



# ANÁLISE HISTOQUÍMICA DE AMIDO E PROTEÍNAS EM EMBRIÕES SOMÁTICOS NORMAIS E HIPERHÍDRICOS DE PALMA DE ÓLEO

## HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF STARCH AND PROTEINS IN NORMAL AND HYPERHYDRIC EMBRYOS OF OIL PALM

Thauan Martins Lelis<sup>1</sup>; Inaê Maria Silva-Cardoso<sup>2</sup>; André Luis Xavier de Souza<sup>2</sup>; Jonny Everson Scherwinski-Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brasil. [thauanlelis98@gmail.com](mailto:thauanlelis98@gmail.com). Apresentador do trabalho.; <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF Parque Estação Biológica - PqEB, Brasília, DF. CEP 70770-901, Brasil. [inaemarie@hotmail.com](mailto:inaemarie@hotmail.com); [jonny.pereira@embrapa.br](mailto:jonny.pereira@embrapa.br).

### INTRODUÇÃO

A demanda por novas fontes de energia renovável aumenta a cada ano por consequência do alto consumo energético da sociedade atual e pelo fato do petróleo ser a maior fonte de energia, uma fonte de energia não renovável (SAIFUDDIN et al., 2014). Diante desse cenário, o Brasil, desde 2004, decidiu promover um programa para produção de biodiesel por meio de insumos vegetais (BRASIL, 2019). Atualmente, o Brasil é um grande produtor de óleo vegetal. Porém a grande parte desse produto provém de grãos de soja. Por outro lado, a oleaginosa com maior produtividade do mercado atual é a palma de óleo (*Elaeis* spp.), com capacidade produtiva por hectare de 7 a 10 maior que a soja (JAYANTHI et al., 2015).

Para manutenção da alta produtividade da palma de óleo, é preciso a multiplicação de genótipos superiores, um problema enfrentado hodiernamente, visto que a principal forma de propagação dessa palmeira é via sementes (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020). As sementes têm alto grau de heteroziguidade e produz lavouras não-uniformes, por isso, a clonagem da palma de óleo via embriogênese somática apresenta-se como a única capaz de permitir uma propagação uniforme de genótipos superiores (SILVA-CARDOSO; GOMES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2022).

Entretanto, durante a embriogênese somática, algumas anormalidades podem ocorrer na formação de plantas, como é o caso da hiperhidricidade. Formações com esta anormalidade podem apresentar tecidos com aspecto translúcido e vítreo em razão do alto acúmulo de água, o que causa prejuízos ao desenvolvimento geral do vegetal, não raramente levando-os à morte (GAO; XIA; AN, 2017). Entretanto, apesar de ser um fenômeno já bastante conhecido na literatura, esse tipo de desordem é pouco investigado em termos histológicos, bioquímicos e moleculares, muitas vezes não citada ou ignorada em protocolos de embriogênese somática de palma de óleo. Para identificar os possíveis prejuízos da hiperhidricidade e elucidar os eventos envolvidos com esse fenômeno, a análise histológica pode ser uma ferramenta eficaz. Adicionalmente, a caracterização dos compostos nutricionais dos embriões somáticos via histoquímica fornece informações sobre a sua qualidade fisiológica e as semelhanças e diferenças em relação ao embrião zigótico (SILVA-CARDOSO et al., 2019). Diante do



exposto, este trabalho objetivou analisar as diferenças histoquímicas, especificamente com relação ao conteúdo de proteínas e amido, entre embriões somáticos normais e hiperhídricos de palma de óleo.

## MATERIAL E MÉTODOS

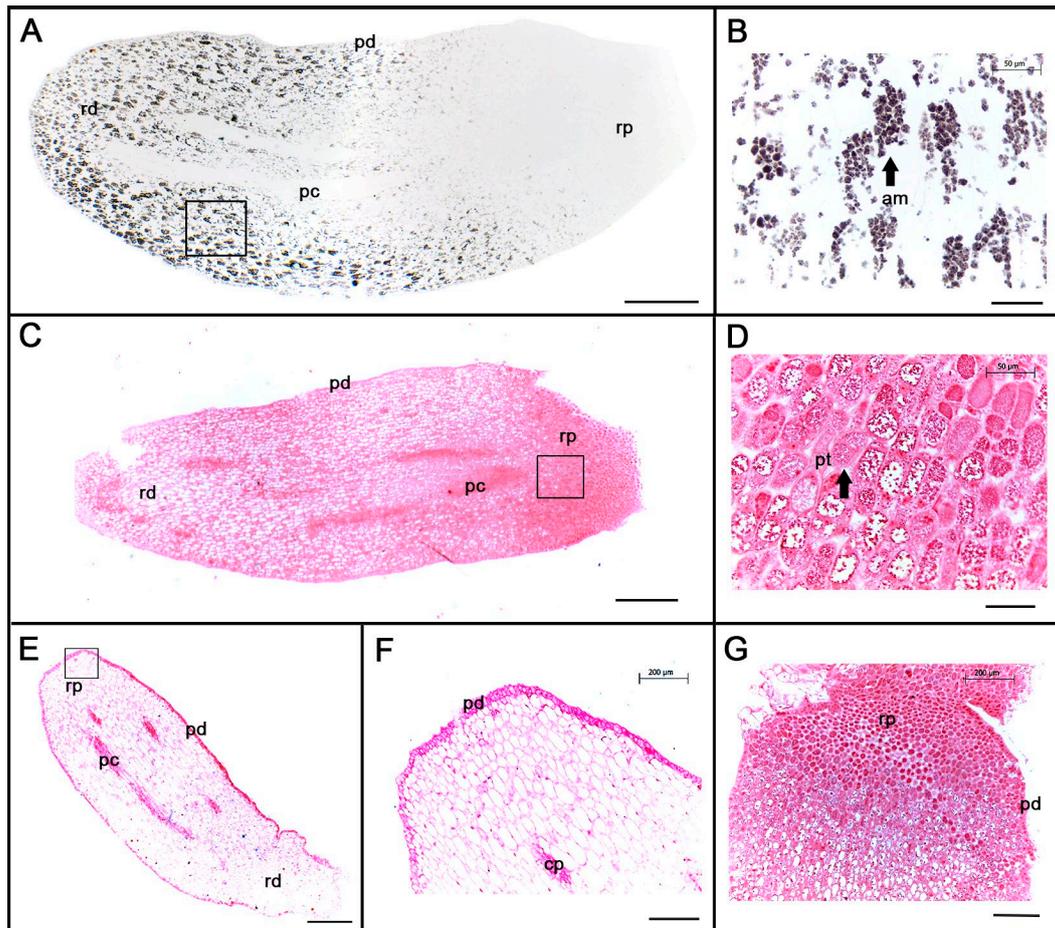
Para análise histoquímica, seis embriões somáticos de um híbrido interespecífico de palma de óleo (*Elaeis oleifera* × *E. guineensis*) com dois fenótipos distintos (normal e hiperhídrico) foram aleatoriamente separados. Os materiais foram obtidos diretamente do meio de diferenciação de embriões somáticos (½MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 1 g/L de caseína hidrolisada, 0,25 g/L de aminoácidos - glutamina, asparagina, cisteína e arginina, 1 mg/L de ácido giberélico, 2,3 g/L de phytigel e 1,5 g/L de carvão ativado), após 360 dias de cultivo.

As amostras foram fixadas, desidratadas e emblocadas em resina conforme metodologia abaixo. A fixação foi realizada em solução Karnovsky modificada com paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), na qual as amostras permaneceram por 24 h dentro, sendo que a primeira hora sob condição de vácuo. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução de cacodilato de sódio, por 1 h cada, todos em condições de vácuo. A desidratação foi feita em série etanólica crescente (70-100%, 1 hora cada, sob vácuo) e a infiltração em historresina (Leica, Heidelberg, Germany), seguindo as especificações do fabricante. Utilizando-se micrótopo 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 à 40 °C. Testes histoquímicos também foram realizados para verificar a presença de proteínas e amido, respectivamente, utilizando-se *Xylydine ponceau* (XP) (VIDAL, 1970) e Lugol (JOHANSEN, 1940).

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).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Conforme as análises histoquímicas, verificou-se que os embriões somáticos normais apresentaram quantidades maiores de reservas nutricionais – amido e proteína (Fig. 1 A-D), em relação ao grupo hiperhídrico (Fig. 1 E-G). Verificou-se também que a distribuição das reservas amiláceas em embriões somáticos normais se concentrou na região distal, enquanto as reservas proteicas concentraram-se na região proximal das amostras (Fig. 4). Já nos embriões hiperhídricos, verificaram-se apenas reservas proteicas (Fig. 1 G).



**FIGURA 1** - Análise histoquímica de embriões somáticos hiperhídricos e normais de um híbrido interespecífico de palma de óleo (*Elaeis oleifera* × *E. guineensis*) corados com Lugol e *Xylindine Ponceau* (XP). A-B: Secções longitudinais de embriões somáticos normais coradas com Lugol. C-D: Secções longitudinais de embriões somáticos normais coradas com XP. E-G: Secções longitudinais de embrião somáticos hiperhídricos coradas com XP. Abreviações: am: amido, pc: procâmbio, pd: protoderme, cp: procâmbio, pt: proteína, rd: região distal, rp: região proximal. Barras: A, C e E: 500 µm; B e D: 50 µm; F e G: 200 µm.

Eliášová et al. (2022) citam que diversos carboidratos não estruturais têm diversas funções dentro das plantas, dentre elas, destaca-se o papel como agente de controle osmótico, na regulação gênica e nas vias de sinalização. Dessa forma, hipotetiza-se que os grãos de amido visualizados nos embriões somáticos normais podem participar do controle do acúmulo de água no apoplasto (DRIES et al., 2013).

Ao analisar a quantidade de proteínas pelo teste histoquímico, percebe-se menor conteúdo proteico nos embriões somáticos hiperhídricos, devido ao fato dessa anormalidade possivelmente causar mudanças na biossíntese de aminoácidos e, conseqüentemente, uma baixa taxa proteica (KEVERS et al., 2004). Além disso, o grande acúmulo de água, típico de embriões hiperhídricos, pode causar



mudanças estruturais nas enzimas e nas vias metabólicas de produção de proteínas (POLIVANOVA; BEDAREV, 2022).

Em palmeiras, os embriões zigóticos apresentam grande quantidade de reservas de proteínas, que podem estar relacionadas com o desenvolvimento da semente até sua fase de independência fotossintética (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017). Ribeiro et al. (2019) identificaram que um balanço de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo é necessário para suportar os diversos estresses causados pela embriogênese somática e garantir uma taxa balanceada de oxidação. Além disso, percebe-se uma forte relação entre a hiperhidricidade e super expressão de genes ligados à atividade antioxidante como catalase e superóxido dismutase (SOUNDARARAJAN et al., 2017).

Diante dos resultados obtidos, constata-se a importância das reservas amiláceas e proteicas na manutenção do fenótipo normal de embriões somáticos de palma de óleo. Investigações bioquímicas e moleculares posteriores são necessárias para a elucidação detalhada do papel do amido e proteínas na qualidade fisiológica de embriões somáticos dessa palmeira.

## CONCLUSÕES

Embriões somáticos normais apresentam melhor qualidade fisiológica, visto que exibem uma maior quantidade de reservas proteicas e de amido, que favorece o processo germinativo, o incremento do vigor das plantas e a plena germinação. A distribuição de proteína e amido foi distinta nesses embriões somáticos com relação às regiões proximal e distal. Já os embriões somáticos hiperhídricos não apresentaram reserva de amido e exibem um menor conteúdo proteico.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a FAPDF e CNPq pelo financiamento do projeto e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo local de trabalho e materiais.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/biodiesel/programa-nacional-de-producao-e-uso-do-biodiesel-pnpb>. Acessado em 26 de Abril de 2023.

CUI, J.; LAMADE, E.; TCHERKEZ, G. Seed germination in oil palm (*Elaeis guineenses* Jacq.): a review of metabolic pathways and control mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4227, 2020.

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

ELIÁŠOVÁ, K.; KONRÁDOVÁ, H.; DOBREV, P.I.; MOTYKA, V.; LOMENECH, A. M.; FISCHEROVÁ, L.; LELU-WALTER, M. A.; VONDRÁKOVÁ, Z.; TEYSSIER, C. Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of norway spruce somatic embryos:



carbohydrates, phytohormones and proteomic status. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. 823617, 2022.

GAO, H.; XIA, X.; AN, L.; XIN, X.; LIANG, Y. Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO<sub>3</sub> and its associated mechanism during in vitro culture. **Plant Science**, v. 254, p. 1-11, 2017.

JAYANTHI, M.; SUSANTHI, B.; MURALI-MOHAN, N.; MANDAL, P. K. In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 256, 2015.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.

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

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L.M.; OLIVEIRA, D. M. T. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. **Protoplasma**, v. 254, p. 1563-1578, 2017.

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

SAIFUDDIN, M.; GOH, P. E.; HO, W. S.; MONERUZZAMAN, K. M.; FATIMA, A. Biodiesel production from waste cooking palm oil and environmental impact analysis. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 20, p. 186-192, 2014.

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of preembryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, p. 845-875, 2019.

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

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

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