization               |  |
| 179        | cellular process                      | gi 743756149 ref XP_010915364.1 | protein homooligomerization               | NADPdependent malic enzyme isoform X2                  |
|            | cellular process                      |                                 | protein homotetramerization               |  |
|            | cellular process                      |                                 | malate metabolic process                  |  |

|         |                                 |                                 |  |   |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|--|---|
|         | cellular component organization |                                 | protein hexamerization                                     |   |
|         | cellular component organization |                                 | chloroplast organization                                   |   |
|         | cellular process                |                                 | protein hexamerization                                     |   |
| 205     | cellular process                | gi 743858564 ref XP_010942381.1 | chloroplast organization                                   | ATPdependent Clp protease ATPbinding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic |
|         | cellular process                |                                 | regulation of chlorophyll biosynthetic process             |   |
|         | transport                       |                                 | protein targeting to chloroplast                           |   |
|         | transport                       |                                 | protein import into chloroplast stroma                     |   |
| 174     | cellular component organization | gi 743776540 ref XP_010918680.1 | chloroplast organization                                   | RuBisCO large subunitbinding protein subunit alpha isoform X2                 |
|         | cellular process                | gi 743776540 ref XP_010918680.1 | chloroplast organization                                   | RuBisCO large subunitbinding protein subunit alpha isoform X2                 |
| 189     | cellular component organization | gi 743827946 ref XP_010933724.1 | chaperone-mediated protein complex assembly                |   |
|         | cellular process                |                                 | cellular response to cold                                  | Hsp70Hsp90 organizing protein   |
|         | cellular process                |                                 | cellular response to heat                                  |   |
|         | cellular process                |                                 | chaperone-mediated protein complex assembly                |   |
| 201     | cellular component organization | gi 743807690 ref XP_010928158.1 | chaperone-mediated protein complex assembly                |   |
|         | cellular process                |                                 | chaperone-mediated protein folding                         | Heat shock protein 811like  |
|         | cellular process                |                                 | cellular response to calcium ion                           |   |
|         | cellular process                |                                 | chaperone-mediated protein complex assembly                |   |
| 1       | cellular process                | gi 743789069 ref XP_010922826.1 | stomatal movement  | 2,3bisphosphoglycerateindependent phosphoglycerate mutase                     |
| 214/227 | cellular process                | gi 743877054 ref XP_010907760.1 | glycolytic process   | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like isoform X1           |
| 302     | cellular process                | gi 374255993 gb AEZ00858.1      | electron transport chain                                   | putative ferredoxin NADP+ reductase protein, partial                          |
| 325     | cellular process                | gi 743767417 ref XP_010913971.1 | homogentisate catabolic process                            | Fumarylacetoacetase   |
|         | cellular process                |                                 | tyrosine catabolic process                                 |   |
| 329     | cellular process                | gi 743826793 ref XP_010933404.1 | pentose-phosphate shunt, oxidative branch                  | 6phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating I like                       |
|         | cellular process                |                                 | male-female gamete recognition during double fertilization |   |
| 222     | cellular process                | gi 743828155 ref XP_010933781.1 | response to virus  | Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial                                      |

|     |           |                                 |                                  |   |
|-----|-----------|---------------------------------|----------------------------------|---|
| 197 | transport | gi 743814517 ref XP_010930060.1 | protein targeting to chloroplast | Stromal 70 kDa heat shockrelated protein, chloroplastic |
| 289 | transport | gi 743755082 ref XP_010932447.1 | anion transport                  | Mitochondrial outer membrane protein porin Ilike        |

**Proteínas envolvidas com o metabolismo energético aos 14 dias de indução**

| <b>Spot</b> | <b>Slim_GO_Name</b>   | <b>GI</b>                       | <b>Input_GO_Name</b>   | <b>Proteína</b>  |
|-------------|---|---------------------------------|--|--|
| 254         | catabolic process<br>metabolic process  | gi 985701095 ref NP_001306842.1 | hydrogen peroxide catabolic process<br>hydrogen peroxide catabolic process   | Catalase isozyme 2   |
| 346         | biosynthetic process<br>biosynthetic process<br>metabolic process   | gi 719982757 ref XP_010250552.1 | regulation of chlorophyll biosynthetic process<br>regulation of chlorophyll biosynthetic process<br>regulation of chlorophyll biosynthetic process | ATPdependent Clp protease ATPbinding subunit clpA homolog CD4B, chloroplasticlike isoform X1 |
| 176         | catabolic process<br>metabolic process<br>nucleobase-containing compound<br>metabolic process<br>generation of precursor metabolites and energy<br>carbohydrate metabolic process | gi 743893211 ref XP_010911739.1 | glycolytic process<br>glycolytic process<br>glycolytic process<br>glycolytic process<br>glycolytic process   | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic-like                                   |
| 454         | catabolic process<br>metabolic process  | gi 720083283 ref XP_010242847.1 | cell wall macromolecule catabolic process<br>cell wall macromolecule catabolic process   | Endochitinase A-like   |

**Proteínas envolvidas com o metabolismo energético aos 150 dias de indução**

|     |  |                                 |   |   |
|-----|--|---------------------------------|---|---|
| 46  | catabolic process<br>metabolic process<br>metabolic process                                      | gi 374256065 gb AEZ00894.1      | hydrogen peroxide catabolic process<br>hydrogen peroxide catabolic process<br>oxidation-reduction process   | Putative cytosolic ascorbate peroxidase protein |
| 95  | biosynthetic process<br>metabolic process  | gi 743774724 ref XP_010917723.1 | cysteine biosynthetic process<br>cysteine biosynthetic process  | Cysteine synthase                               |
| 161 | biosynthetic process<br>metabolic process<br>nucleobase-containing compound<br>metabolic process | gi 743877540 ref XP_010907928.1 | negative regulation of transcription, DNA-templated<br>negative regulation of transcription, DNA-templated<br>negative regulation of transcription, DNA-templated | Enolaselike                                     |

|            |  |                                 |   |  |
|------------|--|---------------------------------|---|--|
|            | biosynthetic process                           |                                 | negative regulation of transcription, DNA-templated |  |
|            | metabolic process                              |                                 | negative regulation of transcription, DNA-templated |  |
|            | nucleobase-containing compound                 |                                 | negative regulation of transcription, DNA-templated |  |
|            | metabolic process                              |                                 | negative regulation of transcription, DNA-templated |  |
| Vários (*) | catabolic process                              | gi 985701095 ref NP_001306842.1 | hydrogen peroxide catabolic process                 | catalase isozyme 2                                     |
|            | metabolic process                              |                                 | hydrogen peroxide catabolic process                 |  |
|            | protein metabolic process                      |                                 | regulation of protein dephosphorylation             |  |
|            | photosynthesis                                 |                                 | photoinhibition                                     |  |
|            | photosynthesis                                 |                                 | photosynthesis, light reaction                      |  |
|            | photosynthesis                                 |                                 | photosystem II assembly                             |  |
|            | photosynthesis                                 |                                 | photosystem II stabilization                        |  |
| 294        | metabolic process                              | gi 743794420 ref XP_010924166.1 | photoinhibition                                     | Oxygenevolving enhancer protein 1, chloroplastic       |
|            | metabolic process                              |                                 | regulation of protein dephosphorylation             |  |
|            | metabolic process                              |                                 | photosystem II stabilization                        |  |
|            | generation of precursor metabolites and energy |                                 | photoinhibition                                     |  |
|            | generation of precursor metabolites and energy |                                 | photosynthesis, light reaction                      |  |
|            | generation of precursor metabolites and energy |                                 | photosystem II assembly                             |  |
|            | generation of precursor metabolites and energy |                                 | photosystem II stabilization                        |  |
|            | protein metabolic process                      |                                 | regulation of protein dephosphorylation             |  |
|            | photosynthesis                                 |                                 | photoinhibition                                     |  |
|            | photosynthesis                                 |                                 | photosynthesis, light reaction                      |  |
|            | photosynthesis                                 |                                 | photosystem II assembly                             |  |
|            | photosynthesis                                 |                                 | photosystem II stabilization                        |  |
| 295        | metabolic process                              | gi 672128345 ref XP_008787656.1 | photoinhibition                                     | Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like |
|            | metabolic process                              |                                 | regulation of protein dephosphorylation             |  |
|            | metabolic process                              |                                 | photosystem II stabilization                        |  |

|     |  |                                 |  |   |
|-----|--|---------------------------------|--|---|
|     | generation of precursor metabolites and energy |                                 | photoinhibition                                |   |
|     | generation of precursor metabolites and energy |                                 | photosynthesis, light reaction                 |   |
|     | generation of precursor metabolites and energy |                                 | photosystem II assembly                        |   |
|     | generation of precursor metabolites and energy |                                 | photosystem II stabilization                   |   |
| 179 | metabolic process                              | gi 743756149 ref XP_010915364.1 | malate metabolic process                       | NADPdependent malic enzyme isoform X2   |
| 205 | biosynthetic process                           | gi 743858564 ref XP_010942381.1 | regulation of chlorophyll biosynthetic process | ATPdependent Clp protease ATPbinding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic |
|     | metabolic process                              |                                 | regulation of chlorophyll biosynthetic process |   |
| 338 | photosynthesis                                 | gi 743766355 ref XP_010913416.1 | photosynthesis                                 | pyrophosphatefructose 6phosphate 1phosphotransferase subunit betalike         |
|     | catabolic process                              |                                 | glycolytic process                             |   |
| 214 | metabolic process                              | gi 743877054 ref XP_010907760.1 | glycolytic process                             | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like isoform X1           |
|     | nucleobase-containing compound                 |                                 | glycolytic process                             |   |
|     | metabolic process                              |                                 | glycolytic process                             |   |
|     | generation of precursor metabolites and energy |                                 | glycolytic process                             |   |
|     | carbohydrate metabolic process                 |                                 | glycolytic process                             |   |
| 302 | metabolic process                              | gi 374255993 gb AEZ00858.1      | electron transport chain                       | putative ferredoxin NADP+ reductase protein, partial                          |
|     | generation of precursor metabolites and energy |                                 | electron transport chain                       |   |
|     | catabolic process                              |                                 | homogentisate catabolic process                |   |
| 325 | catabolic process                              | gi 743767417 ref XP_010913971.1 | tyrosine catabolic process                     | Fumarylacetoacetase   |
|     | metabolic process                              |                                 | homogentisate catabolic process                |   |
|     | metabolic process                              |                                 | tyrosine catabolic process                     |   |
|     | metabolic process                              |                                 | pentose-phosphate shunt, oxidative branch      |   |
| 329 | metabolic process                              | gi 743826793 ref XP_010933404.1 | oxidation-reduction process                    | 6phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1like                        |
|     | nucleobase-containing compound                 |                                 | pentose-phosphate shunt, oxidative branch      |   |
|     | metabolic process                              |                                 | pentose-phosphate shunt, oxidative branch      |   |
| 341 | carbohydrate metabolic process                 | gi 743800771 ref XP_010926112.1 | carbohydrate metabolic process                 | phosphoglucomutase, cytoplasmic 2   |

**Proteínas envolvidas com o desenvolvimento aos 14 dias de indução**

| Spot  | Slim_GO_Name                       | GI                              | Input_GO_Name                              | Proteína   |
|---|------------------------------------|---------------------------------|--|--|
| 2   | post-embryonic development         | gi 743764405 ref XP_010912406.1 | seed germination                           | Actin-101-like   |
| 365   | post-embryonic development         | gi 985701063 ref NP_001306835.1 | seed germination                           | Actin-101-like Actin3like                                  |
| 254   | post-embryonic development         | gi 985701095 ref NP_001306842.1 | seed germination                           | Catalase isozyme 2   |
| 176   | post-embryonic development         | gi 743893211 ref XP_01091739.1  | seed development                           | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic-like |
|   | reproduction                       |                                 | fruit development                          |  |
| 273   | reproduction                       | gi 743816536 ref XP_010930670.1 | seed development                           | Protein disulfide-isomerase-like                           |
|   | post-embryonic development         |                                 | endosperm development                      |  |
|   |                                    |                                 | endosperm development                      |  |
| <b>Proteínas envolvidas com o desenvolvimento aos 150 dias de indução</b> |                                    |                                 |  |  |
| 46  | post-embryonic development         | gi 374256065 gb AEZ00894.1      | embryo development ending in seed dormancy | Putative cytosolic ascorbate peroxidase protein            |
|   | post-embryonic development         |                                 | seed trichome elongation                   |  |
|   | embryo development                 |                                 | embryo development ending in seed dormancy |  |
|   | anatomical structure morphogenesis |                                 | seed trichome elongation                   |  |
|   | multicellular organism development |                                 | embryo development ending in seed dormancy |  |
|   | multicellular organism development |                                 | seed trichome elongation                   |  |
|   | reproduction                       |                                 | embryo development ending in seed dormancy |  |
| reproduction  | seed trichome elongation           |                                 |  |  |
| 308   | post-embryonic development         | gi 743849454 ref XP_010939631.1 | seed trichome elongation                   | Annexin D1like   |
|   | anatomical structure morphogenesis |                                 | seed trichome elongation                   |  |
|   | multicellular organism development |                                 | seed trichome elongation                   |  |
|   | reproduction                       |                                 | seed trichome elongation                   |  |
| 336   | post-embryonic development         | gi 353441128 gb AEQ94148.1      | seed trichome initiation                   | elongation factor 1, partial                               |
|   | post-embryonic development         |                                 | seed trichome elongation                   |  |
|   | anatomical structure morphogenesis |                                 | seed trichome elongation                   |  |
|   | multicellular organism development |                                 | seed trichome initiation                   |  |

|            |                                    |                                 |  |   |
|------------|------------------------------------|---------------------------------|--|---|
|            | multicellular organism development |                                 | seed trichome elongation                                   |   |
|            | reproduction                       |                                 | seed trichome initiation                                   |   |
|            | reproduction                       |                                 | seed trichome elongation                                   |   |
|            | pollination                        |                                 | pollen tube development                                    |   |
|            | pollination                        |                                 | pollen tube growth   |   |
| 95         | anatomical structure morphogenesis | gi 743774724 ref XP_010917723.1 | pollen tube growth   | Cysteine synthase   |
|            | reproduction                       |                                 | pollen tube development                                    |   |
|            | reproduction                       |                                 | double fertilization forming a zygote and endosperm        |   |
|            | reproduction                       |                                 | pollen tube growth   |   |
| 83         | anatomical structure morphogenesis | gi 923640607 ref XP_013641102.1 | trichome branching   | Protein SUPPRESSOR OF K(+) TRANSPORT GROWTH DEFECT 1like              |
| Vários (*) | post-embryonic development         | gi 985701095 ref NP_001306842.1 | seed germination   | catalase isozyme 2  |
|            | post-embryonic development         |                                 | embryo development ending in seed dormancy                 |   |
| 174        | embryo development                 | gi 743776540 ref XP_010918680.1 | embryo development ending in seed dormancy                 | RuBisCO large subunitbinding protein subunit alpha isoform X2         |
|            | multicellular organism development |                                 | embryo development ending in seed dormancy                 |   |
|            | reproduction                       |                                 | embryo development ending in seed dormancy                 |   |
|            | post-embryonic development         |                                 | embryo development ending in seed dormancy                 |   |
| 338        | embryo development                 | gi 743766355 ref XP_010913416.1 | embryo development ending in seed dormancy                 | pyrophosphatefructose 6phosphate 1phosphotransferase subunit betalike |
|            | multicellular organism development |                                 | embryo development ending in seed dormancy                 |   |
|            | reproduction                       |                                 | embryo development ending in seed dormancy                 |   |
| 1          | multicellular organism development | gi 743789069 ref XP_010922826.1 | pollen development   | 2,3bisphosphoglycerateindependent phosphoglycerate mutase             |
|            | post-embryonic development         |                                 | seed development   |   |
|            | multicellular organism development |                                 | fruit development  |   |
| 214/227    | multicellular organism development | gi 743877054 ref XP_010907760.1 | seed development   | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like isoform X1   |
|            | reproduction                       |                                 | fruit development  |   |
|            | reproduction                       |                                 | seed development   |   |
| 329        | reproduction                       | gi 743826793 ref XP_010933404.1 | male-female gamete recognition during double fertilization | 6phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1like                |

