



**LUANA FERREIRA TORRES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
EMBRIOGÊNICO DE SUSPENSÕES  
CELULARES DE *Coffea arabica***

**LAVRAS – MG**

**2013**

**LUANA FERREIRA TORRES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE SUSPENSÕES  
CELULARES DE *Coffea arabica***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Co – Orientador

Prof. Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Torres, Luana Ferreira.

Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de  
*Coffea arabica* / Luana Ferreira Torres. – Lavras : UFLA, 2013.  
111 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.  
Orientador: Luciano Vilela Paiva.  
Bibliografia.

1. Café. 2. Suspensão celular embriogênica. 3. Expressão gênica.  
4. Morfologia celular. 5. Aspectos ultraestruturais. 6. Propagação *in vitro*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

**LUANA FERREIRA TORRES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGÊNICO DE SUSPENSÕES  
CELULARES DE *Coffea arabica***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

EMBRAPA COSTEIROS

Dra. Evânia Galvão Mendonça

UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Orientador

---

**LAVRAS – MG**

**2013**

A Deus, por me proteger de todo o mal

*Ofereço.*

A meus pais, Aloísio e Cidinha

A minha irmã, Marcela

Aos meus avôs

Ao meu companheiro, amigo e namorado, Roberto

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus. Por me propiciar saúde, força de vontade e sabedoria nos momentos difíceis. Pela família linda que me permitiu e pelas possibilidades colocadas em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Luciano Vilela Paiva, pela oportunidade de trabalho no LCBM e posterior orientação no mestrado. Sempre nos impulsionando ao raciocínio e a sermos excelentes pesquisadores.

Ao professor Leandro Eugenio Cardamone Diniz pela co-orientação, ajuda, sugestões e atenção a que sempre me destinou.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal pelos ensinamentos transmitidos.

A Kalynka Gabriella do Livramento pela generosidade, convivência, aprendizado, ensinamentos, sinceridade e ajuda por todo esse tempo. Em especial, pela confiança e amizade.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e aceitação do convite.

Aos ex-integrantes de Iniciação Científica do Grupo Café: Dayane, Jéssica e Filipe, por terem me recebido de braços abertos e possibilitado que uma grande amizade fosse construída, sempre rodeada de boas gargalhadas. A nova integrante do grupo, Luciana, pela simpatia e imensa ajuda nos experimentos e no dia a dia.

A todos os integrantes do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), pelo convívio harmonioso. Em especial ao Fabrício, pela grande ajuda e amizade desde que comecei a trabalhar no LCBM. A Heliete, pelo convívio e boa vontade em ajudar. Ao Luiz Gustavo, pela ajuda nas etapas moleculares.

A Marlúcia Souza Pádua, pelos ensinamentos, convívio, generosidade e amizade, e também pela imensa ajuda nas análises histológicas.

A Vânia, secretária do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal pela ajuda nas mais diversas situações.

Ao Douglas Barduche, pelas sugestões e ajuda.

Ao André Moreira Lima, minha eterna gratidão pela generosidade, paciência e boa vontade em ajudar durante o experimento de qPCR.

Aos membros do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP), Horllys Barreto pela ajuda e conselhos, Rafael Moreira pela ajuda e ao Prof. Chalfun pela disponibilidade do aparelho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) pela possibilidade de realização das análises ultraestruturais.

Ao Laboratório de Genética Molecular, pela disponibilidade do aparelho.

Ao Anderson Tadeu Silva, pela ajuda nas análises dos resultados de expressão gênica.

As amigas que mesmo de longe se fazem presentes: Aline, Fernanda e Marta, pela amizade e momentos de incentivo.

A meus pais, minha irmã e avôs, por torcerem e sempre acreditar no meu potencial. Todo sacrificio por vocês!

A minha doce e sincera companheira Bianca, que com toda sua fidelidade e seu amor, me mostrou que o amor pelos animais é uma benção e para vida toda!

Ao Roberto, meu namorado, companheiro e amigo, e acima de tudo, o maior incentivador dessa vitória e de outras que virão.

A todos vocês, o meu MUITO obrigada!!

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.  
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”*

**Cora Coralina**

## RESUMO GERAL

TORRES, Luana Ferreira. **Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea arabica***. 2013. 111 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A suspensão de células embriogênicas (ECS) é iniciada pela inoculação de calos friáveis em meio líquido e sob agitação constante, se mostrando como um sistema de propagação *in vitro* bastante eficiente para aplicações biotecnológicas. As análises da morfologia das células e a caracterização ultraestrutural, por meio das microscopias fotônica e eletrônica, permitem visualizar a transição das células somáticas para embriogênicas, através das características diferenciadoras entre as células, inferindo se o material possui potencial embriogênico. Além disso, o uso de genes marcadores moleculares estádio-específicos apresenta-se como estratégia para o estudo dos processos da embriogênese somática, permitindo uma melhor compreensão dos aspectos moleculares desses processos de desenvolvimento, além de propiciar a possibilidade de otimização de sistemas e protocolos de embriogênese somática. No capítulo 2, objetivou-se relacionar a estrutura morfológica e ultraestrutural de ECS de *Coffea arabica* cv. Bourbon com seu potencial embriogênico, através da curva de crescimento e das microscopias fotônica, de varredura e de transmissão. No período analisado, a curva de crescimento da ECS apresentou três fases distintas: lag (0 a 4 dias), exponencial (4 a 20 dias) e desaceleração (20 a 28 dias). Os procedimentos de subcultivos para manutenção e multiplicação das ECS devem ocorrer ao final da fase exponencial ou início da fase de desaceleração, bem como a renovação do meio de cultivo. Dois tipos celulares foram identificados: Tipo 1, apresentou características altamente embriogênicas, tais como: células pequenas com citoplasma denso, ausência de grandes vacúolos, núcleo grande e nucléolos proeminentes e presença de grãos de amido; Tipo 2, apresentou células grandes, dispersas, vacuoladas, com ausência de núcleos, pouca ou nenhuma presença de grãos de amido. A análise por MEV das amostras com quatro dias mostrou a presença de células arredondadas e isodiamétricas, formando os aglomerados celulares e menor frequência de células murchas, além da presença de células em divisão. Nas amostras com 28 dias notou-se a presença de células assimétricas, murchas e rompidas. As análises por MET permitiram visualizar na amostra de 4 dias, células com núcleo e nucléolo proeminente, alta razão núcleo/citoplasma, abundante presença de amiloplastídeos e parede celular com pequenos espaços intercelulares. Nas amostras de 28 dias, a grande presença de vacúolos, alguns ocupando quase que totalmente o citoplasma, grandes espaços intercelulares e ausência de conteúdo celular. No capítulo 3, objetivou-se relacionar a renovação do meio nutritivo com a morfologia das células e a expressão dos genes *SERK* e *BBM* de ECS de

*Coffea arabica* cv. Catiguá. Todas as ECS coletadas (30, 45, 60 e 75 dias) possuíam significativos aspectos embriogênicos, exceto aos 75 dias, que também apresentou materiais com características não embriogênicas. Com relação à expressão dos genes marcadores, as análises de expressão sugerem uma relação transitória de indução entre *SERK* e *BBM* durante o crescimento da suspensão celular. A renovação quinzenal de 90% do meio de cultura ocasiona um nível de estresse às células, com relação direta na expressão dos genes, ou seja, não permite aos genes sua expressão natural.

Palavras-chave: ECS. Morfologia celular. Aspectos ultraestruturais. Expressão gênica. *SERK*. *BBM*.

## GENERAL ABSTRACT

TORRES, Luana Ferreira. **Evaluation of the embryogenic potential of *Coffea arabica* cellular suspension**. 2013. 111 p. Dissertation (Masters in Plant Biotechnology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

Embryogenic cell suspension (SCE) is initiated by the inoculation of friable calluses in a liquid medium and under constant agitation, showing to be an *in vitro* propagation system efficient for biotechnological applications. Cell morphology analyses and the ultra-structural characterization, by means of photon and electronic microscopy, allows the visualization of the transition of somatic cells into embryogenic cells through the differentiating characteristics between the cells, inferring if the material possesses embryogenic potential. In addition, the use of stage-specific molecule marking genes is presented as a strategy for studying somatic embryogenesis process, allowing a better understanding of the molecular aspects of these development processes, besides providing the possibility of optimizing the systems and protocols of somatic embryogenesis. In chapter 2, the objective was to relate morphological and ultra-structural structure of *Coffea arabica* cv. Bourbon SCE with its embryogenic potential, through the growth curve the photonic microscopies, scanning and transmission. In the analyzed period, SCE growth curve presented three distinct phases: lag (0 to 4 days), exponential (4 to 20 days) and deceleration (20 to 28 days). The procedures of SCE maintenance and multiplication subcultures, as well as the renovation of the culture medium, must occur at the end of the exponential phase or at the beginning of the deceleration phase. Two cell types were identified: Type 1 – presented highly embryogenic characteristics, such as small cells with a dense cytoplasm, absence of large vacuoles, large nucleus and prominent nucleolus and presence of starch grains; Type 2 – presented large, disperse cells, with the presence of vacuoles, absence of nucleus, little or no starch grain. Analyses by scanning electronic microscopy of samples with 4 days showed the presence of rounded and isodiametric cells, forming the cell agglomerates, and the smaller frequency of wilted cells, in addition to the presence of dividing cells. In the samples with 28 days, the presence of asymmetric, wilted and ruptured cells. The analyses by transmission electronic microscopy allowed the visualization, in the 4 day sample, of cells with prominent nucleus and nucleolus, high nucleus/cytoplasm ratio, elevated presence of amy1-plastids and cell wall with small intercellular spaces. In the samples with 28 days, the large presence of vacuoles, some almost occupying the entirety of the cytoplasm, large intercellular spaces and the absence of cellular content were observed. In chapter 3, the objective was to relate the renovation of the nutritive medium to the morphology of the cells and the expression of *Coffea arabica* cv. Catigua SCE genes *SERK* and *BBM*. All the collected SCE (30, 45, 60 and 75 days) possessed significant embryogenic aspects, except at 75 days, which also presented materials with non embryogenic characteristics. Regarding the expression of

the marker genes, the expression analyses suggest a transient relation of induction between *SERK* and *BBM* during the growth of the cellular suspension. The fortnightly renovation of 90% of the culture medium causes a level of stress to the cells, with a direct relation to gene expression, that is, it does not allow the natural expression of the genes.

Keywords: SCE. Cellular morphology. Ultra-structural aspects. Gene expression. *SERK*. *BBM*.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>Introdução geral.....</b>	<b>15</b>
1.	Introdução .....	16
2.	Referencial teórico .....	19
2.1	O cafeeiro e as técnicas biotecnológicas .....	19
2.2	Cultivo in vitro .....	20
2.3	Embriogênese Somática .....	22
2.4	Caracterização das massas proembriogênicas .....	24
2.5	Cultura de calos .....	26
2.6	Suspensão celular embriogênica (ECS) .....	29
2.7	Genes marcadores para a embriogênese somática: Somatic Embryogenesis Receptor Kinase ( <i>SERK</i> ) e Baby Boom ( <i>BBM</i> ) .....	31
2.8	Transformação Genética .....	36
3.	Considerações Gerais .....	39
	REFERÊNCIAS.....	40
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares tardias de <i>Coffea arabica</i> cv. Bourbon através de análises morfológicas e ultraestruturais.....</b>	<b>46</b>
1.	Introdução .....	49
2.	Material e métodos.....	51
2.1	Curva de crescimento das ECS.....	51
2.2	Análises Histológicas e Ultraestruturais .....	52
3.	Resultados e discussão .....	54
3.1	Curva de crescimento das ECS.....	54
3.2	Análises Histológicas.....	58
3.2.1	Microscopia Fotônica .....	58
3.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	66
3.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	69
4.	Conclusões .....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>Influência da renovação do meio de cultura na morfologia celular e na expressão gênica de <i>SERK</i> (<i>Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase</i>) e <i>BBM</i> (<i>Baby Boom</i>) em suspensões celulares de <i>Coffea arabica</i> cv. Catiguá .....</b>	<b>82</b>
1.	Introdução .....	85
2.	Material e métodos.....	87
2.1	Material botânico .....	87
2.2	Indução de calos embriogênicos .....	87

2.3	Indução da suspensão celular .....	88
2.4	Caracterização morfológica .....	88
2.5	Influência da renovação do meio nutritivo na expressão dos genes <i>SERK</i> e <i>BBM</i> .....	89
2.6	Quantificação da expressão relativa entre os genes <i>SERK</i> e <i>BBM</i> .....	89
2.6.1	Extração de RNA .....	89
2.6.2	Tratamento das amostras para eliminação de DNA genômico .....	90
2.6.3	Obtenção de cDNA.....	90
2.6.4	Análise da expressão dos genes <i>SERK</i> e <i>BBM</i> mediante qPCR.....	90
3.	Resultados e Discussão .....	91
3.1	Análises Morfológicas através da Microscopia Fotônica .....	91
3.2	Análise da expressão gênica de <i>SERK</i> (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase) e <i>BBM</i> (Baby Boom) mediante qPCR.....	97
4.	Conclusões .....	103
	REFERÊNCIAS.....	104
	<u>ANEXOS</u> .....	107

## **CAPÍTULO 1** Introdução geral

## 1. INTRODUÇÃO

O café é uma das mais importantes commodities mundiais, movimentando aproximadamente 80 bilhões de dólares ao ano. A cafeicultura, atividade de elevada importância no cenário do agronegócio brasileiro, permitindo que o país seja o maior produtor e o segundo consumidor global. Entretanto nossa produção cafeeira não vem acompanhando a crescente demanda mundial. Vários são os problemas que devem ser solucionados para aumentar a produtividade e um grande esforço de pesquisa tem sido voltado para essa meta.

Um dos objetivos centrais das pesquisas está voltado para o desenvolvimento de variedades mais produtivas e, ao mesmo tempo, mais resistentes aos vários estresses bióticos e abióticos, que são as causas principais para grandes perdas de produção e cujo combate é danoso ao meio ambiente, quer seja pelo uso intensivo de agroquímicos ou pelo grande uso de água na irrigação.

Para a obtenção de variedades mais produtivas e resistentes aos fatores bióticos e abióticos, tem se abordado com grande frequência técnicas de cultura *in vitro* de tecidos vegetais, que vem sendo utilizadas com sucesso principalmente na multiplicação de espécies e na introdução de características de interesse agrônomo mediante a transgenia.

Focando em dois aspectos, clonagem e transgenia, muitos estudos têm sido concentrados no entendimento dos processos que controlam a embriogênese somática *in vitro*.

A embriogênese somática corresponde ao processo de formação do embrião a partir de células somáticas, sem fusão de gametas. É um mecanismo de reprodução assexuada que ocorre naturalmente em algumas espécies, mas que pode ser induzida *in vitro*, por via indireta ou direta. Na via direta os embriões se desenvolvem a partir de células do tecido

organizado do explante e, na indireta, os embriões se desenvolvem a partir de células de calos, provenientes da desdiferenciação de células do explante.

Embriões somáticos zigóticos induzidos *in vitro* se desenvolvem por vias diferentes, mas são morfológicamente semelhantes, o que permite o uso dos embriões somáticos em aplicações biotecnológicas, como a propagação vegetativa em larga escala, a formação de bancos de germoplasma criopreservados ou como alvo para eventos de transformação genética.

A suspensão de células embriogênicas ou “*Embryogenic cell suspension – ECS*” tem se mostrado como um sistema de propagação *in vitro* bastante eficiente para essas aplicações biotecnológicas. As ECS são obtidas através dos calos embriogênicos, e se caracterizam por milhares de glomérulos celulares mantidos em meio líquido e rotação constante, passíveis de serem induzidos a completar o desenvolvimento embrionário. A metodologia para obtenção e manutenção deste tipo de material vegetal é bem conhecida, mas os protocolos são genótipo dependente, o que torna necessário o desenvolvimento de protocolos específicos para cada espécie.

A embriogênese somática em *Coffea sp.* apresenta-se como um importante método de multiplicação de plantas-elite *in vitro*, em larga escala, apresentando um grande potencial a ser explorado, e capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de híbridos oriundos de programas de melhoramento genético.

Para o alcance da embriogênese somática indireta de qualidade é necessário o estudo minucioso do desenvolvimento do material embriogênico através de análises histológicas, que permitem visualizar a transição das células somáticas para embriogênicas, através das características diferenciadoras entre as células. É possível analisar a morfologia das células e suas características ultraestruturais por meio de microscopias fotônica e eletrônica, inferindo se o calo possui características embriogênicas.

Análises que utilizem marcadores moleculares ligados aos eventos embriogênicos, devido a maior rapidez e sensibilidade, são de extrema

utilidade para os trabalhos de desenvolvimento de protocolos de ECS. *SERK*, *LECI*, *AGL15*, *PKL*, *WUS* e *BBM* são genes relacionados à embriogênese somática, mas apenas o gene *SERK* é específico das células embriogênicas, enquanto o gene *BBM* induz a formação espontânea de embriões somáticos.

A análise de marcadores moleculares estágio-específicos apresenta-se como uma estratégia para o estudo dos processos da embriogênese zigótica e somática. Sua identificação e utilização permite uma melhor compreensão dos aspectos básicos destes processos de desenvolvimento, além de propiciar a possibilidade de otimização de sistemas e protocolos de embriogênese somática para fins biotecnológicos.

Objetivou-se neste trabalho, avaliar e relacionar a estrutura morfológica e ultraestrutural de ECSs de *Coffea arabica* cv. Bourbon com seu potencial embriogênico, através da curva de crescimento e das microscopias fotônica, de varredura e de transmissão. Além disso, relacionar a renovação do meio nutritivo com a morfologia das células e a expressão dos genes *SERK* e *BBM* como marcadores moleculares do potencial embriogênico de células em suspensão de *Coffea arabica* cv. Catiguá.

Espera-se dessa maneira que esses genes possam ser utilizados como marcadores moleculares associados aos estágios embriogênicos, possibilitando um controle mais refinado dos materiais com potencial embriogênico para trabalhos futuros em transformação genética.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O cafeeiro e as técnicas biotecnológicas

O café é uma das commodities agrícolas mais importantes, segundo lugar no ranking do comércio internacional, depois apenas do petróleo bruto. A produção mundial de café verde está acima de 144 milhões de sacas (60 kg de capacidade) com um valor de vendas no varejo em excesso de 22,7 bilhões de dólares em 2010 e 2011 no mercado mundial. Em 2012, a produção brasileira correspondeu a 50,2 milhões de sacas (60 kg de capacidade) (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO, 2013).

O café é cultivado em cerca de 10,2 milhões de hectares de terra em mais de 80 países nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente na África, Ásia, e América Latina (MISHRA; SLATER, 2012). O cafeeiro é uma cultura perene de alto valor socioeconômico nos diversos países produtores de café, inclusive no Brasil, destacando-se no cenário econômico nacional e internacional (FIGUEIREDO, 2011). Pertence ao gênero *Coffea*, família Rubiaceae e é formado por cerca de 100 espécies, mas apenas duas com importância econômica: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre, sendo o primeiro responsável por mais de 75% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

A cafeicultura é uma atividade de grande expressão no cenário agroindustrial, destacando o Brasil como o maior produtor e exportador de café do mundo. Minas Gerais é responsável por 50% da produção nacional, sendo o sul do estado a maior região produtora. A forma mais utilizada de propagação do cafeeiro acontece por meio de mudas obtidas de sementes, entretanto a perda do poder germinativo é considerada um dos principais problemas à sua propagação, por dificultar o armazenamento e preservação

de estoques genéticos superiores (FIGUEIREDO, 2011; SANTOS et al., 2003).

*Coffea arabica* é a espécie mais "nobre" do cafeeiro, que produz a bebida de melhor qualidade e com menor teor de cafeína. No entanto, essa espécie é muito suscetível a doenças, como a ferrugem da folha ou ferrugem laranja (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) e a doença da baga do café ou CBD (*Colletotrichum kahawae* Bridge & Waller) (KUMAR; NAIDU; RAVISHANKAR, 2006; MISHRA; SLATER, 2012). Esse impasse tem estimulado o desenvolvimento de programas de melhoramento genético a fim de obter plantas resistentes às referidas doenças. A propagação de material vegetal resistente ou “melhorado” depende da eficiência da propagação clonal e dos métodos de regeneração. A propagação vegetativa do café por meio de técnicas convencionais é geralmente lenta, trabalhosa e insuficiente para as demandas dos agricultores (SIMÕES-COSTA et al., 2010).

A redução da produtividade é afetada por sementes e mudas com baixas taxas de multiplicação e suscetibilidade a diferentes doenças e pragas, especialmente a ferrugem, principal doença do cafeeiro (JULIATTI; SILVA, 2001). Técnicas como a cultura de tecidos vegetais e a transformação genética de plantas podem contribuir para a melhoria do café e acelerar a liberação de variedades com novas características superiores (GATICARIAS; ARRIETA-ESPINOZA; ESQUIVEL, 2008).

## **2.2 Cultivo *in vitro***

A cultura de tecidos vegetais designa o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas, que além de poder proporcionar variação genética, condição essencial para seleção de genótipos superiores, amplia a compreensão dos fenômenos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas. A regeneração de um novo indivíduo em condições assépticas pode ocorrer a partir de uma única célula,

processo esse denominado como totipotencialidade, em que qualquer célula do organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a formação de uma planta completa (FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007; GALLO; CROCOMO, 1995).

O processo de regeneração *in vitro* pode ser realizado por duas vias distintas: a organogênese e a embriogenese somática. No primeiro caso, brotos e raízes formam-se sequencialmente, enquanto que no segundo caso, células somáticas originam estruturas semelhantes a embriões zigóticos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Meios de cultivo são combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento, que são utilizados para o desenvolvimento do explante durante o cultivo *in vitro*. Podem ser sólidos (adicionando-se ágar ou outro agente para gelificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo. Os meios utilizados fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro* (TORRES et al., 2000). A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender necessidades específicas. O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio, sendo considerado como o meio básico, base de todos os outros meios de nutrição (GUERRA; NODARI, 2006).

O sistema de propagação de espécies arbóreas como o café requer a formação de mudas de boa qualidade a partir de linhagens produtivas, bem adaptadas, saudáveis e vigorosas. Sendo assim, o uso de técnicas de cultura de tecidos tem se apresentado como alternativa para obtenção de mudas de cafeeiros, as quais possibilitam a multiplicação de grande número de plantas com uniformidade genética, em curto espaço de tempo em qualquer época do ano (FIGUEIREDO, 2011).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação via embriogênese somática tem apresentado excelentes resultados para inúmeras espécies. No entanto, muitos fatores são limitantes na cultura *in vitro* do cafeeiro, entres eles, luminosidade, umidade do ar, temperatura, equilíbrio hormonal, aclimatização etc.

### **2.3 Embriogênese Somática**

A embriogênese somática é o processo pelo qual há a formação do embrião somático, uma estrutura bipolar, que se desenvolve a partir de uma célula isolada ou de um pequeno grupo de células somáticas, não-zigóticas e sem conexão vascular com o tecido original (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Este processo pode ser dividido em quatro fases: 1) indução em meios de culturas contendo auxinas (mais frequentes) e citocininas (menos frequentes); 2) multiplicação em meios contendo auxinas em baixas concentrações; 3) maturação em presença de ABA e/ou agentes osmóticos e; 4) germinação em meios de cultura isentos de fitorreguladores (FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007). Resumindo em duas etapas principais, a primeira é a indução que leva algumas células dos explantes a adquirirem a característica embriogênica, ao passo que a segunda está associada à expressão do embrião somático (ALMEIDA et al., 2008).

O primeiro estágio do embrião, na qual ele adquire o formato globular, compreende divisões celulares internas que já revelam a formação do eixo e a diferenciação regional. No estágio globular tardio, o embrião adquire o formato triangular, em razão ao crescimento localizado em regiões de posições opostas ao domínio apical. No estágio cordiforme, o embrião compreende aproximadamente 200 células e o primórdio dos maiores órgãos da planta assim como tecidos básicos são anatomicamente distinguíveis. No estágio de torpedo, divisões assimétricas e periclinais resultam em camadas que adquirem características distintas, endoderme e parênquima cortical. No

ultimo estagio, o cotiledonar, a iniciação da raiz primordial e do ápice caulinar caracterizam a finalização do embrião (PEREIRA, 2010).

Contudo, as condições experimentais que induzem as células somáticas a adquirirem o potencial embriogênico são específicas ao genótipo (cultivar/espécie), tecido e fase de desenvolvimento do vegetal do qual se obtém o explante e níveis endógenos de hormônios, o que torna praticamente empírica a obtenção dos protocolos.

Para a indução das células embriogênicas em *Coffea*, duas estratégias têm sido utilizadas: o cultivo do explante em um único meio de cultura, suplementado apenas com citocinina, ou a combinação de auxina e citocinina e o cultivo de explantes em um meio primário ou de indução, seguido da transferência dos explantes para o meio secundário, tido como de diferenciação ou de acondicionamento, que difere do primeiro por possuir menor razão auxina/citocinina (MACIEL et al., 2003).

Células embriogênicas *in vitro* são passíveis de manipulação por técnicas celulares e moleculares, em contraste com as células gaméticas e o zigoto, que estão embebidos no tecido materno. Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

De acordo com Williams e Maheswaran (1986), a embriogênese somática pode ser induzida *in vitro* por via direta ou indireta. Na via direta os embriões se desenvolvem a partir de células do tecido organizado do explante e, na indireta, os embriões se desenvolvem a partir de células de calos, provenientes da desdiferenciação de células do explante. Na via indireta, um meio de cultura mais complexo é requerido para induzir a desdiferenciação e divisão das células do explante antes que elas expressem a competência embriogênica.

Na via indireta, o desenvolvimento do calo embriogênico antecede a formação do embrião somático. A desdiferenciação é o primeiro passo para a aquisição da competência por parte da massa de calos. A ativação da divisão

celular é necessária para manter as células desdiferenciadas, bem como para a diferenciação do embrião (SILVA, 2009).

A embriogênese somática indireta em café compreende uma sequência de etapas incluindo indução e proliferação de calos, desenvolvimento do embrião, germinação e conversão em plantas (GATICA-ARIAS; ARRIETA-ESPINOZA; ESQUIVEL, 2008). Facilita a produção de calos embriogênicos e embriões somáticos em grande escala para experimentos de transformação genética e propagação em massa de clones de café selecionados e híbridos (ETIENNE et al., 2002).

Todavia a regeneração das plantas por esta via não está livre de problemas, observando-se dificuldades de se adequar os protocolos de regeneração, a ocorrência de plantas anormais e a indução de calos não embriogênicos, sendo estes não funcionais na embriogênese somática. Devido a este fato, testes bioquímicos, citológicos e a caracterização morfológica podem prever possíveis problemas com relação ao cultivo, e determinar as características potencialmente embriogênicas dos calos a fim de aperfeiçoar protocolos de embriogênese somática (NOGUEIRA, 2006).

A ocorrência de embriogênese somática em café tem sido relatada para diferentes explantes de diferentes espécies e genótipos, tais como hipocótilo, caule, folha, tegumento e protoplastos (SAMSON et al., 2006).

#### **2.4 Caracterização das massas proembriogênicas**

Formadas as células embriogênicas, elas continuam a se proliferar até formar as massas proembriogênicas (MPE), definidas como aglomerados celulares capazes de produzir embriões somáticos. Divisões celulares contínuas resultam na formação de massas de células embriogênicas que se caracterizam por serem pequenas, isodiamétricas, possuem alta razão núcleo/citoplasma (citoplasma denso e núcleo grande) e cujos núcleos e nucléolo são densamente corados, mitocôndrias de formato arredondado,

citoplasma com pouco espaço intercelular e sistema celular organizado, microvacúolos e ricas em amiloplastídeos, assemelhando-se com as células meristemáticas. Calos não embriogênicos apresentam em maior parte células grandes, alongadas, vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado, não sendo viáveis (FIGUEIREDO, 2007; NOGUEIRA et al., 2007; SILVA, 2009).

O conhecimento sobre os eventos iniciais da transição de células somáticas para embriogênicas é escasso e as análises que permitem acompanhar estes eventos são as análises ultraestruturais com o uso da microscopia eletrônica de transmissão e ou de varredura, fornecendo maiores detalhes da morfologia interna e externa dos tecidos embriogênicos inferindo se o material possui características embriogênicas (NOGUEIRA et al., 2007; SCHMIDT et al., 1997).

As análises histológicas das características que diferem células somáticas de embriogênicas são úteis para aumentar a eficiência metodológica, mas não permitem detectar os eventos moleculares que induzem à diferenciação morfológica associada ao potencial embriogênico. A detecção desses eventos moleculares assim como o estudo e a obtenção de marcadores moleculares nas fases iniciais do cultivo *in vitro* podem ser fatores fundamentais para o aumento da eficiência embriogênica (SILVA, 2011).

Vários corantes são utilizados para a identificação e caracterização das massas proembriogênicas (MPE). O corante Azul de Toluidina reage com as membranas e núcleos celulares, identificando as células iso diamétricas e citoplasma denso, resultando em coloração azul e violeta (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964). Células alongadas caracterizam-se por serem vacuoladas, sendo coradas com o Azul de Evans que penetra nas rupturas da membrana vacuolizada, colorindo o interior das células de azul (SILVA, 2009).

## 2.5 Cultura de calos

Calo é um agregado de massa celular com crescimento desordenado e certo grau de diferenciação (TORRES et al., 2000), definido como uma massa compacta de células desorganizadas, parcialmente indiferenciadas que se desenvolve em resposta a uma substância química ou lesão física, sob determinadas condições hormonais. Varia quanto ao tipo, tamanho, conteúdo celular e à espessura da parede. Eles podem ser obtidos a partir de um fragmento do tecido e têm a capacidade de se diferenciar em tecidos, órgãos e até em embriões, sendo capaz de regenerar toda a planta (LIMA et al., 2008).

A embriogênese somática a partir de calos proporciona a obtenção de mudas mediante a micropropagação. Em contrapartida, os calos embriogênicos perdem facilmente sua capacidade embriogênica devido ao cultivo sucessivo, além de ocorrerem variações somaclonais indesejadas. Uma técnica recomendável para superar este problema e conservar sua integridade genética por longo período é a criopreservação (MATSUMOTO et al., 2004).

A calogênese é um processo importante para a obtenção indireta de plantas, pois os calos contêm células ou grupo de células que possuem centros ativos de divisão celular. Nas condições adequadas, esses centros são induzidos e se especializam para produzir os órgãos; em alguns casos nos quais já são capazes, os centros são apenas estimulados. As células que são capazes de responder a estímulos diferentes são denominadas competentes e nelas podem ocorrer a diferenciação celular e a formação de brotos ou raízes. A competência e a indução da determinação em células competentes compreendem o primeiro e segundo passo respectivamente para a diferenciação celular. As células ditas determinadas são aquelas que passam por caminhos próprios de desenvolvimento geneticamente programado e continuam sem a influência de reguladores de crescimento (ROCHA; QUOIRIN, 2004).

A cultura de calos proporciona a propagação em larga escala de diversas espécies vegetais e em curto espaço de tempo. Staritsky (1970), pioneiro em cultura de tecidos em cafeeiro, obteve êxito na rápida indução e proliferação de calos nas espécies *C. arabica* e embriões e plântulas em explantes de *C. canephora* (MACIEL et al., 2003; SANTOS et al., 2008). A embriogênese somática foi obtida em diferentes espécies de *Coffea*, em uma grande variedade de explantes, como: caules, folhas, raízes, anteras, embriões imaturos, tegumento da semente, hipocótilo, cotilédones e protoplastos (SIMÕES-COSTA et al., 2010), destacando-se as folhas, por serem mais abundantes e de fácil desinfestação (MACIEL et al., 2003).

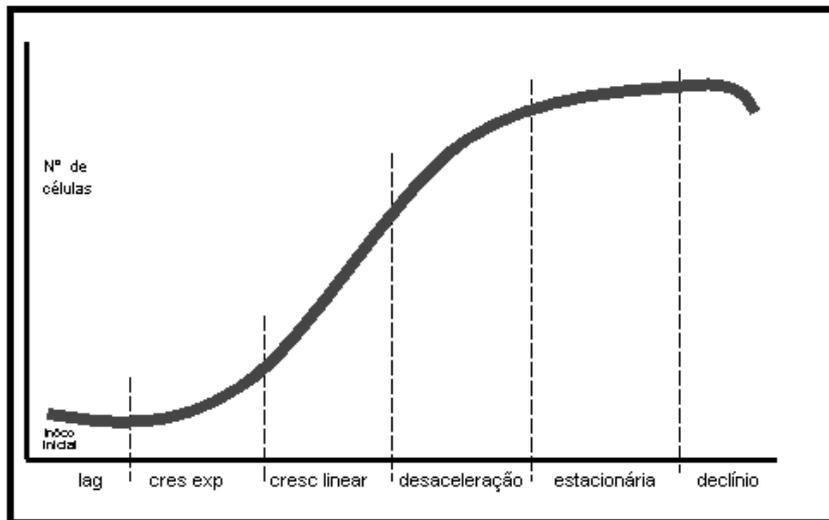
A embriogênese somática em *Coffea* apresenta calos distintos durante a fase de indução. Os calos primários nodulares (CPN's) referem-se às formações globulares compactas surgidas em parte ou, menos frequentes, na totalidade dos bordos dos explantes. Os calos primários mistos (CPM's) apresentam formações amorfas de células alongadas e caracterizam-se pelo crescimento visivelmente mais rápido. Os calos embriogênicos (CE's) são calos primários contendo até 20 embriões por explante, e quando esses se caracterizam por agregados celulares granulosos, facilmente destacáveis e de coloração amarelo-creme, são, então, caracterizados como calos embriogênicos friáveis (CEF's) (MACIEL et al., 2003). Calos pode também apresentar aspecto mole com colorações translúcidas, que se caracterizam por não apresentar qualquer potencial embriogênico. São definidos como calos não embriogênicos (LOW et al., 2008).

O tipo de explante utilizado, a composição do meio de cultura e as condições físicas de incubação, como luz e temperatura são os principais fatores que influenciam sua formação. O índice de divisão celular dos calos pode elucidar as mudanças fisiológicas das células e auxiliar a otimização dos protocolos de regeneração e transformação genética. Com a curva de crescimento dos calos é possível a identificação da melhor fase de repicagem do calo e a transferência deste para o meio líquido, a fim de se iniciar e obter uma suspensão celular com alto potencial. Nesse contexto é fundamental a

determinação da curva de crescimento dos calos, na qual é possível identificar e determinar fases da cinética do desenvolvimento e determinar o comportamento dos metabólitos primários (NOGUEIRA et al., 2008).

De acordo com Guerra e Nodari (2006) e Serra, Paiva e Paiva (2000), um calo típico iniciado de um explante passa por três estágios de desenvolvimento, que compreende a indução da divisão celular, um período de divisão celular ativa e um período no qual a divisão celular é reduzida ou mesmo cessada. Esses estágios podem ser acompanhados numa curva de crescimento caracterizada por seis fases (Figura 1). A curva de crescimento de calos é calculada com o objetivo de se obter a época de repicagem (subcultura), para determinar onde há a maior produção de metabólitos (quando o estudo objetiva o metabolismo secundário). O crescimento celular baseia-se nas mudanças das taxas de divisão em fases definidas e as fases que caracterizam a curva de crescimento são:

- **Fase lag:** sem qualquer divisão celular. Caracterizada pelo número estacionário de células, início da imobilização de metabólitos, síntese de proteínas e síntese de metabólitos específicos. Fase em que ocorre acúmulo de biomassa.
- **Fase exponencial:** divisão celular intensa, o número de células aumentam, células de tamanho pequeno com formação de agregados de células;
- **Fase linear:** crescimento celular ativo, as células adquirem competência para proceder à repicagem. Ocorre a redução na taxa de divisão celular e aumento da área celular;
- **Fase de desaceleração:** a divisão celular diminui e ocorre a expansão da célula. Inicia-se o processo de repicagem.
- **Fase estacionária:** a repicagem deve terminar ainda no início desta fase, pois não ocorre divisão celular, não há síntese de biomassa ou aumento do número de células. As culturas não podem ser mantidas nessa fase por um período longo.
- **Fase declínio:** as células começam a morrer.



**Figura 1** Dinâmica de crescimento de uma suspensão celular (GUERRA; NODARI, 2006).

Determinando as fases lag, exponencial, linear e estacionária da curva de crescimento de calos, obtém-se o índice mitótico para cada fase da curva, o que torna possível determinar o intervalo médio dos subcultivos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A determinação do índice de divisão celular de calos pode auxiliar na otimização dos protocolos de regeneração e transformação genética. A eficiência da inserção de genes é aumentada durante a fase de divisão celular e a eficiência de transformação por métodos diretos (eletroporação e bombardeamento) e indiretos (mediado por *Agrobacterium*) está relacionada a esta taxa de divisão (STEIN et al., 2010).

## 2.6 Suspensão celular embriogênica (ECS)

A cultura de células em suspensão consiste em agregados celulares dispersos em meio líquido sob agitação constante, mantidas no escuro a fim de evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura, para obtenção e propagação destas. As suspensões celulares exibem maior taxa de divisão celular, permitindo um crescimento mais acelerado devido ao

contato direto das células com os nutrientes do meio. Por meio da suspensão de células é possível obter uma propagação clonal em larga escala utilizando pouco espaço e livre de patógenos (GUERRA; NODARI, 1996; SILVA, 2009; TORRES; CALDAS; BUSO, 1999).

A obtenção destas suspensões celulares embriogênicas tem sido um dos principais objetivos para maximizar a propagação clonal do cafeeiro, pois detém de alto valor biotecnológico, devido a maior eficiência destas como material vegetal para a transformação genética, produção em larga escala ou criopreservação (SILVA, 2011).

Geralmente estas suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis em meio líquido e sob agitação. A agitação permite a separação das células que podem se dividir formando pequenos aglomerados celulares ou apenas células isoladas. A suspensão celular permite a indução, propagação e manutenção de células em meio líquido, as quais apresentam taxas de divisão mais elevadas do que as cultivadas de maneira convencional. Para se obter uma suspensão celular onde as células tenham competência para se desenvolver em embriões é necessário que ocorra divisões e multiplicações ativas, formando agregados celulares (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). O grau de dissipação de uma suspensão é influenciado pela concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura (SILVA, 2009).

Loyola-Vargas e Vázquez-Flota (2006) explicam que para quantificar o crescimento de células em suspensão, são utilizados principalmente os métodos baseados no número de células, peso de matéria seca, peso de matéria fresca, volume de células e proteína total da célula.

Para se obter ECS de qualidade é essencial que ocorram divisões e multiplicações celulares ativamente (CID, 1998; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999), mas de modo a formarem agregados celulares ou células isoladas, que possam ser mantidos na condição de potencial embriogênico para que sejam induzidos a regenerarem embriões quando desejado. Quanto mais desuniformes forem os tipos celulares, pior a qualidade do material

vegetal para fins tecnológicos, devido à baixa frequência de células embriogênicas.

Estes aglomerados possuem características morfológicas e histológicas específicas que se relacionam aos seus estádios de desenvolvimento e consequentes capacidades regenerativas (GEORGET et al., 2000), o que determina a qualidade de uma suspensão heterogênea.

### **2.7 Genes marcadores para a embriogênese somática: Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (*SERK*) e Baby Boom (*BBM*)**

O envolvimento dos genes nos processos biológicos é confirmado usando a genômica funcional, que envolve a caracterização da variabilidade gênica, modo de expressão, função e interação dos genes. Uma técnica muito utilizada da genômica é a de marcadores moleculares, definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (SILVA, 2011).

Os processos moleculares envolvidos com a competência e a indução para a embriogênese somática em células vegetais ainda não estão totalmente esclarecidos. Sem dúvida estes processos envolvem a reprogramação da expressão gênica, que resultam em alterações morfológicas, bioquímicas e metabólicas nas células. Trabalhos recentes têm sido realizados com a finalidade de se obter marcadores moleculares para a detecção da competência embriogênica, estudos de diversidade genética, caracterização de bancos de germoplasma e mapeamento gênico (BORÉM; CAIXETA, 2006; FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007). A identificação e expressão destes genes marcadores são, na sua maioria, utilizadas para identificar populações celulares competentes para a embriogênese (FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007).

Portanto, é de grande importância a incorporação das técnicas de biotecnologia aos métodos tradicionais de melhoramento genético. O uso dos marcadores moleculares auxilia o melhoramento da espécie de forma

abrangente. Os estudos com este tipo de tecnologia podem ser realizados nos estádios iniciais do desenvolvimento da planta, possibilitando a otimização de protocolos na obtenção da embriogênese somática em plantas, através de diferentes conjuntos de genes.

Estes, por sua vez, são expressos de modo correto para conduzir as mudanças do crescimento vegetativo para o desenvolvimento embriogênico. A expressão diferencial ou a superexpressão desses genes relacionam-se a um aumento da capacidade embriogênica pela célula somática (SILVA, 2011).

Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (*SERK*) pertence a uma pequena família de genes que codificam uma proteína transmembrana envolvida na transdução de sinal e que estão fortemente associados com a embriogênese somática em várias espécies de plantas. Estudos recentes discutem o seu papel na embriogênese somática e apomixia, e sugerem ampla gama de funções na resposta das plantas a estímulos bióticos e abióticos (SANTOS; ARAGÃO, 2009).

SCHMIDT et al. (1997) descreveram um dos primeiros genes envolvidos na expressão da competência celular em cultura de tecidos de cenoura (*Daucus carota*). O *SERK* foi bem sucedido como marcador específico para distinguir células individuais que formam embrião em suspensão celular, sendo que a maioria dos marcadores moleculares de embriogênese somática identificados até o momento estão relacionados com o desenvolvimento embrionário tardio de cenoura. *SERK* é expresso no início do processo de indução da embriogênese somática até o estágio de embrião globular (PEREIRA, 2010; SCHMIDT et al., 1997).

Dentro de uma população de células embriogênicas competentes e não competentes, a expressão do *SERK* tem sido usada e estudada como marcador (SANTA-CATARINA et al., 2004) em diversos trabalhos com outras espécies vegetais: em monocotiledôneas por exemplo, o milho (BAUDINO et al., 2001) e *Dactylis glomerata* (*DgSERK*), espécie de planta forrageira (SOMLEVA; SCMIDT; VRIES, 2000) e em dicotiledôneas, por

exemplo, *Arabidopsis* (*AtSERK1*) (HECHT et al., 2001), *Medicago trunculata* (*MtSERK1*), espécie leguminosa usada em pesquisas na área da genômica (NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003) e girassol (FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007; SILVA, 2011; SANTOS, 2009; THOMAS et al., 2004).

Plantas de *Arabidopsis* obtiveram eficiência aumentada de três a quatro vezes na iniciação de embriões quando superexpressaram o gene *AtSERK1* (HECHT et al., 2001).

No girassol, a expressão do *SERK* está correlacionada com a indução de duas diferentes vias de desenvolvimento, embriogênese somática e organogênese. Apesar de seu papel no desenvolvimento das plantas, genes diferentes da família mostraram diferentes padrões de expressão durante embriogênese somática ou zigótica e a expressão destes genes foi diferencialmente detectada em diferentes tecidos em várias espécies de plantas, tais como no meristema apical, raiz e folhas, sugerindo funções adicionais para este gene (SANTOS, 2009).

É dito, entretanto, que a expressão destes genes homólogos não é específica para marcar células competentes formadoras de embriões, mas está envolvida no processo que confere a competência embriogênica, podendo ser um componente da via de sinalização da embriogênese somática especialmente durante os estádios iniciais de desenvolvimento. As células competentes podem conter um receptor inativo, que pode ser ativado pela presença de algum fator que aciona o programa genético da embriogênese (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003).

O gene *SERK* codifica um receptor transmembrana que contém um domínio intracelular de proteína-Kinase específico de plantas, cuja função está associada à percepção de moléculas sinalizadoras que desencadeiam o processo embriogênico em células somáticas ou zigóticas e um domínio extracelular, constituído por um peptídeo sinal, seguido por um zíper de leucina, cinco repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio rico em

prolina (SPP), que ocorre exclusivamente em proteínas *SERK* servindo como uma marca para identifica-las (Figura 2). Pertencem à superfamília de receptores kinases em vegetais (*RLK-Receptor like kinases*) (ALBRECHT, 2008; KOEHLER, 2010; PEREIRA, 2010; SCHMIDT et al., 1997). O gene *SERK* é expresso sob uma auxina (geralmente 2,4-D) ou outro regulador de crescimento (SANTOS, 2009).



**Figura 2** Ilustração da estrutura geral do gene *SERK* mostrando todos os domínios conservados. PS= peptídeo sinal, ZIP= zíper de leucina, LRR= repetições ricas em leucina, SPP= região rica em prolina, TM= domínio transmembrana, C= região terminal. Adaptado de Koehler (2010).

Receptores kinases são fundamentais nos vários processos do desenvolvimento vegetal, pois atuam nas rotas de transdução de sinais gerando respostas celulares a sinais externos. Os receptores kinases sofrem mudanças na conformação quando na presença de ligantes extracelulares, resultando na fosforilação de proteínas alvo intracelulares (BAUDINO et al., 2001; KOEHLER, 2010).

Alguns genes identificados apenas são expressos durante o processo de indução da embriogênese somática, enquanto outros têm sua expressão notada durante o processo de diferenciação do embrião até a finalização da planta (PEREIRA, 2010).

Dois grupos de genes envolvidos na aquisição de competência embriogênica foram identificados em *Arabidopsis*: (1) genes reguladores negativos, como o *Primordial Timing (PT)*, *Clavata (CLV)* e *Kinesin-like protein (PKL)* e (2) genes reguladores positivos, que estão associados ao aumento da competência embriogênica após expressão ectópica, sem aplicação externa de hormônios, como o *Agamous-Like 15 (AGL15)*, *Baby Boom (BBM)*, *Wuschel (WUS)*, *Leafy Cotyledon 1 e 2 (LEC1 e 2)* e *Somatic*

*Embryogenesis Receptor Kinase (SERK)* (PEREIRA, 2010; SCHMIDT et al., 1997).

Os genes *SERK*, *LEC1*, *AGL15*, *PKL* e *BBM* estão relacionados à embriogênese somática, mas apenas o gene *SERK* é específico das células embriogênicas (BOUTILIER et al., 2002; PEREIRA, 2010; SCHMIDT et al., 1997), enquanto o gene *BBM* quando superexpresso induz a formação espontânea de embriões somáticos em cotilédones de *Arabidopsis thaliana* transgênica (BOUTILIER et al., 2002; PEREIRA, 2010).

Boutilier et al. (2002) identificaram genes que são diferencialmente expressos durante a passagem de pólen para micrósporo derivados do desenvolvimento embrião. Um dos genes identificados, Baby Boom (*BBM*), codifica um fator de transcrição AP2/ERF específico de plantas, que está relacionado ao processo embriogênico e à proliferação celular em regiões meristemáticas e ao desenvolvimento de embriões e sementes. As proteínas AP2 estão relacionadas a processos embriogênicos, enquanto as ERF se relacionam a respostas contra estresses bióticos e abióticos.

*BBM* foi identificado e caracterizado através de uma biblioteca subtrativa em cultura embriogênica induzida a partir de micrósporos em *Brassica napus*. Sua expressão constitutiva promoveu a indução espontânea de embriões somáticos e estruturas cotiledonares nesta espécie (BOUTILIER et al., 2002; HEIDMANN et al., 2011).

Análises funcionais mostraram que o gene *BBM* ativa vias de transdução de sinais levando à indução do desenvolvimento do embrião a partir de células somáticas diferenciadas. Em *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus*, quando superexpresso, induz à formação espontânea de calos embriogênicos e de embriões somáticos, sem adição de qualquer regulador de crescimento. Portanto, é provável que o gene *BBM* seja um regulador chave do desenvolvimento embrionário em plantas (BOUTILIER et al., 2002; HEIDMANN et al., 2011).

Genes que codificam fatores de transcrição, componentes da biossíntese de hormônios e as vias de sinalização têm sido mostrados para

aumentar as respostas de regeneração das plantas quando mutadas ou ectopicamente expressas. Em tabaco, a expressão ectópica do BBM é suficiente para induzir brotações adventícias e regeneração de raízes em meio basal, mas citocinina exógena é necessária para formação de embriões somáticos (HEIDMANN et al., 2011).

Heidmann et al. (2011) examinaram se a influência positiva da expressão do gene *BBM* na regeneração de algumas espécies vegetais podia ser também transferida para a pimenta doce (*Capsicum annuum*) pela combinação de uma abordagem clássica da cultura de tecidos com a ativação transiente do gene *BnBBM*. Este gene foi usado como uma ferramenta para promover uma melhor regeneração de pimentas doce transformadas com *Agrobacterium*. Os autores obtiveram um protocolo de transformação confiável e eficiente para genótipos de pimenta doce, com aumento na resposta regenerativa, conferida pelo fator de transcrição AP2/ERF do gene *BBM*.

A expressão ectópica do BBM induz fenótipos pleiotrópicos tais como o crescimento e esterilidade que são susceptíveis de interferir com o processo de regeneração e subsequente crescimento de plantas transgênicas (BOUTILIER et al., 2002).

Dessa maneira, é visto que os genes *SERK* e *BBM* podem estar envolvidos no aumento da competência embriogênica durante a embriogênese somática.

## **2.8 Transformação Genética**

O melhoramento genético do café através da prática tradicional é lento devido à natureza perene da planta. A transformação genética tem um enorme potencial para o desenvolvimento de variedades de café melhoradas com características agronômicas desejadas, que são de outras formas difíceis de conseguir através do melhoramento tradicional. Durante as duas últimas décadas, um progresso significativo tem sido feito na área da biotecnologia

do café, em particular na área da tecnologia transgênica (MISHRA; SLATER, 2012).

As técnicas de biologia molecular e a geração de plantas transgênicas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, tolerantes a diferentes estresses ambientais e a toxicidade causada por metais, entre eles o alumínio. O melhoramento de plantas via engenharia genética depende da regulação espacial e temporal da expressão do gene de interesse, o que é feito basicamente pela região promotora utilizada na construção gênica (CARNEIRO et al., 2010).

A transformação genética de plantas vem se mostrando como uma tecnologia promissora para introdução de novas características em variedades comerciais. A tecnologia do DNA recombinante está em contínuo progresso, e novos conhecimentos são gerados constantemente. Até o presente, as variedades transgênicas comercialmente disponíveis têm sido portadoras de uma ou poucas construções gênicas em cada variedade. Por meio de retrocruzamentos ou transformação genética, as novas versões das variedades transgênicas acumularão vários transgenes. A presença de múltiplos transgenes em uma variedade deve ser avaliada com os mesmos critérios e rigores utilizados nos casos de variedades com uma única característica transgênica (BORÉM, 2002).

Para a expressão do transgene é necessário que ele possua estabilidade estrutural e de transcrição no genoma receptor. A recombinação homóloga é o principal mecanismo de integração gênica do DNA bacteriano em plantas. A inserção do T-DNA em locais aleatórios do genoma resulta em diferentes níveis de estabilidade e de expressão (BORÉM, 2002).

Os métodos de transferência de genes podem variar em eficiência e aplicabilidade, dependendo da espécie e/ou do tecido alvo da transformação (ROCHA, 2011).

O processo de transformação genética requer o desenvolvimento de uma fonte celular totipotente que serve como hospedeira para o DNA

exógeno, um vetor de entrega do DNA à célula alvo e um sistema capaz de selecionar e caracterizar as células transformadas (PEREIRA, 2010).

O sucesso do processo de transformação depende da inserção do DNA em células ou tecidos vegetais aptos a regenerarem plantas completas. Um dos fatores limitantes na transformação genética tem sido a baixa eficiência das técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro*. Aliado a isso, em muitas situações, a esterilidade total ou parcial das plantas transgênicas obtidas pode consistir em uma barreira para a finalização desse processo. Portanto, para iniciar os trabalhos de transformação, os aspectos relacionados à regeneração de plantas, através da cultura de tecidos, devem ser completamente elucidados (ROCHA, 2011).

Com o uso das técnicas de engenharia genética para inserção de genes de interesse agrônômico, facilita o desenvolvimento de novas variedades de interesse comercial. Muitas espécies vegetais transgênicas estão sendo agora liberadas para produção comercial, em vista do aumento significativo no desenvolvimento das tecnologias de transformação genética de plantas. Esse aumento é devido ao aperfeiçoamento das metodologias, como métodos indiretos, mediado por *Agrobacterium* ou por métodos diretos, como a biobalística (bombardeamento de partículas), que em associação com técnicas de cultura *in vitro* regeneram uma planta transformada a partir de células ou tecidos (ARAGÃO, 2002).

### 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A biotecnologia oferece contribuição tecnológica para o desenvolvimento sustentável no atual contexto técnico-científico do país, proporcionando benefícios mensuráveis aos utilizadores dessas biotecnologias.

O estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas a partir de calos embriogênicos em *Coffea*, tem mostrado variação intraespecífica, principalmente devido à necessidade e ao tipo de reguladores de crescimento.

Dessa forma, o uso de marcadores moleculares entre eles o *SERK* e *BBM*, tem mostrado ser de extrema importância não só para a otimização de protocolos visando à aquisição e manutenção de suspensões celulares embriogênicas, como também possibilita novos parâmetros para análise do potencial embriogênico de materiais sob desenvolvimento, possivelmente extensível para outras cultivares de *C. arabica*.

## REFERÊNCIAS

ALBRECHT, C. et al. Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 148, n. 1, p. 611-619, Sept. 2008.

ALMEIDA, J. A. S. de et al. Embriogênese somática em genótipos de *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 143-151, jul./dez. 2008.

ARAGÃO, F. J. L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotics stress tolerance. **JIRCAS Working Reports**, Tsukuba, n. 23, p. 35-42, 2002.

BAUDINO, S. et al. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 1, p. 1-10, May 2001.

BORÉM, A. **Escape gênico & transgênicos**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 201 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, T. C. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. v. 1, 374 p.

BOUTILIER, K. et al. Ecotopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, Aug. 2002.

CARNEIRO, A. A. et al. **Ativação do promotor AtPT2 de Arabidopsis thaliana sob estresse de fósforo em plantas transgênicas de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2010. 15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 331-354.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **1ª estimativa**. Brasília, 2011. Disponível em: <[http://www.abic.com.br/estat\\_pagricola.html](http://www.abic.com.br/estat_pagricola.html)>. Acesso em: 30 out. 2011.

ETIENNE, H. et al. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.): review. **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant**, Wallingford, v. 38, n. 2, p. 129-138, Mar./Apr. 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 74, n. 2, p. 201-228, Apr. 2003.

FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

FIGUEIREDO, S. A. **Caracterização bioquímica e molecular da  $\beta$ -galactosidase durante a maturação de frutos de *Coffea arabica*.** 2011. 244 f. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 1992-2001, set. 2007.

GALLO, L. A.; CROCOMO, O. G. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIN FILLHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 494-506.

GATICA-ARIAS, A. M.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; ESQUIVEL, A. M. E. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 1, p. 1-12, Jan. 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture.** 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 501 p.

GEORGET, F. et al. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 8, p. 748-754, July 2000.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de biotecnologia.** Florianópolis: CCA/UFSC, 2006. 41 p. Apostila.

GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, L. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA, 1999. v. 2, p. 533-568.

HECHT, V. et al. The *Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 127, n. 3, p. 803-816, Nov. 2001.

HEIDMANN, I. et al. Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 6, p. 1107-1115, June 2011.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **ICO annual review 2010**. Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em: 6 fev. 2013.

JULIATTI, F. C.; SILVA, S. A. D. **Antracnose - *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. e outras espécies: manejo integrado de doenças na cafeicultura do cerrado**. Uberlândia: UFU, 2001. 50 p.

KOEHLER, A. D. **Reprodução em *Brachiaria* spp.: *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase)** no desenvolvimento da antera, do ovário e na embriogênese. 2010. 110 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

KUMAR, V.; NAIDU, M. M.; RAVISHANKAR, G. A. Developments in coffee biotechnology: *in vitro* plant propagation and crop improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, n. 1, p. 49-65, Oct. 2006.

LIMA, E. C. et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan./fev. 2008.

LOW, E. L. et al. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 62, p. 1-19, 2008.

LOYOLA-VARGAS, V.; VÁQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. 2<sup>nd</sup> ed. Totowa: Humana, 2006. 416 p.

MACIEL, A. L. R. et al. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. Cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116, jan./fev. 2003.

MATSUMOTO, K. et al. Criopreservação e embriogênese somática de calos de *Dimocarpus longan*. Notas científicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 12, p. 1261-1263, dez. 2004.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of coffee. **Biotechnology Research International**, Cairo, v. 2012, p. 1-17, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C. **Caracterização de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.)**. 2006. 41 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 48-50, jul. 2007.

\_\_\_\_\_. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; ROSE, R. J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago trunculata* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 1, p. 218-230, Sept. 2003.

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

PEREIRA, D. A. **Caracterização e expressão do gene *SERK* durante a indução de embriogênese somática em soja**. 2010. 61 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, n. 3, p. 285-301, Sept. 2006.

ROCHA, F. **Avaliação de resistência à alumínio em *Brachiaria brizantha* transformada com o gene *neMDH***. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável) - Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2011.

ROCHA, S. C. da; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla king*) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 91-101, 2004.

SAMSON, N. P. et al. Effect of primary culture medium composition on high frequency embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 37-45, 2006.

SANTA-CATARINA, C. et al. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 53-61, Oct. 2004.

SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. Cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, jan./mar. 2008.

\_\_\_\_\_. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, maio/jun. 2003.

SANTOS, M. O.; ARAGÃO, F. J. L. Role of SERK genes in plant environmental response. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 4, n. 12, p. 1111-1113, Dec. 2009.

SCHMIDT, E. D. et al. A leucinerich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, May 1997.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 833-840, jul./ago. 2000.

SILVA, A. T. **Análise da expressão dos genes baby boom (BBM) e somatic embryogenesis receptor kinase (SERK) envolvidos na embriogênese somática do cafeeiro**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici pequeno**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SIMÕES-COSTA, M. C. et al. Effect of mineral salts, vitamins and gelling agents on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. 'catuai'. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 33, n. 2, p. 192-200, 2010.

SOMLEVA, M. N.; SCMIDT, E. D. L.; VRIES, S. C. de. Embryogenic cells in *Dactylis glomeranta* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 19, n. 7, p. 718-726, June 2000.

STARITSKY, G. Embryoid formation in callus culture tissue of *Coffea*. **Acta Botanica Neerlandica**, Wageningen, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.

STEIN, V. C. et al. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 53, n. 2, p. 159-163, jul./dez. 2010.

THOMAS, C. et al. Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 42, n. 1, p. 35-42, Jan. 2004.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v. 1, 354 p.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 128 p.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, p. 443-462, 1986.

**Capítulo 2** Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares tardias de *Coffea arabica* cv. Bourbon através de análises morfológicas e ultraestruturais

## RESUMO

A importância do estabelecimento, durante o cultivo *in vitro*, da curva de crescimento, está na identificação das fases nas quais ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do crescimento do material vegetal. Análises histológicas e ultraestruturais mostram-se eficientes na compreensão, otimização e validação de protocolos de propagação *in vitro*, pois permitem de forma rápida e clara a identificação das características embriogênicas. Objetivou-se neste trabalho, relacionar a estrutura morfológica e ultraestrutural de ECSs de *Coffea arabica* cv. Bourbon com seu potencial embriogênico, através da curva de crescimento. A cada quatro dias, durante 28 dias, quatro erlenmeyers foram escolhidos aleatoriamente e todos os glomérulos celulares da suspensão foram vertidos para um tubo graduado, no qual foram decantados durante 10 minutos antes da leitura do volume e calculados o crescimento (CR) e a taxa de crescimento (TCR) das suspensões. Das ECS, cujo volume foi medido, foram coletadas amostras para realizar análises histológicas e ultraestruturais. No período analisado, a curva de crescimento apresentou três fases distintas: lag, exponencial e desaceleração. Os procedimentos de subcultivos deverão ocorrer ao final da fase exponencial ou no início da fase de desaceleração, bem como a renovação do meio de cultivo. Devido à idade avançada do material, o crescimento não contínuo das suspensões ao longo da curva reflete a qualidade das mesmas. Dois tipos celulares foram encontrados: Tipo 1, apresentou características altamente embriogênicas: células pequenas com citoplasma denso, ausência de grandes vacúolos, núcleo grande e nucléolos proeminentes e presença de grãos de amido; Tipo 2, apresentou células grandes, dispersas, vacuoladas, com ausência de núcleos, pouca ou nenhuma presença de grãos de amido; representando materiais não embriogênicos. A análise feita por MEV mostrou aos quatro dias a presença de células arredondadas e isodiamétricas, formando os aglomerados celulares e menor frequência de células murchas e rompidas, além da presença de células em divisão. Aos 28 dias, notou-se a presença de células assimétricas, murchas e rompidas, provavelmente devido à morte celular. As análises através da MET permitiram visualizar na coleta 1, células com núcleo e nucléolo proeminente, alta razão núcleo/citoplasma, abundante presença de amiloplastídeos e parede celular com pequenos espaços intercelulares. Na coleta 7, grande presença de vacúolos, ocupando quase que totalmente o citoplasma, grandes espaços intercelulares e ausência de conteúdo celular. As análises histológicas e ultraestruturais possibilitaram identificar a morfologia e organização celular das ECS de café, permitindo comparar as diferenças entre os tempos de coleta.

Palavras-chave: Curva de crescimento. ECS. Morfologia celular. Aspectos ultraestruturais. Potencial embriogênico.

## ABSTRACT

The importance of establishing the growth curve during the *in vitro* cultivation is in identifying the phases in which the fundamental processes to the kinetic study of plant material growth occur. Histological and ultra-structural analyses show to be efficient in the comprehension, optimization and validation of *in vitro* propagation protocols for they allow, in a quick and clear manner, the identification of embryogenic characteristics. This work aimed at relating *Coffea arabica* cv. Bourbon SCE morphological and ultra-structural structures with its embryogenic potential through the growth curve. Every 4 days, during 28 days, 4 erlenmeyer flasks were randomly chosen and all the cellular clusters of the suspension were transferred to a graduated tube, in which they were decanted for 10 minutes before the volume was read and the growth (GR) and growth rate (GRR) were calculated. Of the SCE, which had their volume measured, samples were collected to perform morphological and ultra-structural analyses. In the analyzed period, the growth curve presented three distinct phases: lag, exponential and deceleration. The sub-cultivation procedures, as well as the renovation of the cultivating medium, must occur at the end of the exponential phase or at the beginning of the deceleration phase. Due to the advanced age of the material, the non-continuous growth of the suspensions along the curve, reflect the quality of the same. Two cell types were found: Type 1 – presented highly embryogenic characteristics, such as small cells with dense cytoplasm, absence of large vacuoles, large nucleus and prominent nucleolus and the presence of amid starch grain; Type 2 – presented large, disperse cells, with the presence of vacuoles, absence of nucleus, little or no starch grain, representing non-embryogenic material. Analyses by scanning electronic microscopy of samples with 4 days showed the presence of rounded and isodiametric cells, forming the cell agglomerates, and the smaller frequency of wilted or ruptured cells, in addition to the presence of dividing cells. At 28 days, the presence of asymmetric, wilted and ruptured cells, probably due to cellular death, was observed. The analyses through transmission electronic microscopy allowed the visualization, on the first sampling, of cells with prominent nucleus and nucleolus, high nucleus/cytoplasm ratio, abundant presence of amyloplasts and cellular wall with small intercellular spaces. In sampling 7, a large presence of vacuoles, occupying almost the entirety of the cytoplasm, large intercellular spaces and the absence of cellular content was observed. Histological and ultra-structural analyses allowed the identification of coffee SCE morphology and cellular organization, enabling the comparison of the differences between the sampling times.

Keywords: Growth curve. SCE. Cellular morphology. Ultra-structural aspects. Embryogenic potential.

## **1. Introdução**

A embriogênese somática tem sido estudada em um grande número de famílias e espécies vegetais tanto para estudos básicos de fisiologia vegetal quanto em aplicações mais práticas, como micropropagação e transformação genética. Suas aplicações, potencialmente importantes para a multiplicação acelerada de plantas de café, foram rapidamente notadas nos primeiros estudos, e técnicas diversas que simplificam esse processo foram desenvolvidas visando produzir em larga escala mudas vegetais e reduzir custos de produção.

Na embriogênese somática indireta, os embriões se desenvolvem a partir de células de calos, provenientes da dediferenciação de células do explante. Esta depende do uso de reguladores de crescimento sintéticos (auxinas) para induzir a dediferenciação dos tecidos e a formação de tecidos embriogênicos (calos). Os calos fornecem o material inicial para o desenvolvimento de suspensões celulares embriogênicas (ECS). A partir dessas suspensões, embriões são produzidos e plantas são regeneradas.

Um calo típico iniciado de um explante passa por três estágios de desenvolvimento, que compreende a indução da divisão celular, um período de divisão celular ativa e um período no qual a divisão celular é reduzida ou mesmo cessada. Esses estágios podem ser acompanhados numa curva de crescimento caracterizada por fases distintas. A curva de crescimento de calos ou suspensão celular é calculada com o objetivo de se obter a época de repicagem (subcultura), para determinar onde há a maior produção de metabólitos (quando o estudo objetiva o metabolismo secundário). O crescimento celular baseia-se nas mudanças das taxas de divisão das distintas fases.

Uma vez havendo a necessidade de determinar a qualidade das ECS e/ou calos embriogênicos, as análises de microscopia fotônica e ultraestrutural do material vegetal podem determinar se as características

citológicas e morfológicas são relacionadas com a capacidade embriogênica.

Objetivou-se neste trabalho, avaliar e relacionar a estrutura morfológica e ultraestrutural de ECSs de *Coffea arabica* cv. Bourbon com seu potencial embriogênico, através de uma curva de crescimento.

Dessa maneira, com as condições de cultura otimizadas, a produção de calo embriogênico ganha destaque e, conseqüentemente, suspensões celulares embriogênicas, permitindo, também, a seleção precoce desses materiais, reduzindo, assim, custo, tempo e trabalho envolvidos nesse processo, proporcionando benefícios nas técnicas de transformação genética.

## 2. Material e métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

O material vegetal foi composto por suspensões celulares embriogênicas (ECS) de *Coffea arabica* cv Bourbon de 10 meses de idade (Figura 1), obtidas através do protocolo de calogênese desenvolvido por Teixeira et al. (2004) (Anexos 1, 2 e 3). O meio de cultura das ECS era renovado quinzenalmente.

A escolha do material se baseia no trabalho de Ribas et al. (2011), no qual calos embriogênicos de café da cultivar Caturra de 9 meses de idade apresentaram melhores resultados na transformação por *Agrobacterium tumefaciens*.



**Figura 1** Suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Bourbon, inoculadas em meio MM suplementado com 500 mg/L de ácido cítrico.

### 2.1 Curva de crescimento das ECS

Uma curva de crescimento foi obtida para determinar a faixa de tempo em que a suspensão crescia sob taxa exponencial e o momento certo

de ser feito a repicagem das mesmas. No procedimento, ECS foram inoculadas simultaneamente em 30 erlenmeyers de 50 mL, em volume celular sedimentado (VCS) de 1 mL de ECS para 15 mL de meio MM líquido e multiplicadas sob condições de escuro, a 100 rpm em temperatura ambiente.

A cada quatro dias, durante 28 dias, quatro erlenmeyers foram escolhidos aleatoriamente e todo o volume da suspensão correspondente a cada erlenmeyer foi vertido para um tubo graduado, no qual os glomérulos celulares decantaram por 10 minutos antes da leitura do VCS. Com as medidas de volume, foram calculados o crescimento (CR) e a taxa de crescimento (TCR) das suspensões por meio das respectivas equações:  $CR (\%) = [(VCS_{final} - VCS_{inicial}) \times 100] \div VCS_{final}$  e  $TCR (\text{médio}) = (\ln VCS_{final} - \ln VCS_{inicial}) \div t$  (TEIXEIRA et al., 2004), onde  $\ln$  = algoritmo neperiano e  $t$  = período de cultivo. De acordo com os resultados, foi obtida a média de crescimento entre os quatro erlenmeyers.

A curva de crescimento foi obtida a partir da média das quatro repetições em cada tempo de coleta.

O tempo de coleta se encerra aos 28 dias baseado no trabalho de Silva (2011), pertencente a uma linha de pesquisa do Grupo Café do Laboratório Central de Biologia Molecular / UFLA. O autor obteve a curva de crescimento de ECS de *C. arabica* cv. Catiguá durante 60 dias com intervalos de coletas de 10 em 10 dias e renovação do meio nutritivo, com estabilização da TCR aos 30 dias.

## **2.2 Análises histológicas e ultraestruturais**

Com o intuito de relacionar a curva de crescimento da ECS, sua estrutura e característica celular com seu potencial embriogênico, a cada quatro dias foram coletadas amostras para realizar análises histológicas e ultraestruturais.

Para a microscopia fotônica, as amostras foram coletadas de quatro em quatro dias totalizando oito amostras: T0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28. Foram fixadas em FAA 50% (10% de solução de formaldeído a 40% + 5% de ácido acético glacial + 50% de álcool etílico, v/v) por 48 horas sob temperatura ambiente e depois desidratadas em série etílica 70, 80, 90 e 100% por 1 hora em cada, repetindo a série etílica de 100% mais uma vez. Posteriormente, as amostras foram infiltradas durante 24 horas com solução 1:1 de resina epoxi (Historesin® Leica) e etanol e depois 24 horas em resina pura. Após infiltração, as amostras foram emblocadas na proporção 15:1 de resina e polimerizador. As amostras ficaram na estufa a 37°C por três dias. Cortes com espessuras de 3 µm foram feitos em micrótomo (Easypath EP-31-20091), corados com solução de azul de toluidina a 0,05%, e solução fraca de lugol, e visualizados em microscópio de luz (Zeiss, Axio Scope).

Para a microscopia de varredura, as amostras representando duas coletas (aos quatro e 28 dias de cultivo) foram imersas em solução fixadora de Karnovisk durante 24 h, lavadas em tampão de cacodilato e pós-fixados durante 1 hora numa solução de 1% de tetróxido de ósmio à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e, em seguida, desidratadas em acetona. Foram montadas em stubs para metalização e cobertas com ouro. A visualização foi feita em microscópio eletrônico LEO Evo 40.

Para a microscopia de transmissão, as amostras representando duas coletas (aos quatro e 28 dias de cultivo) foram fixadas em Karnovsky modificado, [(Glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%)] em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,0 durante 24 horas, a 4°C. Posteriormente, as amostras foram colocadas em glicerol 30% trocando três vezes permanecendo 10 minutos em cada. Os fragmentos foram lavados três vezes (10 minutos) em tampão cacodilato 0,05 M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. Em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%) por 10 minutos cada e em 100% duas vezes por 10 minutos. Após desidratação em acetona, foi

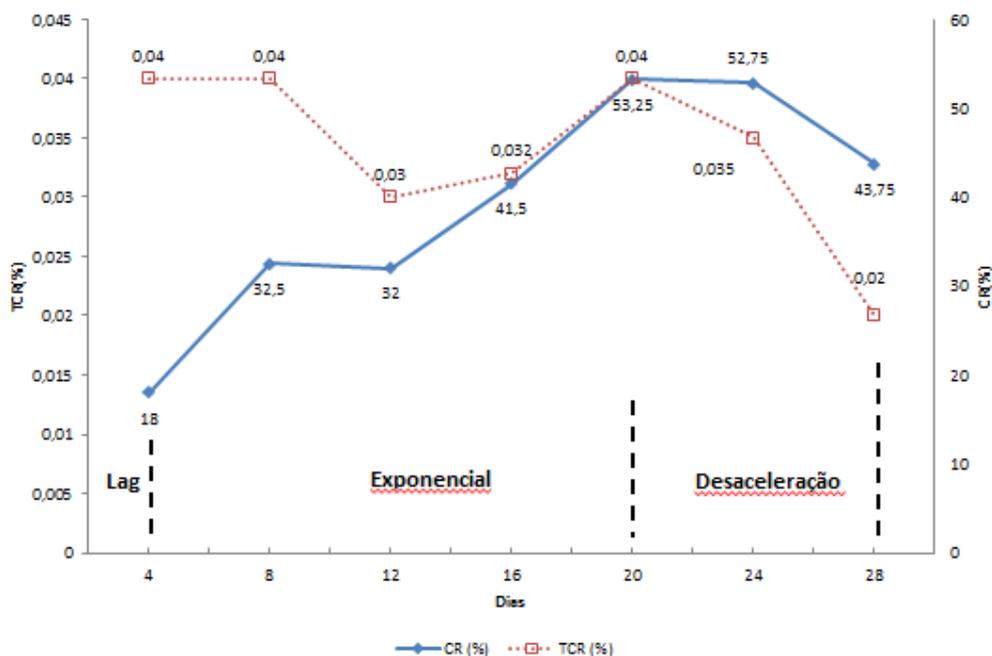
realizada inclusão em resina inicialmente a 30% por 8 h e, em seguida, resina 70%. Após 12 h, as amostras passaram duas vezes por resina 100% por 24 h cada vez, sendo o material colocado em molde adequado e conduzido para polimerização em estufa a 70°C por 48 h. Posteriormente, os blocos foram acertados em forma de trapézio de 1 mm de cada lado com auxílio de lâmina. Foram realizados cortes semifinos para identificação do material, e depois por meio do ultramicrotomo, as seções ultrafinas foram conduzidas para telas e contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. A observação das amostras foi realizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 109.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1 Curva de crescimento das ECS**

No período analisado (28 dias de cultivo), a curva de crescimento de suspensões celulares de *C. arabica* cv. Bourbon apresentou três fases distintas: lag (0 a 4 dias), exponencial (4 a 20 dias) e desaceleração (20 a 28 dias) (Figura 2). Não houve a renovação do meio de cultura durante as coletas, analisando dessa forma o crescimento natural das suspensões celulares.

A importância de se ter estabelecido a curva de crescimento de suspensões celulares com 10 meses de idade está na identificação das fases em que ocorrem os processos cinéticos fundamentais, nas condições em que se encontrava o material vegetal, permitindo analisar o potencial embriogênico do mesmo e sua correta manipulação.



**Figura 2** Curva de crescimento (CR% e TCR%) de suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Bourbon baseada no volume de células sedimentadas (VCS). Volumes (mL) obtidos por média simples de quatro repetições de cada tempo de coleta (4 a 28 dias).

As suspensões celulares de *C. arabica* cv. Bourbon apresentaram crescimento (CR) constante durante os 20 dias, com a taxa percentual de crescimento constante até o 8º dia. A TCR acompanhou o CR em todos os pontos da curva de crescimento. A TCR começou seu declínio no 8º dia, acompanhando o declínio do CR (Figura 2). Sugere-se que o declínio ao 20º dia ocorreu pela depleção de nutrientes no meio de cultura indicando, dessa forma, que a renovação do meio deve ocorrer neste período ou antes de iniciar a desaceleração, evitando um estresse acentuado às células.

Estudos correlatos desenvolvidos por Silva (2011), no qual foi estudado a curva de crescimento de células em suspensão de *C. arabica* cv. Catiguá, durante 60 dias, com intervalos de coletas de 10 em 10 dias e renovação de 1/6 do meio nutritivo, observou-se que a partir dos 30 dias até

os 40 dias houve estabilização da TCR e posterior declínio aos 50 dias, sugerindo que a renovação de 1/6 do volume do meio nutritivo não foi suficiente para suprir a crescente necessidade nutricional dada pelo CR constante.

Apesar da cultivar estudada neste trabalho ter sido diferente, os resultados obtidos por Silva (2011) reforçam a ideia de que a renovação do meio nutritivo a partir dos 20 dias de cultivo, ou uma renovação do meio de cultura superior a 1/6 do volume são indicados para manter a viabilidade de ECS de café.

A curva de crescimento de cultura de células em suspensão de algodoeiro descrita por Celedón, Kobayashi e Vieira (2000) apresenta a fase lag praticamente inexistente, e em torno do 25º dia observa-se a desaceleração do crescimento celular e início da fase estacionária.

Em *Cordia verbenacea* DC., a curva de crescimento de cultura de células em suspensão apresentou cinco fases de crescimento: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. O maior percentual de crescimento (37%) ocorreu no período exponencial entre o quarto e o décimo segundo dia e o menor (3%) na fase lag até o quarto dia (AMEIRA et al., 2009).

Em suspensões celulares de bananeira cv. Prata-Anã, a curva de crescimento apresentou crescimento significativo em função dos subcultivos. A medida do volume foi feita em VCS, e o crescimento contínuo da suspensão refletiu a qualidade do material vegetal (LIMA, 2009).

De acordo com a Figura 2, a fase lag, na qual células preparam-se para a divisão celular, acumulando biomassa, ocorreu até o 4º dia de cultivo, apresentado crescimento de 18% e taxa de crescimento de 0,04%. Essa fase teve duração pequena provavelmente devido à metodologia utilizada para a montagem da curva de crescimento, pois as culturas já se encontravam em crescimento quando da sua utilização, como observado por Celedón, Kobayashi e Vieira (2000).

Vários estudos têm demonstrado que o período da fase lag varia de acordo com a espécie e material estudado. Landa et al. (2000) verificaram que para calos obtidos a partir de segmentos foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb), a fase lag ocorre até o 7º dia de cultivo. Mezzetti, Conte e Rosati (1991), no entanto, observaram a ocorrência dessa fase até o 30º dia após a inoculação de segmentos foliares de kiwi (*Actinidia deliciosa*). Santos et al. (2008) identificaram a fase lag até o 28º de cultivo, equivalente a 39% do crescimento para explantes nodais e foliares de *Coffea canephora* cv. Apoatã. Stein et al. (2010b) identificaram a fase lag até o 40º dia de cultivo de calos originados de explantes foliares de ingazeiro.

A fase de crescimento exponencial, período em que ocorre máxima divisão celular, ocorreu do 4º ao 20º dia de cultivo, apresentando o maior CR das suspensões celulares embriogênicas: 35,25% (média obtida entre os cinco tempos de coletas); para a TCR o valor foi de 0,04%. É importante ressaltar que houve um pequeno declínio do crescimento de 0,5% entre os dias 8 e 12. Pela pequena diferença, possivelmente por erro durante a pesagem e/ou pela diferença discrepante entre as repetições, esse declínio não foi contabilizado.

Por corresponder à fase de maior crescimento das ECS, sugere-se a repicagem e renovação do meio ao final dessa fase, antes de iniciar o declínio do crescimento.

A fase de desaceleração, em que a divisão celular diminui e ocorre a expansão da célula, foi observada entre o 20º e o 28º dia de cultivo. Nessa fase também pode proceder com a repicagem das suspensões celulares embriogênicas, indicada por alguns autores como uma fase ideal para a repicagem do material (NOGUEIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; SMITH, 1992) devido à redução de nutrientes, secagem do ágar (quando em meio sólido) e acúmulo de substâncias tóxicas. Assim, a repicagem do material para um novo meio de cultura deve ser feita no início da fase de desaceleração.

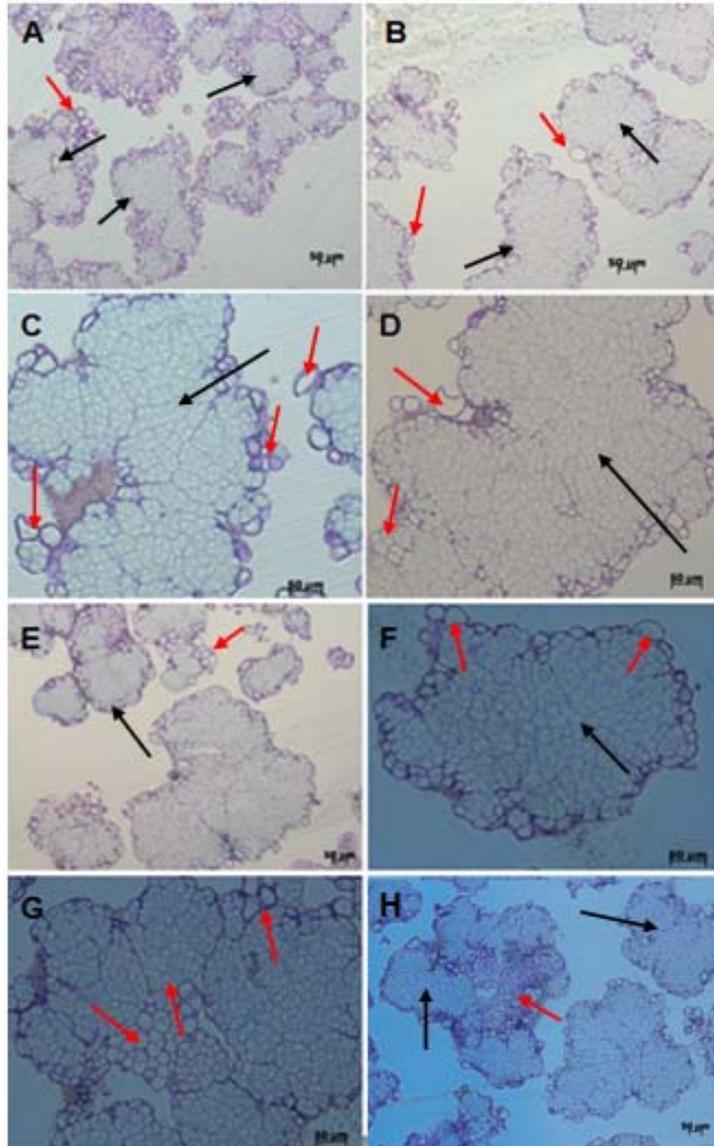
Os resultados obtidos com a curva de crescimento de suspensões celulares embriogênicas de explantes foliares de *Coffea arabica* cv Bourbon com idade de 10 meses indicam que os procedimentos de subcultivos para manutenção e multiplicação das ECSs podem ocorrer ao final da fase exponencial, ou início da fase de desaceleração, bem como a renovação do meio de cultivo. Teixeira et al. (2004) sugerem a renovação dos nutrientes aos 14 dias de cultivo para suspensões celulares de *Coffea arabica*.

Devido à idade avançada do material, o crescimento não contínuo das suspensões ao longo da curva refletiu a qualidade das mesmas.

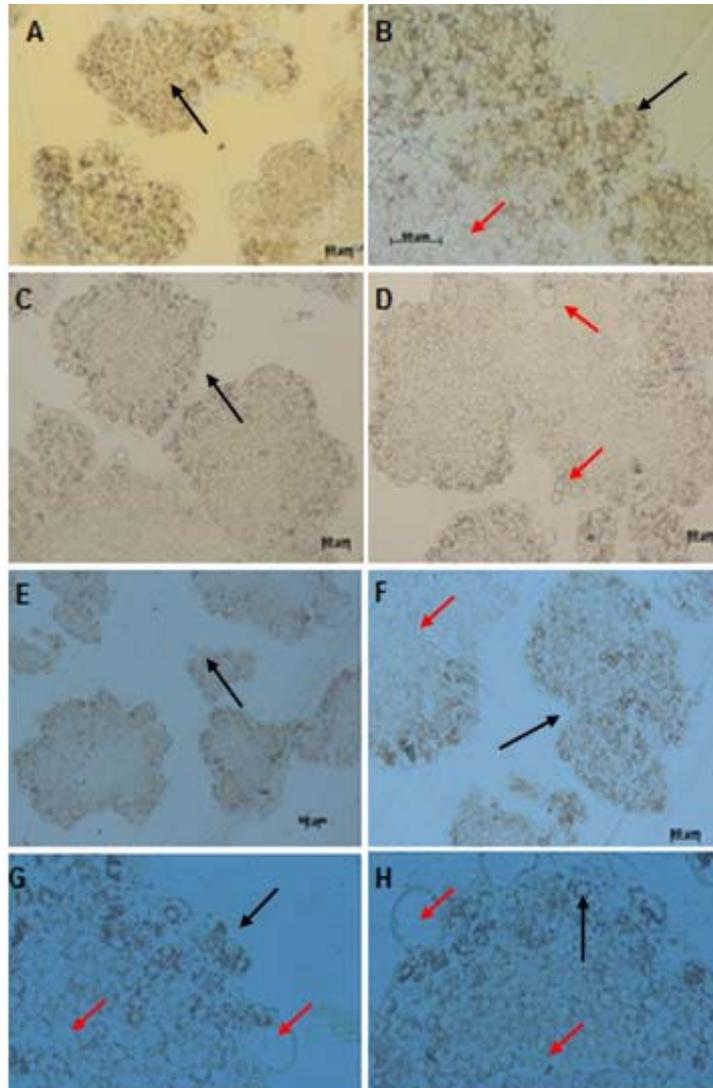
### **3.2 Análises Histológicas**

#### **3.2.1 Microscopia Fotônica**

As células embriogênicas possuem características semelhantes às células meristemáticas em divisão ativa: tamanho pequeno, isodiamétricas, citoplasma denso, núcleos grandes e nucléolos evidentes, pequenos vacúolos e presença expressiva de grãos de amido (CARVALHO; GONZÁLEZ-BENITO; PEREZ, 2001; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Essas características sugerem intensa síntese de RNA e atividade metabólica (STEIN et al., 2010a). No presente estudo, essas características foram observadas em todas as coletas e com maior frequência nas amostras T0, 1 aos 4 dias, 2 aos 8 dias, 3 aos 12 dias, 4 aos 16 dias e 5 aos 20 dias (Figura 3 e 4).

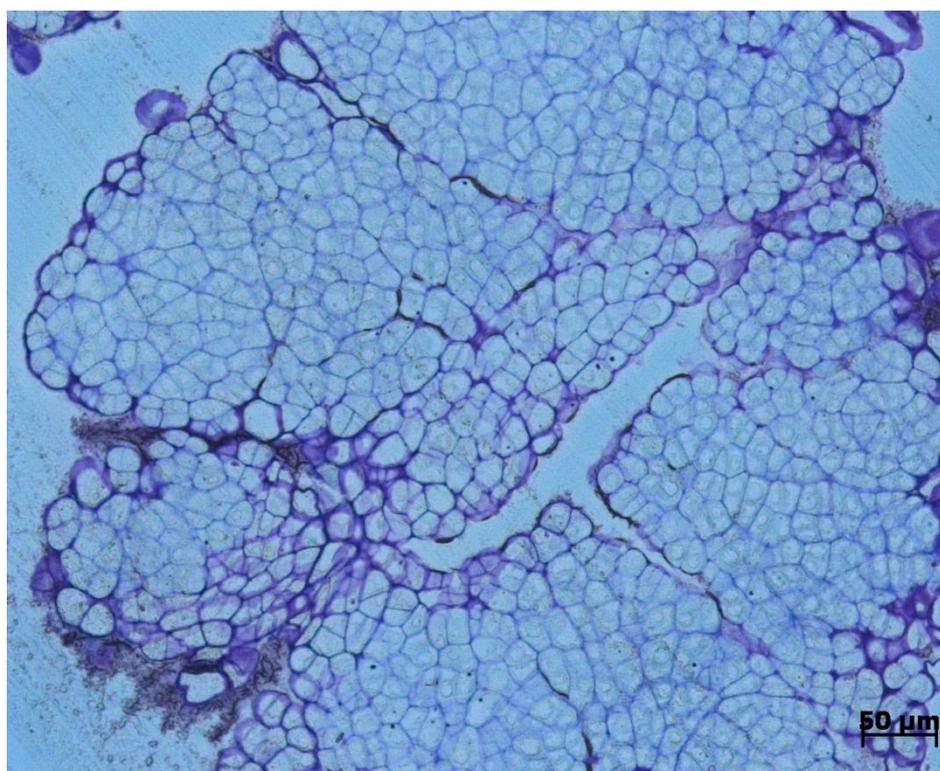


**Figura 3** Fotomicrografia de suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Bourbon com idade de 10 meses. Material embriogênico indicado por **setas pretas** e não embriogênico por **setas vermelhas**. **A)** Coleta To, anterior a Curva de Crescimento; **B)** Coleta 1 aos 4 dias; **C)** Coleta 2 aos 8 dias; **D)** Coleta 3 aos 12 dias; **E)** Coleta 4 aos 16 dias; **F)** Coleta 5 aos 20 dias; **G)** Coleta 6 aos 24 dias; **H)** Coleta 7 aos 28 dias. Material corado com Azul de Toluidina.

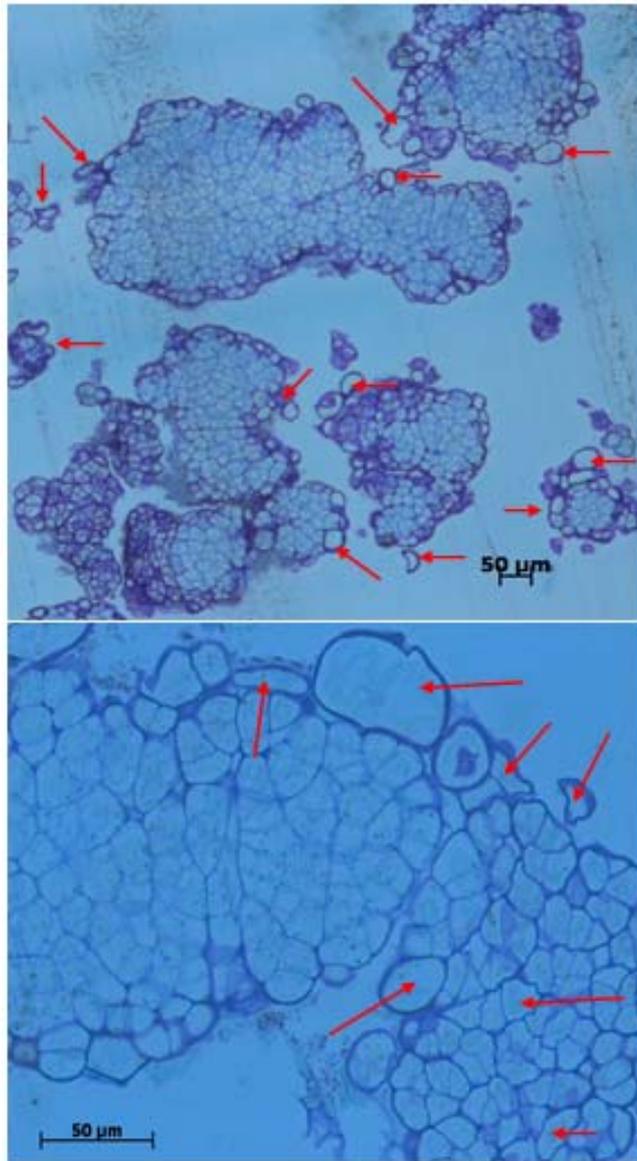


**Figura 4** Fotomicrografia da reserva energética em suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Bourbon com idade de 10 meses identificada pela presença de grãos de amido. Material embriogênico indicado por **setas pretas** e não embriogênico por **setas vermelhas**. **A)** Coleta To, anterior a Curva de Crescimento; **B)** Coleta 1 aos 4 dias; **C)** Coleta 2 aos 8 dias; **D)** Coleta 3 aos 12 dias; **E)** Coleta 4 aos 16 dias; **F)** Coleta 5 aos 20 dias; **G)** Coleta 6 aos 24 dias; **H)** Coleta 7 aos 28 dias. Material corado com Lugol.

De acordo com George, Hall e Klerk (2008), estas células embriogênicas possuem divisões celulares contínuas que resultam na formação de massas de células embriogênicas, chamadas de aglomerados embriogênicos (PEM's ou MPE). Divisões celulares foram observadas em todas as coletas, sendo menos visualizada na coleta 6 e 7 (Figura 5). Material não embriogênico apresentou em maior parte células grandes, alongadas, vacuoladas, provavelmente em processo de morte celular (Figura 6). Esses resultados obtidos se assemelham aos de Carvalho, González-Benito e Perez (2001) na calogênese de algodão; Figueiredo (2007) na calogênese de maracujá; Silva (2009) na calogênese de murici-pequeno e Silva (2011) na calogênese e suspensões celulares embriogênicas de *C. arabica* cv. Catiguá.

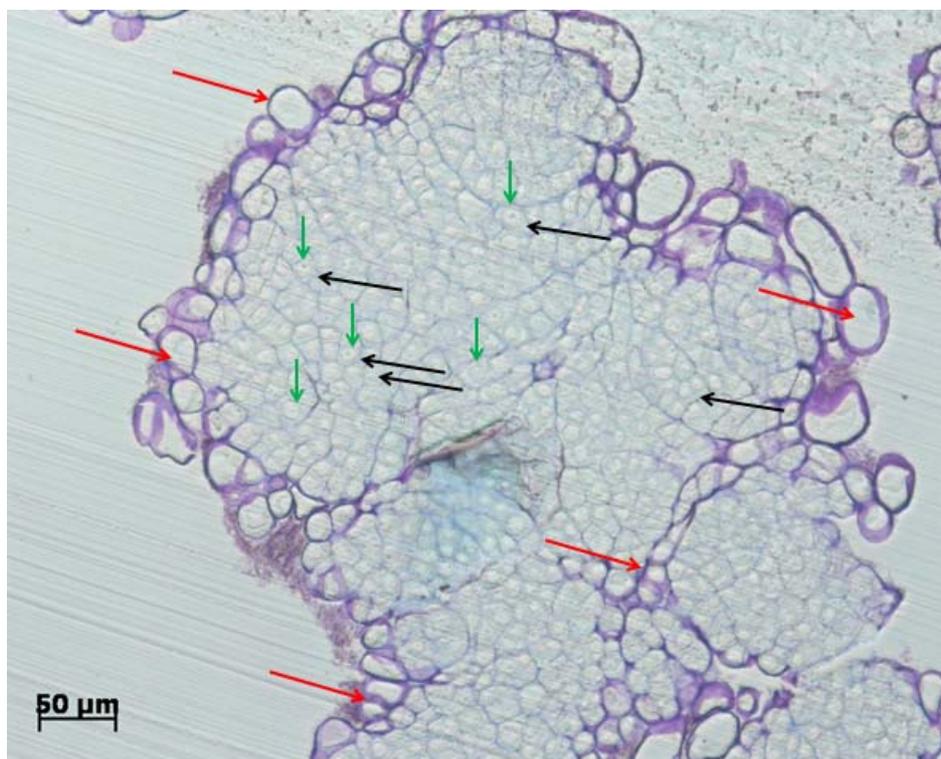


**Figura 5** Divisão celular e núcleos proeminentes em suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Bourbon com idade de 10 meses.



**Figura 6** Material não embriogênico indicado por setas vermelhas. Este tipo celular ocorreu com maior frequência aos 24 e 28 dias, respectivamente nas coletas 6 e 7.

Em relação ao diâmetro celular e nuclear, células embriogênicas apresentaram de 8 a 24  $\mu\text{m}$  de diâmetro celular e de 7 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro nuclear, reafirmando a morfologia de núcleos grandes. Para as células não embriogênicas, foi observado diâmetro celular de 36 a 97  $\mu\text{m}$  (Figura 7). Bartos et al. (2011) encontraram resultados próximos para cortes histológicos de *C. arabica* cv. Catuaí vermelho, sendo para as células embriogênicas 15 a 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro celular e para as células não embriogênicas 39 a 48  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Estudos com *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo mostraram células pequenas e isodiamétricas, com diâmetros entre 15 a 20  $\mu\text{m}$  (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002).



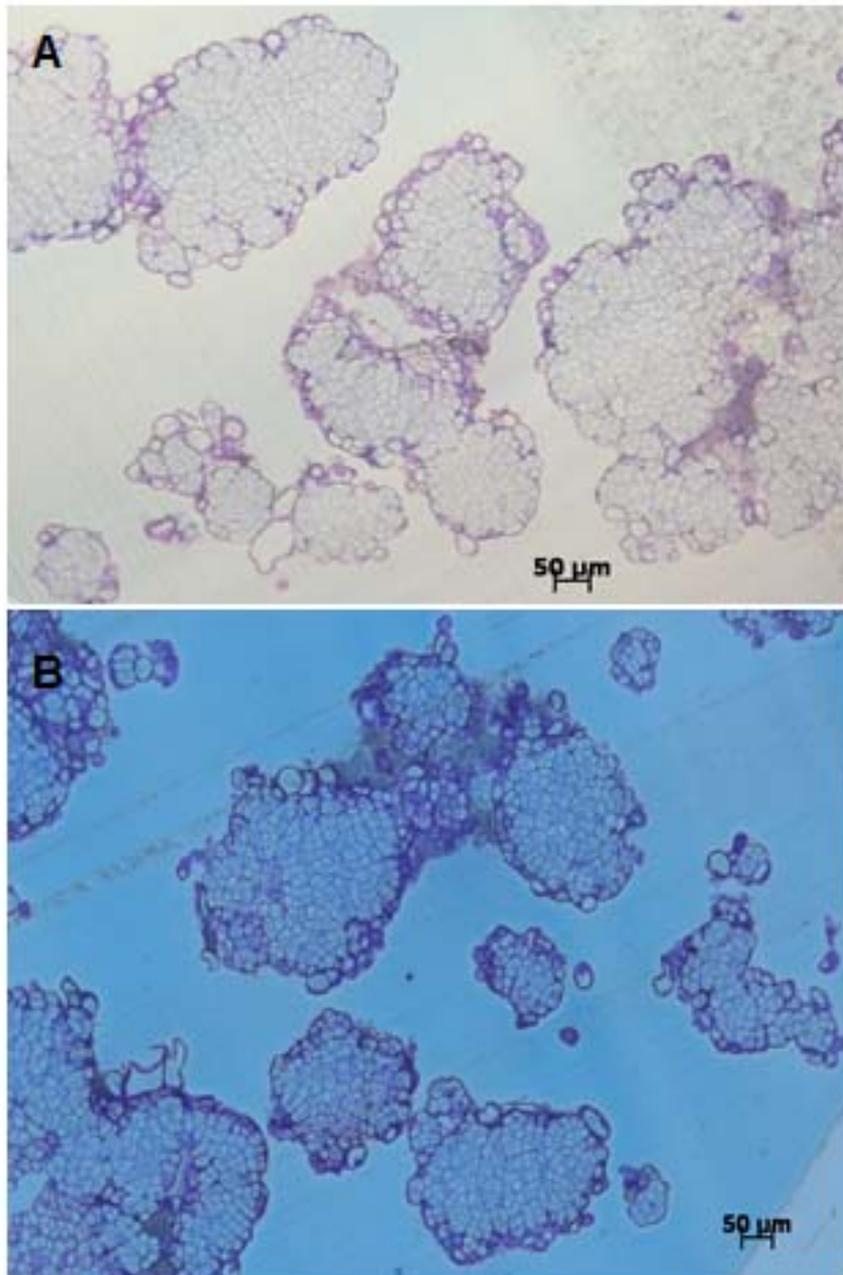
**Figura 7** Fotomicrografia de células embriogênicas e não embriogênicas de suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Bourbon com idade de 10 meses em relação ao diâmetro celular e nuclear. Células embriogênicas indicadas por setas pretas e células não embriogênicas indicadas por setas vermelhas. Núcleos das células embriogênicas indicados por setas verdes.

Dois tipos celulares foram encontrados no presente estudo, apresentando morfologias diferentes. Um desses tipos, identificado como Tipo 1- células embriogênicas, apresentou características altamente embriogênicas, tais como: células pequenas com citoplasma denso, ausência de grandes vacúolos, núcleo grande e nucléolos proeminentes e presença de grãos de amido. O Tipo 2- células não embriogênicas, apresentou células grandes, dispersas, vacuoladas, com ausência de núcleos, pouca ou nenhuma presença de grãos de amido. Esse tipo celular foi remetido à alta vacuolização das células periféricas que aos poucos vão se soltando do agregado embriogênico.

Em outras culturas como a banana, também foram realizados trabalhos visando identificar e relacionar a morfologia das células com seu potencial embriogênico. Esses estudos foram feitos por Domergue, Ferrière e Côte (2000) com suspensões celulares cv. *grand naine* e por Lima (2009) com suspensões celulares cv. Prata anã. Os resultados obtidos relacionados com a morfologia e o potencial embriogênico corroboram com os do presente estudo.

O tipo celular 1 descrito neste trabalho também foi identificado por Steiner et al. (2005) em células de calos de *Araucaria angustifolia* e também em calos de dendezeiro, por Carvalho (2009). Esse tipo celular foi considerado meristemático e os autores verificaram a formação de embriões nessas regiões. Os mesmos resultados foram visualizados por Pádua (2012) em tipos celulares denominados Tipo 2, compostos por massas celulares obtidas de explantes foliares de *Elaeis guineenses* híbrido Tenera.

Aglomerados celulares foram observados em todas as coletas, com 136 a 400  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As últimas coletas apresentaram maiores quantidades de células não embriogênicas misturadas aos aglomerados (Figura 8). Lima (2009) obteve valores de 50 a 1000  $\mu\text{m}$  para os aglomerados celulares identificados para suspensão de banana cv. Prata-Anã.



**Figura 8** Aglomerados celulares foram observados em todas as coletas, com 136 a 400 µm de diâmetro.

Semelhanças foram encontradas no presente estudo com Ribas et al. (2011), avaliando o efeito do genótipo e a idade do material vegetal na eficiência de transformação genética de calos embriogênicos de *C. arabica* e *C. canephora*. Os autores identificaram agregados de células semelhantes a pequenas massas proembriogênicas, alta homogeneidade dos tecidos, citoplasma muito denso e rico em proteínas solúveis e de reserva, elevado núcleo de todas as células, o núcleo volumoso central, numerosos e pequenos grãos de amido em torno do núcleo. Em cultura de calos embriogênicos de sete meses de idade os autores identificaram estruturas altamente homogêneas compreendendo, principalmente, massas proembriogênicas, cujas células exibem um citoplasma denso, rico em proteínas solúveis e de reserva, com núcleo elevado. Essas características foram observadas nas suspensões celulares de 10 meses de idade do presente trabalho.

Como relatado no presente trabalho para *C. arabica* cv. Bourbon, grãos de amido também foram identificados em macaúba (*Acrocomia aculeata*) por Moura et al. (2008) e pupunha (*Bactris gasipaes*) por Steinmacher et al. (2011). Esses mesmos autores inferiram que a presença do amido em células embriogênicas indica a aquisição da competência embriogênica.

Stein et al. (2010a) relatam a presença de grãos de amido em células de ingazeiro, e descrevem como uma alteração ultraestrutural, comum em células organogênicas e também relacionadas com a aquisição da capacidade embriogênica.

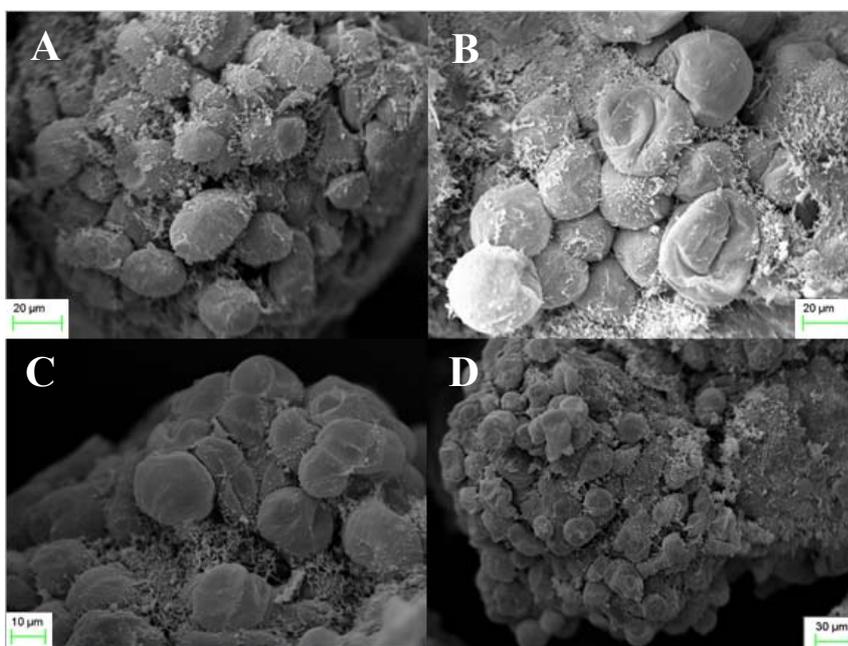
### **3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O uso da microscopia eletrônica e a otimização das técnicas de preparação das amostras ampliaram a capacidade de observação da ultraestrutura celular. Muitos conceitos sobre a morfologia de certos

organismos em relação à organização de tecidos e funções celulares foram radicalmente alteradas (SANCHES; DURIGAN; SANTOS, 2007).

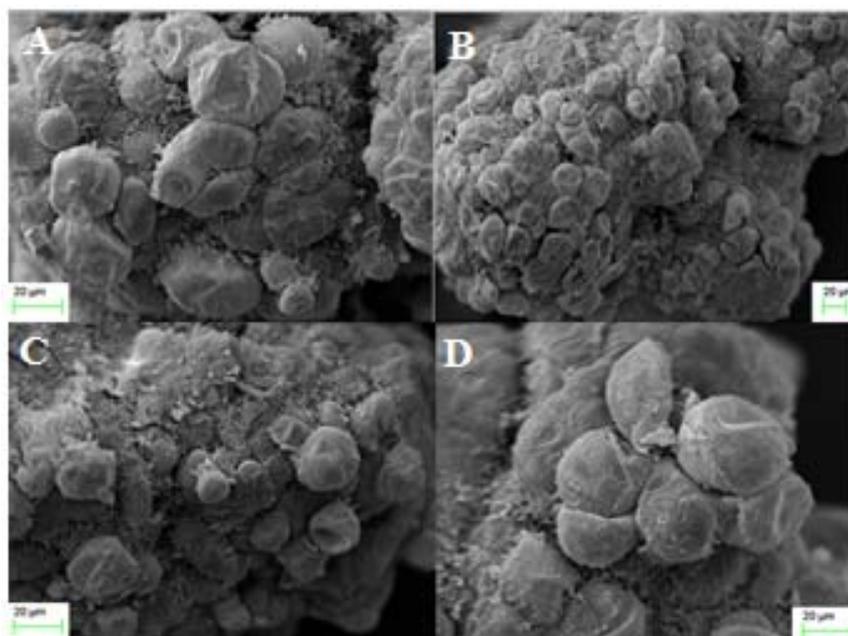
Sugere-se que os calos tenham diferentes capacidades para embriogênese somática conforme suas células estejam em diferentes condições e tenham características diferentes. Calos embriogênicos e não-embriogênicos mostram diferenças, não apenas em estruturas morfológicas e comportamentos embriogênicos, mas também nas suas características celulares (STEIN et al., 2010a). Ciente disso, as ECS do presente estudo apresentaram características celulares diferentes quando submetidas a condições diferentes, por exemplo, falta de nutrientes.

No presente estudo, nota-se aos quatro dias a presença de células arredondadas e isodiamétricas, formando os aglomerados celulares (Figura 9A e D) e menor frequência de células murchas e rompidas juntas aos aglomerados (Figura 9B e D), além da presença de células em divisão (Figura 9C).



**Figura 9** Micrografia eletrônica de varredura de aglomerados embriogênicos de suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Bourbon com idade de 10 meses. Coleta aos 4 dias. A e D) aglomerados celulares; B e D) menor frequência de células murchas; C) células em divisão.

Aos 28 dias, nota-se a presença de células assimétricas. Nesse período em que as células se encontravam em escassez de nutrientes e fase de desaceleração, notou-se a presença de células murchas e rompidas, provavelmente devido à morte celular, ou seja, apoptose (Figura 10).



**Figura 10** Micrografia eletrônica de varredura de aglomerados embriogênicos de suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Bourbon com idade de 10 meses. Coleta 7aos 28 dias. A, B e C) células murchas predominando nos aglomerados; D) célula rompida.

Em calos provenientes de folhas de ingazeiro, a morfologia das células foi observada como sendo arredondadas ou alongadas, estas últimas não sendo consideradas como embriogênicas (STEIN et al., 2010a).

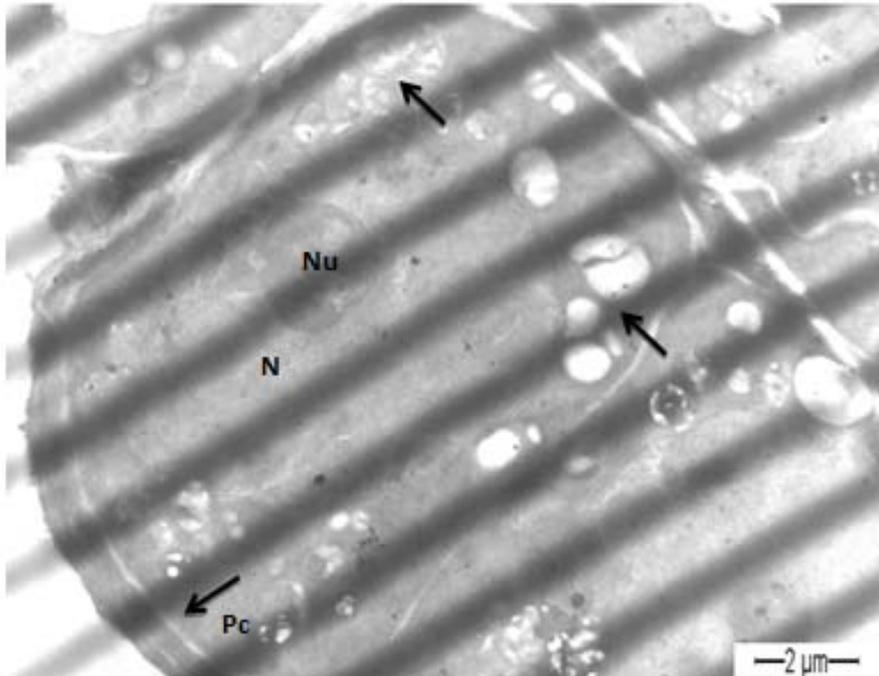
Ribeiro et al. (2012) identificaram três tipos celulares em *Musa* sp., cv. Prata anã, sendo: células alongadas, grupo de células e células isodiamétricas. Esses resultados também foram obtidos por Strosse et al. (2003) em *Musa* sp.

A organizada proliferação celular na superfície dos aglomerados parece ser competente para a formação de proembriões somáticos pela presença de células em divisão (Figura 9) (STEIN et al., 2010a).

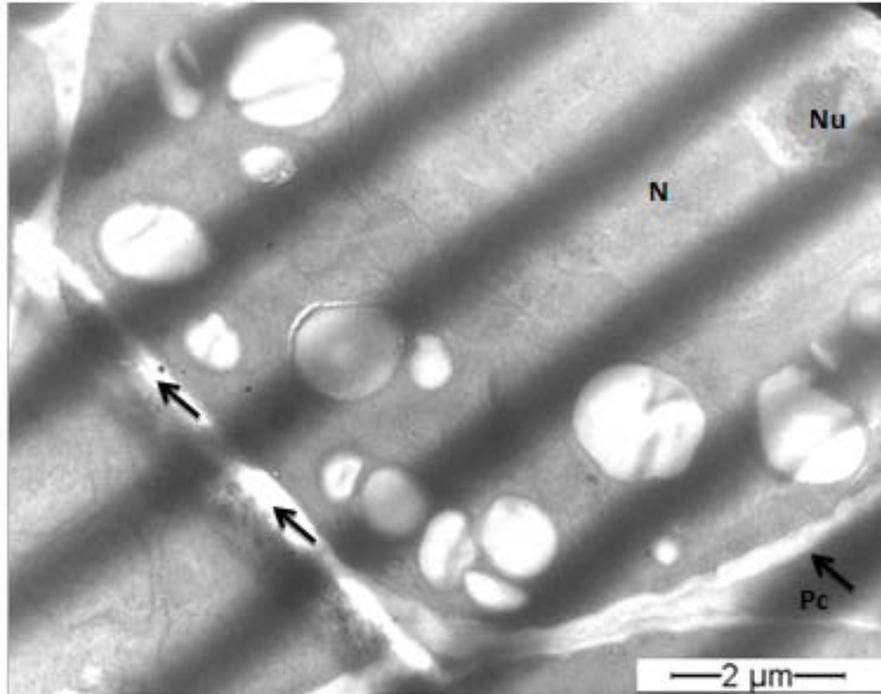
As alterações histocitológicas e ultraestruturais do acúmulo de reservas envolvidas no processo de embriogênese somática de *Passiflora cincinnata*, obtido a partir de embriões zigóticos maduros, foi identificado por Rocha (2011), onde o autor relata nas diferentes fases a presença e ausência de grãos de amido, citoplasma denso, núcleo esférico e nucléolo proeminente e células em processo de vacuolização.

### **3.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As análises através da MET permitiram visualizar na coleta 1, que corresponde as ECS da curva de crescimento com 4 dias de cultivo, sistema celular organizado com núcleo e nucléolo proeminente, alta razão núcleo/citoplasma, abundante presença de amiloplastídeos e parede celular com pequenos espaços intercelulares (Figura 11 e 12). Esses resultados são complementados pela microscopia fotônica através das figuras 4 e 5, mostrando as células coradas pelo lugol, indicando a grande presença de amido nas células e a presença de núcleos proeminentes, respectivamente.

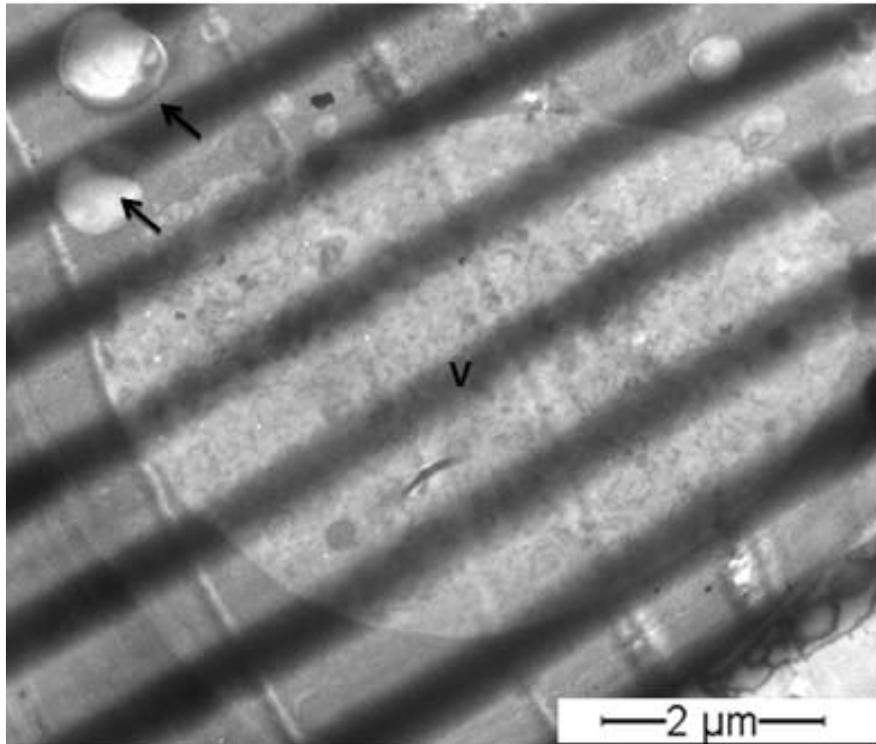


**Figura 11** Micrografia eletrônica de suspensões celulares de *Coffea arabica* referente ao 4º dia de cultivo na curva de crescimento. Célula com núcleo grande (N) e nucléolo proeminente (Nu), presença de amiloplastídeos (seta). Parede celular (Pc) (seta).

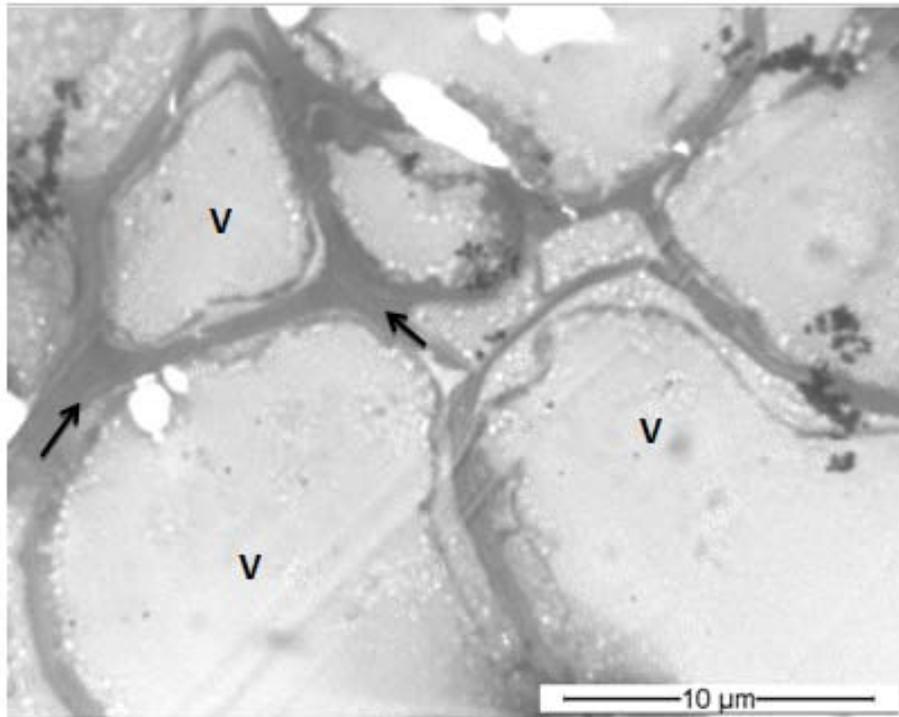


**Figura 12** Micrografia eletrônica de suspensões celulares de *Coffea arabica* referente ao 4º dia de cultivo na curva de crescimento. Célula com núcleo grande (N) e nucléolo proeminente (Nu), presença de grandes e numerosos amiloplastídeos ao redor do núcleo. Parede celular (Pc) (seta). Pequenos espaços intercelulares (setas)

Na coleta 7, que corresponde as ECS da curva de crescimento com 28 dias de cultivo, as análises por MET identificaram a presença de vacúolos, alguns ocupando quase que totalmente o citoplasma, grandes espaços intercelulares e ausência de conteúdo celular (Figura 13 e 14). Acrescentando a esses resultados as figuras 6 e 7, que mostram a presença de células alongadas (formato evidenciado pelo corante azul de toluidina), sem conteúdo celular, misturadas aos aglomerados embriogênicos e ainda a figura 10, por MEV, fica nítido que as ECS da coleta 7, estavam em sinais de baixa atividade metabólica e/ou processo de morte celular, por todas as características aqui citadas.



**Figura 13** Micrografia eletrônica de suspensões celulares de *Coffea arabica* referente ao 28º dia de cultivo na curva de crescimento. Célula com vacúolo (V) ocupando quase que totalmente o citoplasma. Poucos amiloplastídeos (setas)



**Figura 14** Micrografia eletrônica de suspensões celulares de *Coffea arabica* referente ao 28º dia de cultivo na curva de crescimento. Células com ausência de organelas e amiloplastídeos. Grandes vacúolos (V) ocupando o citoplasma. Grandes espaços intercelulares (setas).

Através da MET, alguns autores têm caracterizado os materiais embriogênicos pela presença de núcleo grande com nucléolo proeminente, mitocôndrias de formato arredondado, citoplasma com pouco espaço intercelular e sistema celular organizado. Materiais não embriogênicos apresentam em maior parte células grandes, alongadas, vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado, não sendo viáveis. Essas observações foram feitas em calos de maracujá (*Passiflora* spp.) (FIGUEIREDO, 2007), em calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) (NOGUEIRA et al., 2007) e em calos de algodão (SHANG et al., 2009).

Resultados semelhantes aos do presente estudo com ECS de *Coffea arabica* cv. Catiguá foram identificados em calos obtidos de antera de

ingazeiro, com presença de grãos de amido e núcleo grande com nucléolo proeminente (STEIN et al., 2010a). Grãos de amido foram identificados por Quiroz-Figueroa et al. (2002) em *Coffea arabica* e por Pinto et al. (2010) em *Eucalyptus globulus*.

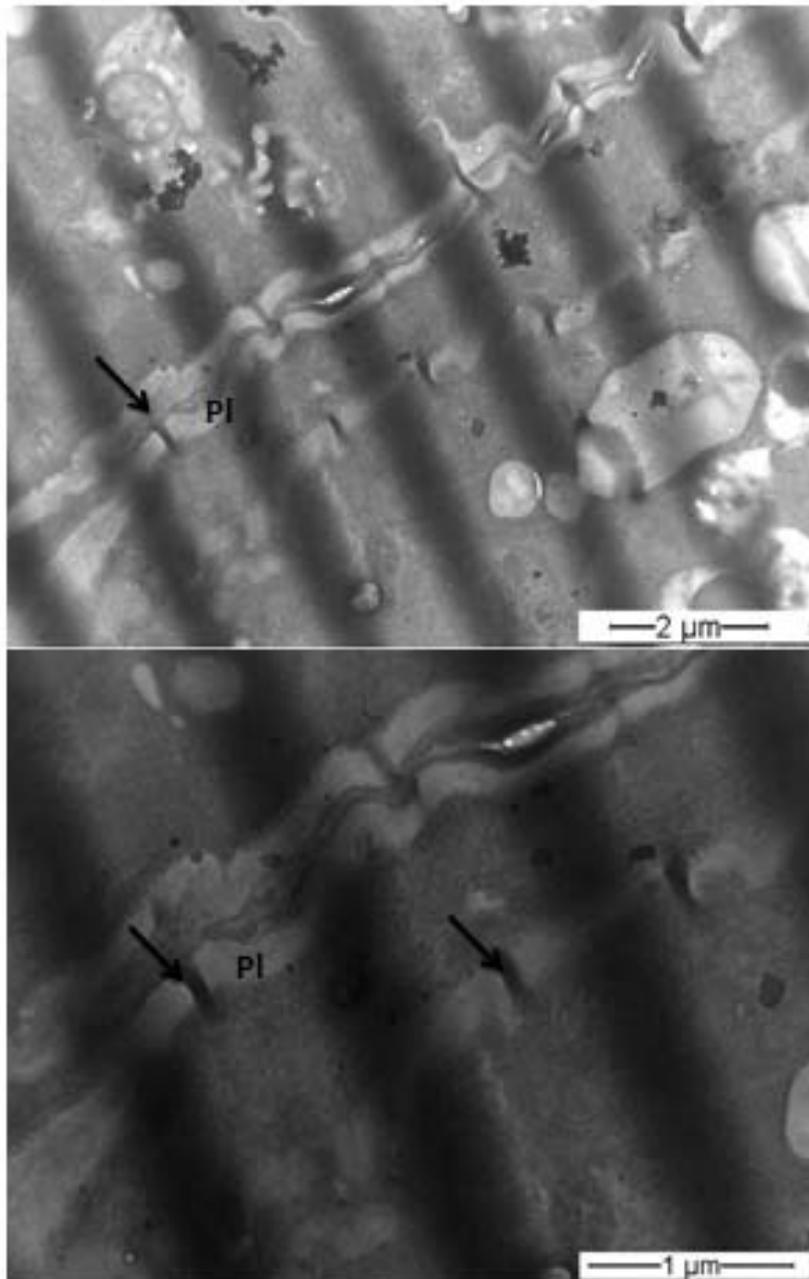
No presente estudo, a grande quantidade de amiloplastídeos encontrados na coleta 1 foram totalmente consumidos, não sendo mais detectados na coleta 7. Evidentes alterações citológicas reforçam a idéia de que componentes de reserva são necessários para reorganização e diferenciação celular, além da aquisição da capacidade embriogênica (STEIN et al., 2010a; ZIENKIEWICZ et al., 2011).

Ribeiro et al. (2012), analisando diferentes calos de *Musa sp.* cv. Prata anã, identificaram em calos denominados Tipo 1, algumas células com paredes finas, pequenos vacúolos e citoplasma disperso, caracterizados por células não viáveis. Por outro lado, calos denominados Tipo 2 apresentaram células com citoplasma denso, vacúolos grandes e significativa quantidade de mitocôndrias.

Stein et al. (2010a) também observaram em calos não embriogênicos de *Inga vera* células não-viáveis que tiveram a mesma morfologia como a descrita para o calo do tipo 1 de *Musa sp.* Além de organelas, tais como mitocôndrias e retículo endoplasmático, ocupando uma posição periférica em virtude de serem afetados por grandes vacúolos.

De acordo com Shang et al. (2009), calos embriogênicos e não embriogênicos diferem entre si não só em relação à sua estrutura morfológica e comportamento embriogênico, mas também entre suas características celulares.

No presente estudo, algumas células da coleta 1 apresentaram plasmodesmos ligando uma célula à outra (Figura 15). Essas estruturas, responsáveis pela comunicação entre as células vizinhas para a troca de moléculas funcionais, também foram identificadas por Concenço et al. (2007), Pádua (2012) e Steinmacher et al. (2011).



**Figura 15** Micrografia eletrônica de suspensões celulares de *Coffea arabica* referente ao 4º dia de cultivo na curva de crescimento. Parede celular espessa com pouco espaço entre as células. Plasmodesmos (setas).

Assim, a microscopia eletrônica pode ser aplicada de forma a avaliar as alterações e a atividade das organelas celulares e caracterizar as regiões de explantes potencialmente embriogênicas.

#### 4. Conclusões

A importância de se ter estabelecido a curva de crescimento de suspensões celulares com 10 meses de idade está na identificação das fases em que ocorrem os processos cinéticos fundamentais em materiais tardios, permitindo analisar o potencial embriogênico do mesmo e sua correta manipulação.

No período analisado (28 dias de cultivo), a curva de crescimento de suspensões celulares de *C. arabica* cv. Bourbon, de 10 meses de idade, apresentou três fases distintas: lag (0 a 4 dias), exponencial (4 a 20 dias) e desaceleração (20 a 28 dias). Os procedimentos de subcultivos para manutenção e multiplicação das ECSs deverão ocorrer ao final da fase exponencial ou no início da fase de desaceleração, bem como a renovação do meio de cultivo. Devido à idade avançada do material, o crescimento não contínuo das suspensões ao longo da curva reflete a qualidade das mesmas.

As análises histológicas e ultraestruturais possibilitaram identificar a morfologia e organização celular das ECS de café, permitindo comparar as diferenças entre os tempos de coleta.

Ciente da importância do entendimento dos mecanismos que envolvem a indução da competência celular à embriogênese, análises histológicas e ultraestruturais tornam-se necessárias para melhor compreensão, otimização e validação do seu uso em protocolos de transformação genética.

## REFERÊNCIAS

- AMEIRA, A. et al. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2009.
- BARTOS, P. M. C. et al. Histologia de calos provenientes da embriogênese somática de *Coffea arabica* L. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais...** Araxá: SBC, 2011. 1 CD-ROM.
- CARVALHO, J. M. F. C.; GONZÁLEZ-BENITO, E.; PEREZ, C. Análise histológica de calogênese e embriogênese das cultivares de algodão cnpa precoce 2 e coker 312. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 5, n. 1, p. 235-239, jan./abr. 2001.
- CARVALHO, M. **Embriogênese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.)**. 2009. 73 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- CELEDÓN, P. A. F.; KOBAYASHI, A. K.; VIEIRA, L. G. E. Utilização de nutrientes por células de algodoeiro cultivadas em suspensão. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 431-437, jul./set. 2000.
- CONCENÇO, G. et al. Plasmodesmos: transporte simplástico de herbicidas na planta. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 423-432, abr. 2007.
- DOMERGUE, F. G. R.; FERRIÈRE, N.; CÔTE, F. X. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 8, p. 748-754, July 2000.
- FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 501 p.
- GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, L. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. v. 2, p. 533-568.

LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 56-63, jan./fev. 2000.

LIMA, C. D. F. **Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões somáticos de bananeira cv. prata-anã**. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MEZZETTI, B.; CONTE, L. S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa in vitro*: II., growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 153-160, Sept. 1991.

MOURA, E. F. et al. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 95, p. 175-184, July 2008.

NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 48-50, jul. 2007.

\_\_\_\_\_. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

PÁDUA, M. S. **Germinação in vitro, indução e caracterização de massas pró-embriogênicas de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.)**. 2012. 118 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PINTO, G. S. S. et al. Histocytological changes and reserves accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 763-769, Aug. 2010.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 12, p. 1141-1149, Dec. 2002.

RIBAS, A. F. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 92, p. 1-17, May 2011.

RIBEIRO, A. et al. Morphological and ultrastructural analysis of various types of banana callus, cv. Prata anã. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 423-429, Oct./Dec. 2012.

ROCHA, D. I. **Estudos anatômicos e ultraestruturais de sistemas de regeneração *in vitro* de *Passiflora cincinnata* Masters e *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae)**. 2011. 58 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

SANCHES, J.; DURIGAN, J. F.; SANTOS, J. M. Utilização da microscopia eletrônica de varredura como ferramenta de avaliação da estrutura do tecido de abacate 'quintal' após danos mecânicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 57-60, abr. 2007.

SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. Cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, jan./mar. 2008.

SHANG, H. H. et al. Histological and ultrastructural observation reveals significant cellular differences between *Agrobacterium* transformed embryogenic and non-embryogenic calli of Cotton. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 51, n. 5, p. 456-465, May 2009.

SILVA, A. T. **Análise da expressão dos genes baby boom (BBM) e somatic embryogenesis receptor kinase (SERK) envolvidos na embriogênese somática do cafeeiro**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici pequeno**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SMITH, R. M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic, 1992. 171 p.

STEIN, V. C. et al. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 53, n. 2, p. 159-163, jul./dez. 2010a.

\_\_\_\_\_. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 5, p. 789-796, mar. 2010b.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, Nov. 2005.

STEINMACHER, D. A. et al. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 108, n. 8, p. 1463-1475, Aug. 2011.

STROSSE, H. et al. Banana and plantain embryogenic cell suspensions. In: THE INTERNATIONAL NETWORK FOR THE IMPROVEMENT OF BANANA AND PLANTAIN, 8., 2003, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: INIBAP, 2003. 1 CD-ROM.

TEIXEIRA, J. B. et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39 p. (Documentos, 121).

ZIENKIEWICZ, A. et al. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* seed germination and seedling growth. **Protoplasma**, New York, v. 248, n. 4, p. 751-765, Nov. 2011.

**Capítulo 3** Influência da renovação do meio de cultura na morfologia celular e na expressão gênica de *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*) e *BBM* (*Baby Boom*) em suspensões celulares de *Coffea arabica* cv. Catiguá

## RESUMO

A embriogênese somática é uma ferramenta útil para estudos relacionados ao desenvolvimento do embrião em vegetais e em aplicações biotecnológicas, como micropropagação e transformação genética. O cultivo de células embriogênicas em suspensão (ECS) para propagação *in vitro* se mostra bastante eficiente para essas aplicações. Dessa forma, para o alcance da embriogênese somática de qualidade é necessário o estudo minucioso do desenvolvimento do material vegetal através de análises histológicas e análises da expressão de genes, como marcadores moleculares do potencial embriogênico, possibilitando inferir se o material vegetal possui características embriogênicas. Objetivou-se neste estudo, relacionar a renovação do meio nutritivo com a morfologia das células e a expressão dos genes *SERK* e *BBM* de células em suspensão de *Coffea arabica* cv. Catiguá, obtidas de acordo com protocolo de Samson et al. (2006) e Teixeira et al. (2004). Para verificar se a renovação do meio de cultura interfere na expressão gênica de *SERK* e *BBM*, foram realizadas coletas sucessivas (30, 45, 60 e 75 dias) das suspensões, escolhidas aleatoriamente. Paralelo a essas análises, amostras para análise histológicas também foram coletadas. As análises histológicas demonstraram a presença de setores embriogênicos em todas as amostras e aos 75 dias, também foram identificados setores não embriogênicos. Com relação à expressão dos genes marcadores, aos 30 dias *SERK* e *BBM* se mantinham expressos, e com a renovação do meio, a expressão de ambos declinou até aos 45 dias, período que *BBM* continuava mais expresso que *SERK*. Com a renovação do meio, a expressão de ambos voltou a subir até aos 60 dias, ainda com *BBM* obtendo os maiores valores de expressão. Com a renovação do meio aos 60 dias a expressão de ambos declinou até os 75 dias, sendo que no final desse período *SERK* estava mais expresso que *BBM*. Os picos de recuperação da expressão de ambos os genes (45 a 60 dias) talvez sejam devidos ao estresse nutricional crescente, mais rigoroso aos 60 dias. A partir do momento em que meio novo era disponibilizado para as células, uma modificação instantânea em suas condições físicas e químicas acarretaram um estresse. Da mesma forma que, ao adicionar meio novo nas coletas seguintes, as células foram submetidas a outro estresse induzindo o aumento da expressão dos genes. O declínio da expressão de ambos os genes ao final do período de 75 dias, possivelmente também se deu pela morte celular, o que pode ser confirmado pela morfologia e composição das células.

Palavras-chave: Embriogênese somática. ECS. Biotecnologia. *SERK*. *BBM*.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a useful tool for studies related to embryo development in plants and in biotechnological applications, such as micro propagation and genetic transformation. The cultivation of embryogenic cells in suspension (SCE) for the *in vitro* propagation is very efficient for these applications. Thus, in order to obtain quality somatic embryogenesis, a detailed study of plant material development through histological analyses and gene expression analyses, as molecular markers of the embryogenic potential, are necessary, allowing the inference of if the plant material has embryogenic characteristics. The objective of this study was to relate the renovation of the nutritive medium with cell morphology and the expression of genes *SERK* and *BBM* of *Coffea arabica* cv. Catigua cells in suspension, obtained according to protocol from Samson et al. (2006) and Teixeira et al. (2004). In order to verify if the renovation of the culture medium interferes in the expression of genes *SERK* and *BBM*, successive samplings of the suspensions were performed (30, 45, 60 and 75), randomly chosen. Parallel to these analyses, samples for the histological analyses were also collected. The histological analyses revealed the presence of embryogenic sectors in all samples, and at 75 days, were also identified non-embryogenic sectors. Regarding the expression of the marked genes, at 30 days, *SERK* and *BBM* remained expressive and, with the renovation of the medium, the expression of both declined until 45 days, period in which *BBM* was more expressive than *SERK*. With the renovation of the medium, the expression of both returned to increasing until 60 days, still with *BBM* presenting larger expression values. With the renovation of the medium at 60 days, the expression of both declined until 75 days, and in the end of this period, *SERK* was more expressive than *BBM*. The expression recuperation apexes of both genes (45 and 60 days) may be due to growing nutritional stress, more rigorous at 60 days. From the moment in which a new medium was made available to the cells, an instantaneous modification in its physical and chemical conditions caused stress. In the same manner in which, by adding a new medium to the following samplings, the cells were submitted to another stress inducing the increase of gene expression. The decline in the expression of both genes at the end of the 75 day period was, possibly, also due to cell death, which may be confirmed by the morphology and cell composition.

Keywords: Somatic embryogenesis. SCE. Biotechnology. *SERK*. *BBM*.

## 1. Introdução

A embriogênese somática tem constituído uma ferramenta útil para estudos relacionados ao desenvolvimento do embrião e em aplicações biotecnológicas, como micropropagação e transformação genética.

No processo de embriogênese indireta, as células precursoras passam por uma etapa intermediária de formação de calo, anterior à formação do embrião. Os calos fornecem o material inicial para o desenvolvimento de suspensões celulares embriogênicas (ECS).

As ECS se caracterizam por milhares de glomérulos celulares mantidos em meio líquido e rotação constante, passíveis de serem induzidos a completar o desenvolvimento embrionário. A metodologia para obtenção e manutenção desse tipo de material vegetal é bem conhecida, mas os protocolos são genótipo dependente, o que torna necessário o desenvolvimento de protocolos específicos para cada espécie.

No caso da embriogênese indireta, reguladores de crescimento presentes no meio de cultura induzem a desdiferenciação das células somáticas e o início da divisão celular, antes que possam expressar a competência embriogênica. Dentre eles, as auxinas são os principais reguladores de crescimento utilizados para indução da embriogênese somática, estando envolvidas na mediação da transição do estágio somático para o embriogênico. Semelhante às auxinas utilizadas para indução da embriogênese somática, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é o regulador de crescimento sintético mais utilizado nos sistemas de cultura de tecidos devido à sua eficiência.

Uma vez que na transição do estado somático para o embriogênico, as células precisam se desdiferenciar e ativar o seu ciclo de divisão celular, seja por meio de alterações fisiológicas, metabólicas e/ou dos padrões de expressão gênica, outras formas de validar as características embriogênicas visuais foram desenvolvidas através de análises histológicas, permitindo

visualizar a transição das células através das características diferenciadoras entre elas, inferindo se o material vegetal possui ou não características embriogênicas.

O entendimento dos mecanismos moleculares que promovem a expressão gênica tem avançado nos últimos anos. *SERK*, *LEC1*, *AGL15*, *PKL*, *WUS* e *BBM* são genes relacionados à embriogênese somática, mas apenas *SERK* é dito ser específico das células embriogênicas, enquanto *BBM* induz a formação espontânea de embriões somáticos.

O produto gênico de *SERK* pertence à superfamília de receptores do tipo cinase (*RLK-Receptor like kinases*) e parecem estar envolvidos em rotas de transdução de sinais. *SERK* foi identificado pela primeira vez em células de cenoura (*Daucus carota*), como resultado de uma triagem de genes expressos em culturas embriogênicas. O gene *DcSERK* mostrou ser expresso no início do processo de indução de embriogênese somática, sendo detectado até o estágio de embrião globular.

O gene “Baby Boom” (*BBM*) codifica um fator de transcrição AP2/ERF, específico em plantas, que está relacionado ao processo embriogênico e à proliferação celular em regiões meristemáticas e ao desenvolvimento de embriões e sementes. O fator de transcrição AP2 está relacionado a processos embriogênicos, enquanto ERF se relaciona a respostas contra estresses bióticos e abióticos. *BBM* foi identificado e caracterizado através de uma biblioteca subtrativa em cultura embriogênica induzida a partir de micrósporos em *Brassica napus*.

Objetivou-se neste estudo relacionar a renovação do meio nutritivo com a morfologia das células e a expressão dos genes *SERK* e *BBM* como marcadores moleculares para o potencial embriogênico de células em suspensão de *Coffea arabica* cv. Catiguá.

Assim, espera-se que o uso dos genes *SERK* e *BBM* como marcadores do estágio embriogênico permitam maior eficiência nos trabalhos de desenvolvimento de protocolos de ECS para *Coffea arabica* e nos trabalhos visando a transformação genética.

## **2. Material e métodos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **2.1 Material botânico**

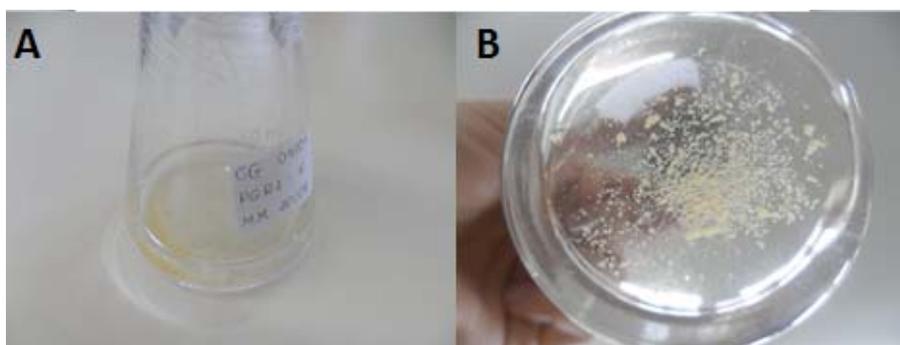
Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados como material vegetal calos embriogênicos de *Coffea arabica* cultivar Catiguá, obtidos segundo o protocolo de Samson et al. (2006) (Anexos 4 e 5) que deram origem às suspensões celulares.

### **2.2 Indução de calos embriogênicos**

Folhas bem desenvolvidas de plantas saudáveis, cultivadas em casa de vegetação foram colhidas pela manhã, levadas para o laboratório e submetidas a um processo de desinfestação com hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e lavadas três vezes com água destilada autoclavada por 10 minutos. Após desinfestação, explantes com 1 cm<sup>2</sup> foram inoculados em placas de Petri contendo 25 mL de meio primário PGR1 com a face abaxial voltada para cima. Após inoculação, as placas foram mantidas no escuro a 27 °C por 30 dias, até a formação dos calos primários (CPs), os quais foram em seguida transferidos para meio secundário E e mantidas novamente no escuro a 27 °C até a formação de calos embriogênicos. Os CPs foram mantidos nessas condições até a formação de calos secundários, que foram classificados visualmente em calos embriogênicos (CE) ou calos não embriogênicos (CNE).

### 2.3 Indução da suspensão celular

Calos com características embriogênicas foram transferidos para erlenmeyers com capacidade para 10 mL, contendo 3 mL do meio de multiplicação MM (TEIXEIRA et al., 2004), modificado com 500 mg/L de ácido cítrico (Anexo 3). À medida que as ECS multiplicavam eram transferidas para erlenmeyers de maior volume. A suspensão (Figura 1) foi mantida no escuro a 27°C, sob agitação de 100 rpm. A cada 15 dias foi realizada a troca do meio de cultura.



**Figura 1** (A) Início da suspensão celular. (B) Cultivo do material, caracterizado por suspensão celular homogênea.

### 2.4 Caracterização morfológica

Algumas amostras de suspensão celular foram coletadas de forma aleatória aos 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo. As amostras coletadas foram fixadas em FAA 50% (10% de solução de formaldeído 40% + 5% de ácido acético glacial + 50% de álcool etílico, v/v) por 48 horas sob temperatura ambiente e depois desidratadas em série etílica a 70, 80, 90 e 100% por 1 hora cada, repetindo a série etílica de 100% mais uma vez. As amostras foram infiltradas durante 24 horas com solução 1:1 de resina epoxi (Historesin® Leica) e etanol e depois 24 horas em resina pura. Após infiltração, as amostras foram emblocadas na proporção 15:1 de resina e

polimerizador e mantidas na estufa a 37°C por três dias. Cortes com espessura de 3 µm foram realizados em micrótomo (Easypath EP-31-20091), corados com solução de azul de toluidina a 0,05% e lugol e visualizado em microscópio de luz (Zeiss, Axio Scope).

## **2.5 Influência da renovação do meio de cultura na expressão dos genes *SERK* e *BBM***

Para verificar se a renovação do meio de cultura interfere na expressão gênica de *SERK* e *BBM* foram realizadas coletas das suspensões, escolhidas aleatoriamente. Essas coletas foram realizadas aos 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo. Em cada tempo de coleta, 90% do meio de cultura foi renovado. O valor renovado baseia-se no trabalho de Silva (2011) que realizou a renovação de 1/6 do meio nutritivo de ECS de café da cultivar Catiguá. O autor relata que a renovação de 1/6 do volume do meio nutritivo não foi suficiente para suprir a crescente necessidade nutricional dada pelo CR constante.

## **2.6 Quantificação da expressão relativa entre os genes *SERK* e *BBM***

### **2.6.1 Extração de RNA**

O RNA total foi extraído das quatro amostras de ECS correspondente aos tempos de coleta usando o Kit NucleoSpin® (Macherey Nagel) de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (260nm) no aparelho NanoDrop 1000, e a integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

### **2.6.2 Tratamento das amostras para eliminação de DNA genômico**

As amostras foram tratadas utilizando o Kit DNase Turbo (Ambion), de acordo com o protocolo do fabricante. A verificação quanto à ausência de DNA foi feita mediante PCR com o gene de referência da Actina (Housekeeping gene) e visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

### **2.6.3 Obtenção de cDNA**

O cDNA foi obtido a partir do RNA total extraído das ECS utilizando o Kit High-Capacity (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA total teve sua quantidade padronizada para obter um *pool* de RNA na concentração de 1µg.

### **2.6.4 Análise da expressão dos genes *SERK* e *BBM* mediante qPCR**

Com os cDNAs obtidos, foram realizadas análises quantitativas em uma PCR Tempo Real (qPCR) [*ABI PRISM 7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems)] mediante o uso de *SYBR<sup>®</sup> Green*, de acordo com o protocolo do fabricante. As amplificações ocorreram com cerca de 10 ng de cDNA e 10 ng de primer (SILVA, 2011) durante 5 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e, 1 min a 60 °C e finalizadas por 15s a 95 °C. Como controle endógeno, foram utilizados primers para os genes 14-3-3 e *GAPDH* (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009).

Os dados de expressão, resultantes das amplificações, foram normalizados através da fórmula [ $\Delta CT = \text{média CT (gene alvo)} - \text{média CT (controle endógeno)}$ ]. Para cada gene alvo foi escolhida uma amostra como sendo a calibradora (aquela que apresentou o maior valor da média do alvo e

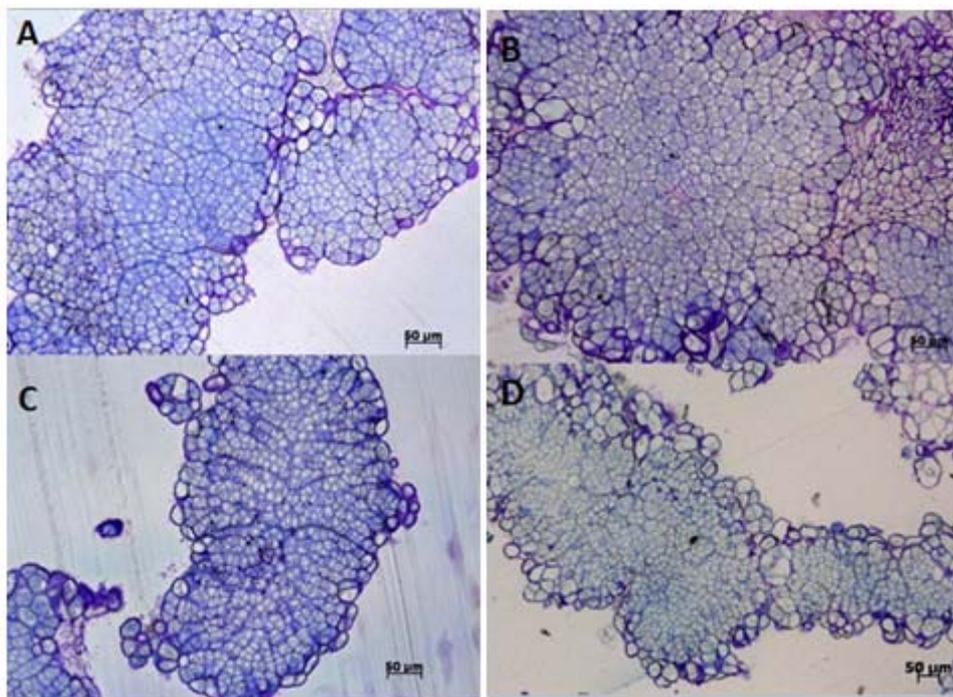
consequentemente o maior valor para o  $\Delta CT$ , sendo assim a amostra menos expressa) e calculado o valor do  $\Delta\Delta CT$  [ $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  (alvo) –  $\Delta CT$  (calibrador)]. O valor da expressão foi quantificado relativamente pela fórmula ( $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Os primers apresentaram eficiência superior a 90%.

### **3. Resultados e discussão**

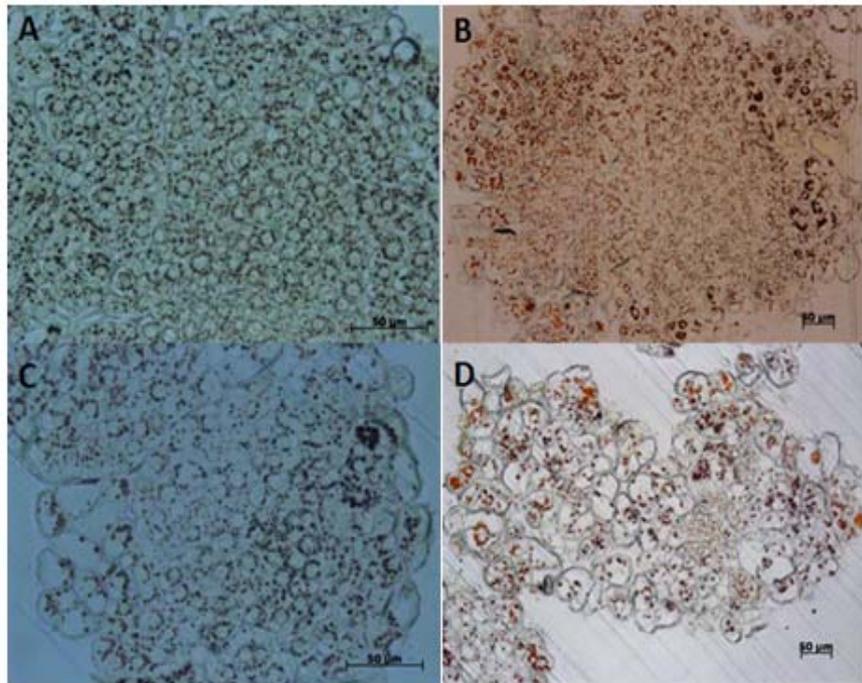
#### **3.1 Análises Morfológicas através da Microscopia Fotônica**

No estudo que avaliou a morfologia das ECS, foram identificados em todas as amostras coletadas (30, 45, 60 e 75 dias) aspectos embriogênicos: características semelhantes às células meristemáticas em divisão ativa, como tamanho pequeno, isodiamétricas, citoplasma denso, núcleos grandes e nucléolos evidentes, pequenos vacúolos e presença expressiva de grãos de amido (CARVALHO; GONZÁLEZ-BENITO; PEREZ, 2001; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; QUIROZ-FIGUEIROA, 2002; RIBAS et al., 2011; SAVONA et al., 2011; SILVA, 2011; STEIN, 2010) (Figuras 2 e 3).

Aos 75 dias, juntamente aos aglomerados embriogênicos, foram identificados materiais não embriogênicos, apresentando em maior parte células grandes, alongadas, vacuoladas, provavelmente em processo de morte celular.

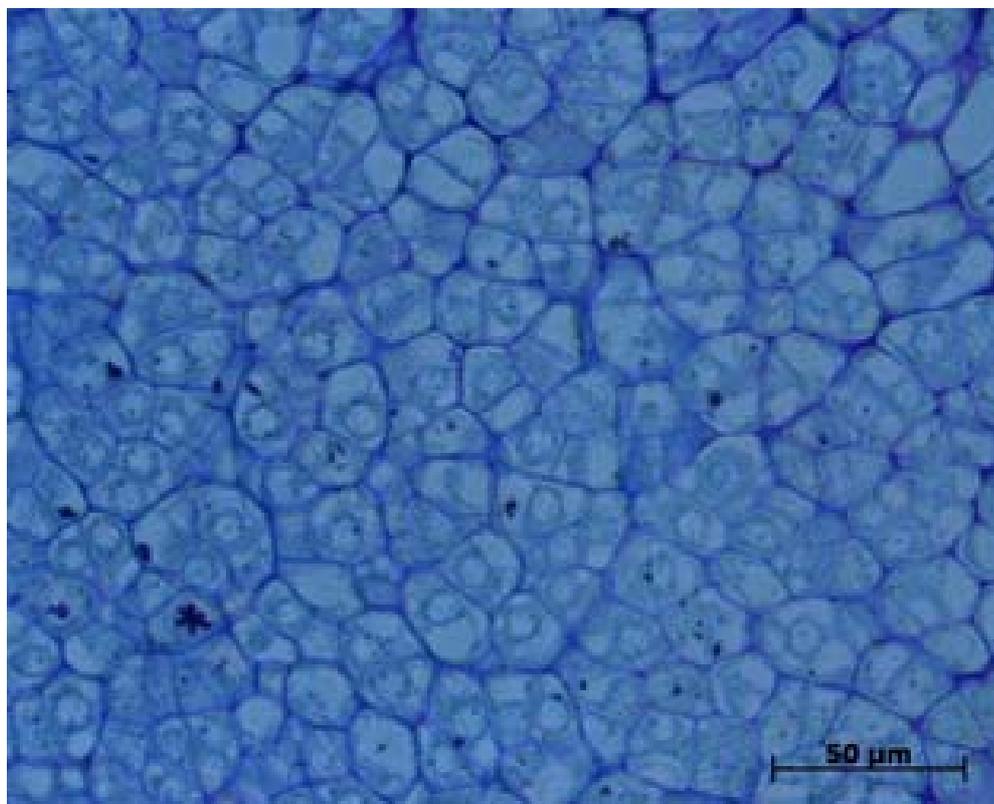


**Figura 2** Fotomicrografia da morfologia de suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Catiguá. **A)** ECS com 30 dias **B)** ECS com 45 dias **C)** ECS com 60 dias **D)** ECS com 75 dias. Material corado com Azul de Toluidina.



**Figura 3** Fotomicrografia da reserva energética de suspensões celulares de *Coffea arabica* cv Catiguá identificada pela presença de grãos de amido. **A)** ECS com 30 dias **B)** ECS com 45 dias **C)** ECS com 60 dias **D)** ECS com 75 dias. Material corado com Lugol.

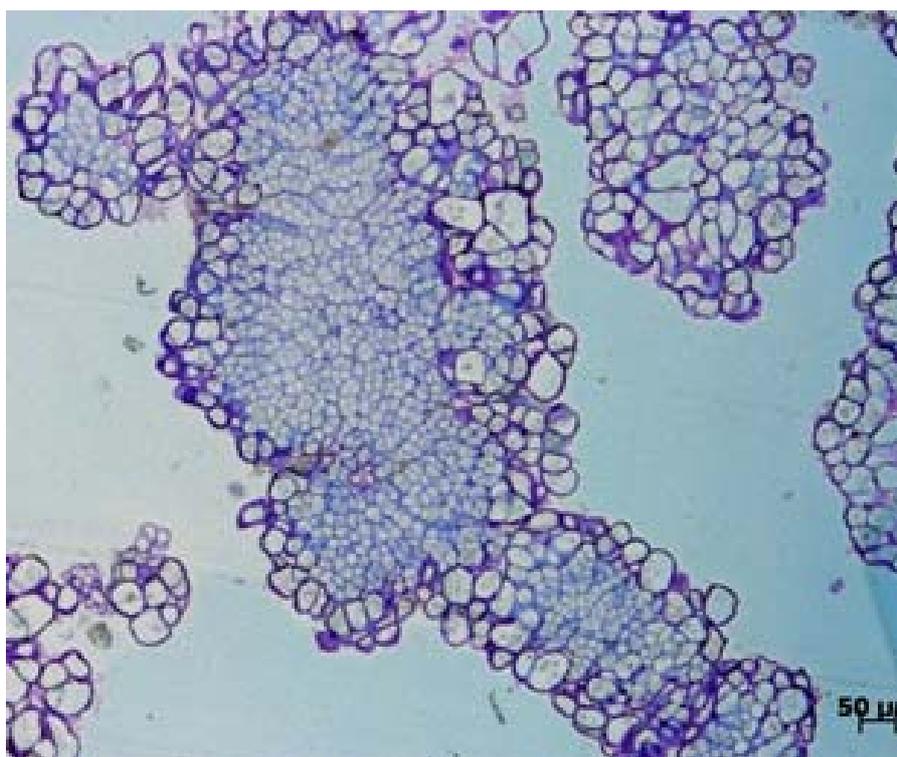
Células embriogênicas possuem divisões celulares contínuas e núcleos proeminentes que resultam na formação de massas de células embriogênicas, chamadas de aglomerados embriogênicos (PEM's ou MPE) (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; SAVONA et al., 2011) (Figura 4).



**Figura 4** Fotomicrografia de aglomerado apresentando divisões celulares com núcleo e nucléolo proeminente.

Alguns trabalhos demonstram esses mesmos resultados, onde Carvalho, González-Benito e Perez (2001) avaliando a histologia da calogênese das cultivares comerciais de algodão CNPA Precoce 2 e Coker 312 observou que algumas células eram muito vacuoladas, enquanto que as células embriogênicas possuíam citoplasma denso, núcleo grande e muitos grãos de amido. O estudo histológico não mostrou diferença entre as duas cultivares. Figueiredo (2007) caracterizou níveis morfológico e ultraestrutural de calos de *Passiflora* spp. e características não morfogênicas, como células de diferentes formatos, sistema celular desorganizado, células grandes e ausência ou pouco conteúdo de amido foram identificadas em calos translúcidos e amarelo claro.

Em um mesmo aglomerado foram identificadas células embriogênicas e não embriogênicas (Figura 5). Durante a indução de embriões somáticos em *C. arabica* cv. Caturra, dois conjuntos celulares, embriogênicos e não embriogênicos, também foram encontrados em um mesmo aglomerado (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002).



**Figura 5** Fotomicrografia de células embriogênicas e não embriogênicas no mesmo aglomerado

Silva (2011) descreve para calos embriogênicos, calos não embriogênicos e suspensões celulares embriogênicas de explantes foliares de *C. arabica* cv. Catiguá, características como as descritas no presente estudo.

Semelhanças foram encontradas no presente estudo com Ribas et al. (2011), avaliando o efeito do genótipo e a idade do material vegetal na eficiência de transformação genética de calos embriogênicos de *C. arabica* e *C. canephora*. Os autores identificaram diferentes aparências morfológicas e

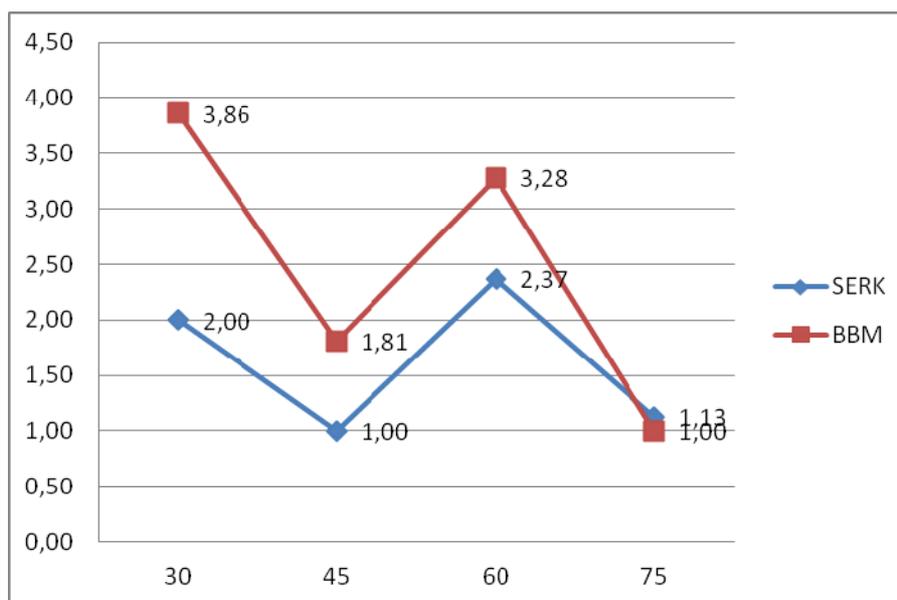
histológicas para fenótipos diferentes de calos e para a idade do material vegetal.

Resultados correspondentes ao presente trabalho também identificaram grãos de amido em macaúba (*Acrocomia aculeata*) (MOURA et al., 2008), calos de ingazeiro (STEIN et al., 2010) e pupunha (*Bactris gasipaes*) (STEINMACHER et al., 2011). Os autores relatam que a presença do amido em células embriogênicas indica a aquisição da competência embriogênica, tal como o verificado neste trabalho.

### 3.2 Análise da expressão gênica de *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*) e *BBM* (*Baby Boom*) mediante qPCR

Após 15 dias da inoculação do calo embriogênico no meio líquido e consequente estabilização das ECSs, coletas quinzenais foram realizadas durante 75 dias.

A expressão de *SERK* e *BBM* não se manteve constante, havendo em ambos uma variação dessa expressão. *BBM* se manteve mais expresso que *SERK* até os 60 dias, quando a expressão de ambos voltou a declinar e com *SERK* mais expresso que *BBM* aos 75 dias (Figura 6).



**Figura 6** Expressão quantitativa relativa (RQ) de *SERK* e *BBM* em ECS de *C. arabica* cv. Catiguá cultivadas durante 75 dias; valores de RQ = média de triplicatas técnicas; controles endógenos = 14-3-3 e *GAPDH*.

O trabalho de Silva (2011) foi usado como parâmetro no presente estudo. Possíveis homólogos de *SERK* e *BBM* (*CaSERK* e *CaBBM*) foram identificados em materiais embriogênicos de *Coffea arabica* cv. Catiguá e relacionados ao crescimento de suspensões de células embriogênicas.

O autor obteve valores crescentes para *BBM* e *SERK* até 20 e 30 dias, respectivamente, sendo que *BBM* foi maior que *SERK* durante os 20 primeiros dias. Aos 30 e 40 dias, *SERK* alcançou valores máximos, visto que *BBM* declinou bastante. Aos 50 – 60 dias, período em que a expressão de ambos os genes estava em declínio, começou a se recuperar. O autor relata que após 15 dias para estabilização do inóculo das ECSs, coletas a cada 10 dias foram realizadas durante 60 dias. Em cada coleta, 1/6 do volume do meio de cultura foi renovado.

Diante dos resultados do presente estudo, observa-se que aos 30 dias *SERK* e *BBM* se mantinham expressos, e com a renovação do meio, a expressão de ambos declinou até aos 45 dias, possivelmente devido a um estresse causado pela adição de meio novo em novas condições, por exemplo, pH diferente do meio velho. Aos 45 dias, *BBM* continuava mais expresso que *SERK*. Com a renovação do meio, a expressão de ambos voltou a subir até aos 60 dias, ainda com *BBM* obtendo os maiores valores de expressão. Aos 60 dias, *BBM* ainda continuava mais expresso que *SERK*, e com a renovação do meio a expressão de ambos declinou até os 75 dias, sendo que *SERK* estava mais expresso que *BBM* ao final desse período (Figura 6).

Silva (2011) obteve valores semelhantes para *SERK*, que aos 30 dias mantinha-se expresso e com sua expressão crescente até os 40 dias, sendo que entre 40 e 50 dias a referida expressão estava em declínio. Aos 50 - 60 dias, a expressão de *SERK* e *BBM* voltou a subir.

Os picos de recuperação da expressão de ambos os genes (45 a 60 dias) talvez seja devido ao estresse nutricional crescente, mais rigoroso aos 60 dias. A partir do momento em que meio novo era disponibilizado para as células, uma modificação instantânea em suas condições físicas e químicas

acarretaria um estresse. Da mesma forma que, ao adicionar meio novo nas coletas seguintes, as células foram submetidas a outro estresse, e dessa forma, induziram o aumento da expressão dos genes.

A expressão de *BBM* esteve maior que a de *SERK* em todos os tempos de coleta, podendo talvez *BBM* estar relacionado com o estresse nutricional, já que esse gene está diretamente ligado ao estresse.

É importante ressaltar que condições estressantes são, em si, suficientes para induzir a embriogênese somática, visto que *BBM* codifica um fator de transcrição AP2/ERF específico de plantas. As proteínas ERF se relacionam a respostas contra estresses bióticos e abióticos (BOUTILIER et al., 2002; HEIDMANN et al., 2011; SILVA, 2011).

O declínio da expressão de ambos os genes ao final do período de 75 dias, possivelmente também se deu pela morte celular. Isso pode ser verificado pela morfologia das células, caracterizadas pela presença de células não embriogênicas, sendo essas alongadas e vacuoladas na periferia dos aglomerados (Figura 2D) e formando aglomerados de células alongadas e vacuoladas (Figura 4B). A baixa frequência de grãos de amido (Figura 3D) nas células indica a baixa atividade energética, não sendo mais viáveis para a aquisição embriogênica (MOURA et al., 2008; STEIN et al., 2010; STEINMACHER et al., 2011).

Mesmo em declínio, *SERK* apresentou-se ligeiramente mais expresso que *BBM* aos 75 dias. *SERK* é expresso sob uma auxina (geralmente 2,4-D) ou outro regulador de crescimento (SANTOS; ARAGÃO, 2009; SAVONA et al., 2011). Essa expressão possivelmente se deu devido a algumas células vivas e que ainda mantinham seu potencial embriogênico, como mostrado na Figura 4B pela presença dos aglomerados embriogênicos junto das células não embriogênicas aos 75 dias de cultivo.

Além disso, pertencem à superfamília de receptores kinases em vegetais (*RLK-Receptor like kinases*) (ALBRECHT et al., 2008; KOEHLER, 2010; PEREIRA, 2010; SAVONA et al., 2011; SCHMIDT et al., 1997).

Receptores kinases são fundamentais nos vários processos do desenvolvimento vegetal, pois atuam nas rotas de transdução de sinais gerando respostas celulares a sinais externos (BAUDINO et al., 2001; KOEHLER, 2010). No presente estudo, as células mostraram resposta a sinais externos, como por exemplo, o estresse ocasionado pela renovação do meio de cultura, gerando a transdução de sinal.

Pereira (2010) identificou e determinou o padrão de acúmulo de mRNA correspondente ao gene que codifica a proteína *SERK* em soja, em cotilédones imaturos mantidos em meio de cultivo para indução de embriões somáticos. O autor relata que o fim da expressão de *GmSERK1* é detectado no estágio de transição do pró-embrião e que essa expressão transiente é condizente com a hipótese de que a proteína *SERK* seja responsável pela transdução do sinal presente no meio de cultura, desencadeando o processo de embriogênese somática.

Os resultados do presente estudo permitem identificar uma relação transiente de indução entre *SERK* e *BBM* durante o crescimento da suspensão celular. Aos 30 dias, a maior expressão de *BBM* em relação à *SERK*, e a partir dos 60 dias, a maior expressão de *SERK* em relação ao *BBM*. *BBM* funciona como indutor da expressão de *SERK*, visto que *BBM* codifica um fator de transcrição AP2/ERF que induz a expressão de genes associados à embriogênese, bem como se associa à proliferação e organização celular em regiões de crescimento, assim como *SERK*, que se associa à alta taxa mitótica nessas regiões.

O nível de expressão do *BBM* estava alto aos 30 dias, quando meio novo foi oferecido às células. Consequentemente mais auxina foi oferecida e assim a expressão de *SERK* diminuiu, destacando que outro fator de estresse às células foi a presença dos reguladores de crescimento. Silva (2011) relata que a auxina provoca acidificação da parede celular e induz à metilação do DNA.

Dessa forma, o estresse gerado provoca um estado metabólico que induz à expressão de *BBM* a partir dos 45 dias. Com o aumento das proteínas

AP2/ERF, a expressão de *SERK* é também induzida e com o aumento da LRR-kinase e da ativação do mecanismo de transdução de sinais (que ocorre no momento da adição de meio de cultura novo), um novo estado de estresse metabólico se forma e acarreta a queda na expressão de *BBM*, induzindo também a expressão de *SERK* aos 60 dias.

Diante do exposto, a renovação de 90% do meio ocasiona um nível de estresse às células, com relação direta na expressão dos genes, não permitindo aos genes sua expressão natural. A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura possivelmente também influenciou na queda de *SERK*.

O tempo de renovação do meio pode ser feito de 10 em 10 dias, como relatado por Silva (2011), sendo que nas renovações feitas de 15 em 15 dias, as células ficam muito tempo na presença de baixa depleção de nutrientes, o que também pode ocasionar estresse forçado às células. Além disso, havendo demora na renovação do meio, as células diminuem sua taxa de multiplicação e células velhas e/ou mortas ficam misturadas às células novas, como mostrado na Figura 2D e 4B.

A técnica de cultura de tecidos ocasiona aos explantes um nível de estresse significativo, uma vez que eles são retirados do seu ambiente original e colocados num meio contendo concentrações não fisiológicas dos reguladores de crescimento, sais e componentes orgânicos. O resultado desse estresse depende de dois fatores principais: o nível de estresse causado e o estado fisiológico das células. Se o nível de estresse ultrapassa a tolerância celular, as células morrem. Ao contrário, baixos níveis de estresse são capazes de ativar mecanismos que irão induzir as células às novas condições (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003).

A indução da embriogênese somática em diferentes espécies vegetais é realizada em condições ideais, que são geralmente descobertas por meio de testes que visam analisar os efeitos de diferentes fatores no desenvolvimento de respostas morfogenéticas do explante, tais como reguladores de crescimento, equilíbrio osmótico, pH e concentrações de nutrientes. Com isso, é possível determinar qual é a melhor combinação dos fatores e estabelecer protocolos de regeneração mais eficientes, lembrando que a frequência de indução de embriões não depende apenas das condições de cultivo, mas também do genótipo (cultivar/espécie), tipo de explante, estágio de desenvolvimento e níveis endógenos de hormônios (NAMASIVAYAM, 2007; PEREIRA, 2010).

#### 4. Conclusões

Foram identificados em todas as amostras de ECS aspectos embriogênicos: células em divisão e de tamanho pequeno, isodiamétricas, citoplasma denso, núcleos grandes e nucléolos evidentes, pequenos vacúolos e presença expressiva de grãos de amido. A renovação do meio não influenciou no aspecto morfológico dessas.

As análises de expressão dos genes sugerem uma relação transiente de indução entre *SERK* e *BBM* durante o crescimento da suspensão celular.

A renovação quinzenal de 90% do meio de cultura ocasiona um nível de estresse às células, com relação direta na expressão dos genes, ou seja, não permite aos genes sua expressão natural. Novos estudos serão realizados para avaliar as quantidades possíveis de meio de cultura a ser disponibilizado para as células.

## REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, C. et al. Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 148, n. 1, p. 611-619, Sept. 2008.
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.
- BAUDINO, S. et al. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 1, p. 1-10, May 2001.
- BOUTILIER, K. et al. Ecotopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, Aug. 2002.
- CARVALHO, J. M. F. C.; GONZÁLEZ-BENITO, E.; PEREZ, C. Análise histológica de calogênese e embriogênese das cultivares de algodão cnpa precoce 2 e coker 312. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 5, n. 1, p. 235-239, jan./abr. 2001.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture.** 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 510 p.
- GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, L. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA, 1999. v. 2, p. 533-568.
- HEIDMANN, I. et al. Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 6, p. 1107-1115, June 2011.

KOEHLER, A. D. **Reprodução em *Brachiaria* spp.: *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase)** no desenvolvimento da antera, do ovário e na embriogênese. 2010. 110 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MOURA, E. F. et al. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 95, p. 175-184, July 2008.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 90, n. 1, p. 1-8, July 2007.

PEREIRA, D. A. **Caracterização e expressão do gene *SERK* durante a indução de embriogênese somática em soja**. 2010. 61 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. et al. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 12, p. 1141-1149, Dec. 2002.

RIBAS, A. F. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 92, p. 1-15, May 2011.

SAMSON, N. P. et al. Effect of primary culture medium composition on high frequency embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 37-45, 2006.

SANTOS, M. O.; ARAGÃO, F. J. L. Role of *SERK* genes in plant environmental response. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 4, n. 12, p. 1111-1113, Dec. 2009.

SAVONA, M. et al. Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 471-488, Jan. 2011.

SCHMIDT, E. D. et al. A leucinerich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, May 1997.

SILVA, A. T. **Análise da expressão dos genes baby boom (BBM) e somatic embryogenesis receptor kinase (SERK) envolvidos na embriogênese somática do cafeeiro.** 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

STEIN, V. C. et al. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 5, p. 789-796, mar. 2010.

STEINMACHER, D. A. et al. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 108, n. 8, p. 1463-1475, Aug. 2011.

TEIXEIRA, J. B. et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática.** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39 p. (Documentos, 121).

## ANEXOS

Anexo 1 – Composição do meio primário PM para indução de calos primários (TEIXEIRA et al., 2004).

<b>Constituinte</b>	<b>Concentração final (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
KNO <sub>3</sub>	950
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	11,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Fonte de ferro</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13,9
Na <sub>2</sub> EDTA	18,65
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	100
Tiamina (HCl)	10
Glicina	1
Piridoxina	1
Extrato de malte	400
Caseína hidrolisada	100
Ácido nicotínico	1
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
2,4-D (µM)	20,0
IBA (µM)	4,92
2-iP (µM)	9,84
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	20
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,7 – 5,8

Anexo 2 – Composição do meio secundário SM para indução de calos embriogênicos (TEIXEIRA et al., 2004).

<b>Constituinte</b>	<b>Concentração final (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
KNO <sub>3</sub>	950
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	11,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Fonte de ferro</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13,9
Na <sub>2</sub> EDTA	18,65
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	100
Tiamina (HCl)	10
Glicina	1
Piridoxina	1
Extrato de malte	400
Caseína hidrolisada	100
Ácido cítrico	500
Ácido nicotínico	1
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
2,4-D (µM)	10,0
IBA (µM)	4,92
2-iP (µM)	9,84
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	20
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,7 – 5,8

Anexo 3- Composição do meio MM para multiplicação das ECS (TEIXEIRA et al., 2004).

<b>Constituinte</b>	<b>Concentração final (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
KNO <sub>3</sub>	950
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	11,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Fonte de ferro</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13,9
Na <sub>2</sub> EDTA	18,65
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	100
Tiamina (HCl)	10
Glicina	1
Cisteína	10
Piridoxina	1
Extrato de malte	200
Caseína hidrolisada	100
Ácido cítrico	500
Ácido nicotínico	1
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
2,4-D (µM)	5,0
IBA (µM)	4,92
2-iP (µM)	9,84
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	20
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,7 – 5,8

Anexo 4 - Composição do meio PGR1 para indução de calos primários (SAMSON et al., 2006).

<b>Constituinte</b>	<b>Concentração final (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	250
KNO <sub>3</sub>	400
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	160
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	90
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	90,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,3
<b>Fonte de ferro</b>	
Fe-EDTA solution (100 x) (Sigma)	5
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	130
Ac. Nicotínico	1
Piridoxina (HCl)	1
Tiamina (HCl)	15
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
BAP (µM)	4,65
2,4-D	2,25
2-iP	4,93
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	30
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,7 – 5,8

Anexo 5 - Composição do meio E para indução de calos embriogênicos (SAMSON et al., 2006).

<b>Constituinte</b>	<b>Concentração final (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
KNO <sub>3</sub>	950
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	11,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Fonte de ferro</b>	
Fe-EDTA solution (100 x) (Sigma)	5
<b>Suplementos orgânicos</b>	
Mio-inositol	200
Tiamina (HCl)	20
Glicina	20
Cisteína	40
Adenina	60
Extrato de malte	800
Caseína hidrolisada	200
<b>Reguladores de Crescimento</b>	
BAP (µM)	17,75
2,4-D	4,50
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	30
<b>Agente geleificante</b>	
ágar (g. L <sup>-1</sup> )	6
<b>pH</b>	5,7 – 5,8