



LUCIENE DE OLIVEIRA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES
CELULARES E OBTENÇÃO DE SEMENTES
SINTÉTICAS DE *Coffea arabica* cv. Catiguá**

LAVRAS - MG

2014

LUCIENE DE OLIVEIRA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES E OBTENÇÃO
DE SEMENTES SINTÉTICAS DE *Coffea arabica* cv. Catiguá**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientador
Prof. Dr. Breno Régis Santos

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Ribeiro, Luciene de Oliveira.

Caracterização de suspensões celulares e obtenção de sementes sintéticas de *Coffea arabica* cv. Catiguá / Luciene de Oliveira Ribeiro. – Lavras : UFLA, 2014.

87 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Café. 2. Embriogênese somática. 3. Histologia. 4. Marcador molecular. 5. Sementes sintéticas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.52

LUCIENE DE OLIVEIRA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES E OBTENÇÃO
DE SEMENTES SINTÉTICAS DE *Coffea arabica* cv. Catiguá**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 22 de julho de 2014.

Prof. Renato Paiva, PhD	UFLA
Prof. Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL-MG
Prof ^a . Dra. Ana Hortência F. Castro	UFSJ
Dr. Leonardo Augusto Z. Rodrigues	UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
(Orientador)

LAVRAS - MG

2014

“E agora, eis o que diz o Senhor, aquele que te criou Jacó, e te formou, Israel: Nada temas, pois eu te RESGATO, eu te chamo pelo nome, és meu. Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo. E os rios não te submergirão; se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá. Pois eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, teu Salvador. Dou o Egito por teu RESGATE, a Etiópia e Sabá em compensação.” (Is 43, 1-3)

A Deus, que cumpre suas promessas e me permite atravessar o mar!

Aos meus pais, João Batista e Maria Nilcéia, e minha irmã Flaviane pelo amor incondicional, sem o qual jamais teria conseguido chegar até aqui.

À Comunidade Mariana Resgate por todo apoio, compreensão e por ser presença de Deus em minha vida, principalmente nas horas mais difíceis.

OFEREÇO.

Ao Deiverson, por ser paciente e me mostrar que o amor tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, O Todo Poderoso e Amoroso, que fez em mim grandes coisas.

À Nossa Senhora, minha Mãe amada, por ser exemplo de Mulher.

Aos meus pais, João e Nilcéia, minha irmã Flaviane e familiares por todo suporte, incentivo, carinho e amor.

À Comunidade Mariana Resgate, especialmente à Danusa, com a qual descobri a força dos laços espirituais que nos une.

Ao Deiverson, meu futuro esposo, por me proporcionar a felicidade nas pequenas coisas do dia a dia.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG pelos recursos utilizados na condução dos experimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Breno Régis Santos pela coorientação e conselhos.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Sandro Barbosa e Lenise pela amizade, apoio e direção dada, sem a qual nada seria possível.

Às amigas e companheiras, Luana, Natália e Flávia, um agradecimento especial por todo suporte, amizade, aprendizado e paciência.

A todos do LCBM e LFMP, Luciana, Leo, Heliete, Benito, Paulo, Guilherme, Wesley, Lara, Chaiane, Evânia, Fabrício, Kalynka, Jéssica, Marlúcia, Raíssa, Ciro, Cris, Rafael, Bárbara, Cecílio pela ajuda e companheirismo.

Aos amigos do BIOGEN, em especial ao Renan por toda competência e ajuda nos experimentos de sementes sintéticas.

Ao Prof. Luiz Alberto Beijo por toda prontidão e ajuda nas análises estatísticas.

Aos irmãos e irmãs da Casa Geradas por Maria e Casa São José por se tornarem tão essenciais em minha vida.

Às amigas da república, Flaviane, Ana, Maiara, Mariana e Bárbara pela paciência e incentivo.

Aos amigos e familiares de Ilicínea, Muzambinho, Alfenas e Lavras, em especial aos amigos de graduação, mestrado, doutorado, CMR, GOU, PUCA e Setor de Fisiologia Vegetal.

AGRADEÇO.

RESUMO

Objetivou-se nesse trabalho analisar as características histológicas, moleculares e a capacidade de regeneração de suspensões celulares embriogênicas, bem como a otimização de um protocolo para produção de sementes sintéticas a partir de embriões somáticos de *C. arabica* cv. Catiguá. Não foram observadas diferenças nos aspectos histológicos das amostras analisadas, bem como na relação da expressão dos genes analisados com o potencial regenerativo das ECS. Contudo, foi possível observar uma relação transiente de indução entre *BBB* e *SERK*, altos níveis de expressão de *SERK* nos diversos estádios de desenvolvimento dos embriões, níveis basais de expressão do *WUS* em todas as amostras de ECS mostrando-se significativamente expresso a partir do estágio cordiforme/torpedo. Foi possível identificar que linhagens de ECS tidas como embriogênicas pelo aspecto visual não se comportaram da mesma maneira quanto aos padrões de regeneração. Nas pesquisas realizadas observou-se que a maturação dos embriões em meio MGM líquido é favorável para a obtenção de embriões somáticos no estágio torpedo e cotiledonar, frente a este mesmo meio no estado sólido. Em relação à produção de sementes sintéticas, resultados apontam para a utilização da técnica convencional de encapsulamento, porém com a adição de solução nutritiva DEV na matriz de encapsulamento, para uma taxa de conversão das sementes sintéticas em plântulas de 77,5%.

Palavras-chave: Café. Embriogênese somática. Histologia. Marcador molecular. Sementes sintéticas.

ABSTRACT

We analyzed, in this work, the histological and molecular characteristics, and the regeneration capacity of embryogenic cell suspensions, as well as the optimization of a protocol for synthetic seeds production, from somatic embryos of *C. arabica* cv. Catiguá. According to the results, there was no differences, either in the histological aspects of the samples or in the relation of gene expression with the regenerative potential of ECS. However, we found a transient induction of relation between BBB and SERK, high levels of SERK expression in the various stages of embryos development, and basal levels of WUS expression for all samples of ECS, by being significantly expressed from the cordiforme/torpedo stage. It was possible identifying that lineages of ECS, known as embryogenics by their visual appearance, did not act the same way when analyzed their regeneration patterns. We also found that the embryos maturation on liquid MGM culture medium was favourable for somatic embryos obtaining in the torpedo and cotyledonary stages, better than on solid MGM culture medium. Therefore, regarding the production of synthetic seeds, results pointed out to the use of conventional techniques of encapsulation, but, with the addition of DEV nutritive solution on the encapsulating matrix for a conversion rate of synthetic seeds on seedlings of 77.5%.

Keywords: Coffee. Somatic embryogenesis. Histology. Molecular marker. Synthetic seeds.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	32
	REFERÊNCIAS	33
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	47
	ARTIGO 1 Expressão dos genes <i>SERK</i> , <i>BBM</i> e <i>WUS</i> em suspensões celulares e embriões somáticos de <i>Coffea arabica L. (Planta)</i>	48
	ARTIGO 2 Desenvolvimento de protocolo para propagação de <i>Coffea arabica</i> via sementes sintéticas (<i>Ciência e Agrotecnologia</i>)	69

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A produção de café e, conseqüentemente, a economia cafeeira destaca-se no cenário brasileiro, pois atua na geração de milhares de empregos diretos e indiretos, além de posicionar o país como o maior produtor e exportador mundial dessa *commodity*. Diversos fatores influenciam a qualidade do grão e da bebida, sendo os fatores ambientais os principais responsáveis pela qualidade do sabor, do aroma e do corpo da bebida, consumida diariamente por mais de um bilhão de pessoas no mundo.

Os programas de melhoramento genético do cafeeiro têm obtido cultivares mais produtivas e resistentes a estresses. Porém, os métodos convencionais demandam tempo e recursos financeiros os quais se tornam fatores limitantes para o melhoramento do cafeeiro uma vez que problemas como doenças e pragas, além da maior exigência em qualidade pelo mercado consumidor são, a cada dia, mais desafiantes. Assim, técnicas de cultivo *in vitro* surgem como uma alternativa viável para a solução desses problemas.

A embriogênese somática tem sido empregada eficientemente na obtenção de embriões os quais podem ser usados em diversas aplicações biotecnológicas inclusive como alvo para eventos de transformação genética e produção de sementes sintéticas. A suspensão de células embriogênicas ou “*Embryogenic cell suspension (ECS)*” é obtida por meio de calos embriogênicos e se caracterizam por milhares de glomérulos celulares mantidos em meio líquido e agitação constante. A metodologia para obtenção e manutenção deste tipo de material vegetal é conhecida, mas os protocolos são genótipo-dependente, o que torna necessário o desenvolvimento de protocolos específicos.

O estudo do desenvolvimento do material embriogênico por meio de análises histológicas e de marcadores moleculares ligados aos eventos embriogênicos são úteis para os trabalhos de obtenção de protocolos de ECS.

Dentre os genes relacionados à embriogênese somática, destacam-se o gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*), relacionado à transdução de sinal em células embriogênicas, o gene *BBM* (*Baby Boom*), que induz a formação espontânea de embriões somáticos e o gene *WUS* (*WUSchel*), que está ligado à transição do estado vegetativo para embriogênico e/ou mantém a identidade das células embriogênicas. A confirmação do potencial embriogênico das ECS se dá, de maneira mais conclusiva, pela regeneração das mesmas em plantas. Técnicas pré-estabelecidas, utilizando meios nutritivos e condições de cultivo adequadas, fornecem excelentes resultados na obtenção de plantas provenientes de suspensões celulares embriogênicas.

A produção de sementes sintéticas vem se destacando como uma importante técnica para a micropropagação de várias espécies, pois permite a manutenção da identidade genética do material vegetal e a rápida multiplicação dos propágulos além de facilitar a troca de germoplasma entre instituições de pesquisa e a conservação de genótipos desejáveis a baixos custos sob condições *in vitro*. A produção das sementes sintéticas acontece por meio do encapsulamento de embriões somáticos ou qualquer outro tecido meristemático que possua a capacidade de se converter a uma planta normal em condições *in vitro* ou *ex vitro*.

Sendo assim, objetivou-se nesse trabalho analisar periodicamente as características histológicas, moleculares e a capacidade de regeneração de suspensão celular embriogênica (ECS), bem como a otimização de um protocolo para produção de sementes sintéticas a partir de embriões somáticos de *C. arabica* cv. Catiguá.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O cafeeiro é uma planta perene pertencente ao gênero *Coffea*, à família Rubiaceae, havendo numerosas variedades e cultivares, tendo como centro de origem regiões tropicais e subtropicais do continente africano. Trata-se de uma planta com porte arbustivo que pode atingir quatro metros ou mais de altura, apresenta sistema radicular profundo, amplamente ramificado nas primeiras camadas do solo. Os ramos primários são longos e flexíveis, apresentando abundante ramificação. Os frutos produzidos são do tipo drupa, contendo, normalmente, duas sementes que representam seu produto econômico (ALVES, 2008; SANTOS et al., 2003).

O gênero *Coffea* é formado por cerca de 100 espécies, mas apenas duas têm importância econômica: *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre (café robusta). Os plantios comerciais, em sua grande maioria, são de *C. arabica*, a primeira espécie descrita para o gênero e até hoje a mais importante comercialmente, principalmente pela qualidade superior da bebida, características aromáticas e baixo conteúdo de cafeína comparado ao café robusta (BRIDSON, 1994; MISHRA; SLATER, 2012).

O cafeeiro é cultivado em treze Estados brasileiros, mas 95% da produção se concentram em apenas seis: Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia. A produção de café arábica em 2013, estimada em mais de 36 milhões de sacas, corresponde a 74,9% do volume de café produzido no país e tem como maior produtor o Estado de Minas Gerais com 25,21 milhões de sacas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2013).

O parque cafeeiro nacional é composto por mais de 5,6 bilhões de cafeeiros plantados, em 2,1 milhões de hectares, criando aproximadamente 10 milhões de empregos diretos e indiretos (KIST et al., 2011). O café é

responsável por um dos mais importantes e diversificados complexos agroindustriais do Brasil, incluindo os fornecedores de insumos, máquinas, equipamentos, produtores primários, cooperativas, empresas de processamento, exportadores, empacotadores, empresas de assistência técnica, compradores internacionais, corretores e consumidores (CARVALHO, 2011).

O cultivo de *C. arabica* é geralmente afetado por diversos insetos, como o bicho-mineiro, cigarras, cochonilhas, lagarta dos cafezais e broca-do-café, além de vários patógenos como fungos e nematoides endoparasíticos, que causam enormes prejuízos aos produtores (ZAMBOLIN, 2003). Diante disso, os programas de melhoramento genético têm colocado à disposição dos cafeicultores variedades mais resistentes a doenças e pragas, o que favorece a redução do uso de agrotóxicos, redução de perdas nas produções e garantem melhor rentabilidade. Por outro lado, o período para o desenvolvimento de genótipos superiores de café é longo e trabalhoso, o que torna necessária a utilização de novas tecnologias que permitam o alcance desse objetivo mais rapidamente além de permitir uma rápida chegada desse produto ao campo (PEREIRA et al., 2003).

Técnicas de cultivo *in vitro* surgem como uma alternativa viável para a propagação clonal em larga escala além de configurarem importantes instrumentos para a produção de plantas livres de patógenos, modificação genética, resgate de embriões, conservação de germoplasma e produção de metabólitos secundários (FERREIRA et al., 2005).

2.1 Embriogênese somática

A embriogênese somática é resultado do desenvolvimento de embriões a partir de células que não sofreram fusão gamética (AMMIRATO, 1983; PEREIRA et al., 2003). De acordo com Rodrigues e Kerbauy (2009), a

manifestação da totipotencialidade vegetal na embriogênese somática envolve a desdiferenciação das células somáticas, por meio da qual são alterados os perfis de transcrição gênica e de tradução proteica, permitindo o estabelecimento de um novo programa de desenvolvimento.

Segundo Guerra, Torres e Teixeira (1999), tanto embriões somáticos quanto embriões zigóticos, possuem os mesmos padrões de desenvolvimento, ou seja, passam pelos estádios globular, cordiforme/torpedo e cotiledonar. Por esse motivo, a embriogênese somática, além de permitir a propagação massal visando à conservação e melhoramento genético, também pode ser utilizada para estudos básicos de biologia do desenvolvimento.

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). Dentre as vantagens e aplicações da embriogênese somática destacam-se: obtenção de grande quantidade de propágulos (embriões somáticos), possibilidade de alto grau de automatização do sistema permitindo baixar o custo efetivo da produção em larga escala, armazenamento dos propágulos por um longo prazo por meio da criopreservação, utilização das culturas para isolamento e fusão de protoplastos, produção de sementes sintéticas e para transformação genética (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A embriogênese somática no cafeeiro pode ser realizada por meio de duas rotas de desenvolvimento: direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente dos tecidos matrizes; e indireta, na qual os embriões somáticos formam-se a partir de calos, uma massa de células com crescimento desordenado (BARTOS, 2012). Essas células apresentam um conjunto de características

comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa. A metodologia de embriogênese somática indireta é bastante promissora, no entanto, ainda precisa ser otimizada e adaptada para a realidade encontrada na produção em larga escala (DONATO et al., 2000).

Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas estão diretamente envolvidas na indução de embriões somáticos, estimulando a totipotência das células competentes e auxiliando na formação de agregados embriogênicos (NOGUEIRA et al., 2007). Para o desenvolvimento dos embriões nos estádios subsequentes ao globular, faz-se necessário a transferência do material para um meio com baixa concentração ou desprovido de auxina (MURASHIGE; SKOOG, 1962; FILONOVA et al., 2000). Contudo, vale ressaltar que as condições experimentais que induzem as células somáticas a adquirirem o potencial embriogênico são específicas ao genótipo, o que dificulta a obtenção dos protocolos. Para a indução das células embriogênicas em *Coffea*, tem-se adotado duas estratégias: 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).

A embriogênese somática pode ser obtida em meio líquido por meio da utilização de suspensões celulares. Geralmente estas suspensões celulares podem ser iniciadas pela inoculação de calos friáveis em meio líquido e sob agitação. Assim, a cultura de células ou suspensão celular é uma técnica que permite a indução, propagação e manutenção de células em meio líquido, as quais apresentam taxas de divisão muito mais elevadas do que as cultivadas de maneira convencional (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; MATSUMOTO, 2006; GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Em *C. arabica*,

diversos autores descreveram protocolos de embriogênese visando à otimização da multiplicação de setores embriogênicos. Estudos foram realizados utilizando meio gelificado, porém, a taxa de multiplicação mostrou-se muito baixa para seu uso na produção de mudas de cafeeiro em larga escala (BOXTEL; BERTHOULY, 1996; SÖNDAHL, SHARP, 1977). Em vista disso, desde os primeiros trabalhos com cafeeiro, houve várias tentativas para estabelecer protocolos de multiplicação em meio líquido, proporcionando às culturas um aumento da disponibilidade de água e nutrientes e diminuindo a resistência à difusão desses componentes, quando comparados a meios nutritivos de consistência sólida (STARITSKY; HASSELT, 1980).

2.1.1 Caracterização histológica de células embriogênicas

Com o emprego de técnicas inerentes à anatomia vegetal é possível estudar as estruturas internas do corpo das plantas, permitindo a descrição de células, tecidos e órgãos quanto à sua ontogênese, constituição e função. Pesquisas nessa área do conhecimento podem auxiliar na compreensão de diversos fenômenos relacionados aos organismos vegetais, dentre os quais as respostas ao cultivo *in vitro*, como o desenvolvimento de gemas adventícias (organogênese), definição da origem direta ou indireta e embriogênese somática (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2003; RODRIGUES; OLIVEIRA; MARIATH, 2004). No cultivo *in vitro*, as plantas podem apresentar características peculiares como abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, reduzida capacidade de sustentação (esclerênquima e colênquima) e outros tipos de desordens (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996).

Estudos histológicos possibilitam a observação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos, permitindo acompanhar as

respostas embriogênicas. As massas proembriogênicas, ou seja, aglomerados celulares capazes de produzir embriões somáticos, caracterizam-se por serem células pequenas (100-200 μm), isodiamétricas, possuem alta razão núcleo/citoplasma (citoplasma denso e núcleo grande), cujos núcleo e nucléolo são densamente corados, sistema celular organizado, microvacúolos e amiloplastídeos, assemelhando-se com as células meristemáticas. As propriedades histoquímicas destas células sugerem intensa atividade metabólica e de síntese de RNA (TISSERAT; ESAN; MURASHIGE, 1979; SHARP; EVANS; SONDAHL, 1982; VASIL, 1982). Células não embriogênicas apresentam-se, na maioria dos casos, como células grandes, alongadas, vacuoladas, com espaços intercelulares e sistema celular desorganizado, não sendo viáveis (FIGUEIREDO, 2007; NOGUEIRA et al., 2007; SILVA, 2009). No cafeeiro, estudos histológicos da embriogênese somática indireta corroboram com esses dados, mostrando que dois grupos de células aparecem sucessivamente no calo – um com células maiores, altamente vacuolizadas (calo não-embriogênico), e outro com células menores, isodiamétricas, com núcleo proeminente e citoplasma denso (calo embriogênico) (MICHAUX-FERRIERE et al., 1989; BIEYSSE; GOFFLOT; MICHAUX-FERRIERE, 1993; TAHARA et al., 1995).

Na microscopia fotônica, vários corantes são utilizados em análises histológicas para a identificação e caracterização das massas proembriogênicas. O corante azul de toluidina reage com os componentes das membranas celulares, núcleo e nucléolo, identificando as células isodiamétricas e citoplasma denso, resultando em produtos corados de azul e violeta. Além disso, é possível visualizar a parede celular, possibilitando a análise dos tecidos do embrião somático, o meristema fundamental, procâmbio e protoderme que indicam a formação normal dos embriões e o estágio de desenvolvimento (O'BRIEN;

FEDER; MCCULLY, 1964; FILLIPI; APPEZZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001; MOURA, 2007).

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).

2.1.2 Genes marcadores da embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser dividida nas fases de indução e expressão, sendo que na fase de indução, células somáticas diferenciadas adquirem a competência e proliferam como células embriogênicas que, na fase de expressão, diferenciam-se para formar embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2001). A indução da embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica dos explantes, com reprogramação das células que estarão envolvidas no processo embriogênico (MERKLE; PARROTT; FLINN, 1995) (Figura 1).

Os genes de sensibilidade seriam aqueles envolvidos na codificação de receptores e transdução do sinal para auxinas e citocininas. Os genes de metabolismo hormonal (que codificam enzimas de biossíntese e/ou degradação de hormônios) são os responsáveis pelo estabelecimento de um balanço hormonal endógeno necessário para a regeneração. Genes homeóticos controlam a formação de órgãos. A expressão desfavorável de qualquer uma dessas classes de genes seria suficiente para impedir a regeneração de um determinado explante (CHRISTIANSON; WARNICK, 1988).

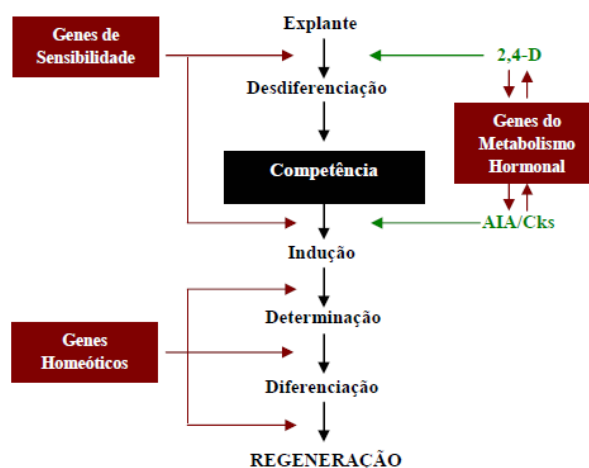


Figura 1 Estádios onde atuam diferentes genes que influenciam a embriogênese somática.

O potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelas condições de cultivo *in vitro* tais como o meio de cultura, qualidade do explante, entre outros (LOYOLA-VARGAS et al., 1999). Um dos principais fatores de indução da embriogênese somática é o balanço entre reguladores de crescimento, substâncias sintéticas largamente utilizadas na cultura de tecidos vegetais, que mimetizam os efeitos dos hormônios no metabolismo celular (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os hormônios são importantes mediadores na transdução de sinais, sendo que o mesmo hormônio pode ocasionar respostas diferentes em diversos tecidos ou fases de desenvolvimento. Estes exercem sua ação por meio do reconhecimento de receptores específicos presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Assim, os processos de desenvolvimento são o resultado de um complexo controle espacial e temporal, em que vários hormônios atuam na regulação da expressão de múltiplos genes (BARENDSE; PEETERS, 1995).

Embora as auxinas sejam os principais indutores, citocininas ou ácido abscísico, ou mesmo a ausência de reguladores podem induzir a resposta embriogênica. Além destas condições, a frequência de indução depende também do genótipo e do estágio de desenvolvimento do explante, bem como dos teores de fitormônios endógenos, concentrações osmóticas, de pH, aminoácidos, sais e outros. De acordo com Dudits et al. (1995), ferimentos, alta concentração salina, íons de metais pesados ou estresse osmótico influenciaram positivamente na indução de embriões somáticos em várias espécies de plantas. Estes procedimentos foram acompanhados por um aumento da expressão de diversos genes relacionados com o estresse, corroborando com a hipótese de que a embriogênese somática é um processo de adaptação das células vegetais cultivadas *in vitro*. Em função dos diversos tratamentos indutores é pouco provável que uma única molécula seja responsável pela competência embriogênica (SILVA, 2011).

Células competentes são aquelas que ainda não completaram a transição do estado somático para embriogênico. Estas devem conter um receptor inativo, o qual seria ativado pela presença de um ligante próprio para disparar o programa embriogênico, ou seja, competência celular está associada com a dediferenciação de células somáticas que lhes permite responder a novos sinais de desenvolvimento (TOONEN et al., ; FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003). Células embriogênicas são células que completaram sua transição para um estado no qual estímulos exógenos (como reguladores de crescimento) são suficientes para produzir o embrião somático (JONG; SCHMIDT; VRIES, 1993; KOMAMINE et al., 1992).

Esforços têm sido feitos para se descrever a embriogênese em nível molecular e muitos estudos têm empregado diferentes técnicas de *screening* para identificar os genes envolvidos, dentre os quais se pode citar: genes *housekeeping* que estão envolvidos na expressão de outros genes como H3-1

(histonas) e Top I (DNA topoisomerase), genes de resposta hormonal (homólogos de *pJCWI e 2*, induzíveis por auxina), genes de mutantes zigóticos (*LEC e PKL*), entre outros (CHUGH; KHURANA, 2002).

Um dos resultados de fundamental importância no estudo do desenvolvimento embrionário é a geração de marcadores moleculares relacionados com os eventos de diferenciação celular durante a formação e desenvolvimento do embrião (ZIMMERMAN, 1993). Marcadores moleculares são definidos como quaisquer fenótipos moleculares oriundos de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, e a análise destes marcadores 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 (SILVA, 2011). *SERK*, *BBM* e *WUS* são alguns dos genes relacionados à embriogênese somática. O gene *SERK* tem sido amplamente associado à embriogênese somática, bem como às respostas das plantas a estímulos bióticos e abióticos (SANTOS, ARAGÃO, 2009). O gene *BBM* induz a formação espontânea de embriões somáticos. O gene *WUS* está ligado à transição do estado vegetativo para embriogênico e/ou mantém a identidade das células embriogênicas (SILVA, 2011).

O gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) foi primeiramente descrito em culturas de células de cenoura (*DcSERK*) (SCHMIDT, 1997), sendo posteriormente identificado em diversas espécies (SALAJ et al., 2008; SHARMA et al., 2008; NOLAN; KURDYUKOV; ROSE, 2009; SILVA, 2011). O produto do gene *SERK* é uma proteína quinase transmembrana que apresenta um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio quinase intracelular. Essas proteínas pertencem à

superfamília de receptores do tipo quinase (RLK-Receptor like kinases) e estão envolvidas em rotas de transdução de sinais (SANTOS et al., 2005; SHARMA et al., 2008; PÉREZ-NUNEZ et al., 2009; SANTOS, ARAGÃO, 2009). Sugere-se que este gene é um marcador para a competência das células somáticas se tornarem embriogênicas, sendo que sua expressão se dá no início do processo de indução da embriogênese somática até o estágio de embrião globular (PEREIRA, 2010; SCHMIDT et al., 1997). O padrão de expressão de *SERK* em diversas culturas sugere que este desempenha papel fundamental na rota de sinalização associada a alterações no desenvolvimento celular em resposta a condições de cultivo. Essas alterações envolvem a iniciação da divisão celular e reprogramação celular (SANTOS, ARAGÃO, 2009). Estudos de silenciamento pós-transcricional do gene *SERK* em *Lactuca sativa* L. evidenciaram que as plantas apresentaram redução na capacidade de formar embriões somáticos e se mostraram mais suscetíveis a ataques de patógenos (SANTOS et al., 2009). Por outro lado, o aumento da capacidade para embriogênese somática e resistência a fungos foi observado com a superexpressão de *SERK* em *Oriza sativa* (HU; XIONG; YANG, 2005).

O gene *BBM* (*Baby Boom*), isolado primeiramente a partir de culturas de embriões de micrósporos de *Brassica napus* (BOUTILIER et al., 2002), codifica um fator de transcrição específico de plantas que pertence à família gênica AP2/ERF e que regula vários genes relacionados ao processo embriogênico e à proliferação celular em regiões meristemáticas (PASSARINHO et al., 2008). As proteínas AP2/ERF estão relacionadas a processos embriogênicos (membros da subfamília AP2) e a processos de estresses bióticos e abióticos (membros da subfamília ERF) (ZHOU; TANG; MARTIN, 1997; LIU, 1998; STOCKINGER, GILMOUR; THOMASHOW, 1997). De acordo com Boutilier et al. (2002), a expressão ectópica de *BBM* em plantas transgênicas induziu a formação de estruturas semelhantes a embriões somáticos, nas bordas dos cotilédones e

folhas, bem como os fenótipos pleiotrópicos, incluindo o crescimento anormal, regeneração de plantas a partir de explantes sem adição de reguladores e anormalidades na morfologia de folhas e flores. Portanto, é provável que o *BBM* promova a proliferação celular e morfogênese durante a embriogênese.

Estudos realizados por Silva (2011) e Torres (2013) mostraram que a expressão quantitativa dos genes *SERK* e *BBM* em *C. arabica* foi relacionada ao crescimento de ECS de *C. arabica*, cv Catiguá. De acordo com Silva (2011), a expressão de *BBM* e de *SERK* foi crescente até os 20 e 30 dias, respectivamente, coincidindo com o crescimento exponencial e início da estabilização do crescimento das ECS. A expressão de *BBM* foi maior que a de *SERK*, durante os primeiros 20 dias. Aos 30 e 40 dias, coincidindo com a estabilização do cultivo, a expressão de *SERK* alcançou valores máximos, enquanto que a de *BBM* caiu para níveis basais. Dos 40 dias em diante, o crescimento manteve-se constante, porém, numa taxa cada vez menor, provavelmente devido às condições experimentais (renovação parcial do volume do meio nutritivo). A expressão de ambos os genes tendeu a se recuperar aos 50-60 dias.

Já os trabalhos de Torres (2013) demonstraram 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, 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*. De acordo com este trabalho, a disponibilização periódica de meio de cultivo novo para as células, pode causar uma modificação instantânea em suas condições físicas e químicas, acarretando um estresse e dessa forma, induzindo o aumento da expressão dos genes. Sugere-se que a alta expressão de *BBM* pode estar diretamente ligada ao estresse nutricional, já que esse gene codifica um fator de

transcrição AP2/ERF, sendo as proteínas ERF relacionadas a respostas contra estresses bióticos e abióticos (ZHOU; TANG; MARTIN, 1997; LIU, 1998; STOCKINGER; GILMOUR; THOMASHOW, 1997). Os resultados também permitiram identificar uma relação transiente de indução entre *SERK* e *BBM* durante o crescimento da suspensão celular, sendo que *BBM* pode funcionar como indutor da expressão de *SERK*, visto que *BBM* está relacionado à expressão de genes associados à embriogênese e à proliferação e organização celular em regiões de crescimento, assim como *SERK*, está associado à alta taxa mitótica nessas regiões. Ainda de acordo com Torres (2013), a renovação de 90% do meio de cultura pode ter ocasionado um nível de estresse às células, com relação direta na expressão dos genes, não permitindo aos genes sua expressão natural. Além disso, sugere-se que a renovação do meio feita a cada 15 dias propiciou às células ficarem muito tempo com escassez de nutrientes, o que também pode ocasionar estresse forçado às células. Havendo demora na renovação do meio, as células diminuem sua taxa de multiplicação e células velhas e/ou mortas ficam misturadas às células novas.

Outro gene relatado na literatura associado ao processo embriogênico é o gene *WUS* (*WUSchel*), o qual codifica um fator de transcrição que controla um *pool* de células meristemáticas e é regulado por um ciclo de *feedback* envolvendo os genes *Clavata* (*CLV*) (WEIGEL; JURGENS, 2002; BHALLA; SINGH, 2006). No meristema apical caulinar (MAC) de *Arabidopsis*, *WUS* é um regulador crítico e codifica uma proteína que é necessária para formação e manutenção de ‘*stem cells*’ ou células-tronco (RODRIGUES; KERBAUY, 2009). Em mutantes *WUS*, as plantas foram incapazes de manter um *pool* de células-tronco indiferenciadas (LAUX et al., 1996). A expressão de *WUS* está restrita a um pequeno grupo de células no interior da zona central meristemática, conhecida como centro de organização do MAC, que está localizada

imediatamente abaixo da camada apical de células-tronco ativas (MAYER et al., 1998; SCHOOF et al., 2000).

A expressão de *WUS* pode ser primeiramente relacionada às regiões meristemáticas em *Arabidopsis thaliana* podendo levar à produção de órgãos durante toda a vida da planta. De acordo com a literatura, *WUS* também é expresso durante a embriogênese, mais especificamente nas duas células centrais do embrião de 16 células (LAUX et al., 1996; MAYER et al., 1998; HAECKER et al., 2004; CHANDLER; NARDMANN; WERR, 2008). Em *C. canephora*, um heterólogo do *WUS* foi capaz de promover a transição do estado vegetativo para o embriogênico em células somáticas e, aumentou significativamente a formação de embriões somáticos (ARROYO-HERRERA et al., 2008).

2.1.3 Regeneração de suspensões celulares embriogênicas (ECS)

A regeneração é fundamentada na capacidade das células vegetais em proliferação organizarem-se em plantas completas (KERBAUY, 1997; MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994). Essa capacidade é denominada totipotência e considera que as células vegetais manifestam, em momentos diferentes e sob estímulo apropriado, a potencialidade de iniciar novo indivíduo multicelular (TORRES et al., 2000). Teoricamente, considera-se que todas as células vegetais são capazes de expressar sua totipotência. No entanto, os explantes são uma mistura de células em variados estados: fisiológico, bioquímico e de desenvolvimento. Nesse sentido, espera-se que a exposição desses explantes a um ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, fazendo com que somente algumas células respondam às condições de cultura *in vitro*, levando à regeneração de um novo indivíduo.

Existem diversos fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro* como: o genótipo, a fonte de explantes (folha, raiz, caule, meristema, etc) e a

condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura, tempo de cultivo). O sucesso da iniciação e da regeneração da cultura *in vitro* depende do estabelecimento correto de todos esses fatores (ANDRADE, 2002). Na realidade, ainda são necessários muitos estudos visando a elucidação dos mecanismos de hormônios vegetais e dos processos que controlam o desenvolvimento das plantas.

Na embriogênese somática em cafeeiro, bem como em outras espécies, após a etapa de multiplicação, é realizada a fase de diferenciação celular. Essa fase, conhecida como fase de regeneração de embriões somáticos, consiste em fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais que interrompam os ciclos repetitivos de divisão celular da fase anterior, para que ocorra o início da diferenciação e obtenção de embriões somáticos. Alguns fatores exercem grande influência no desempenho da regeneração de embriões somáticos, destacando-se principalmente a composição do meio de cultura, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento utilizados, o aumento da osmolaridade no meio de cultura, sabendo-se que os mesmos podem variar de acordo com a espécie (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Teixeira e colaboradores (2004) observaram que algumas linhagens consideradas embriogênicas, tomando como base o seu aspecto visual, não regeneraram embriões quando transferidas para meio de regeneração. Trabalhos de embriogênese somática com diferentes cultivares de cafeeiro também evidenciaram que a capacidade regenerativa de calos embriogênicos não reduziu com a idade. Em alguns experimentos, houve certa correlação positiva entre o envelhecimento dos calos embriogênicos e sua capacidade de regeneração.

No processo de embriogênese somática indireta em cafeeiro, os embriões podem surgir de calos primários não diferenciados, ficando situados nas margens dos explantes e totalizando, no máximo, 20 embriões/explante. Os embriões podem surgir também de calos secundários embriogênicos friáveis,

que originam cerca de 100 a 300 embriões/explante, quando cultivados em meio de cultura semissólido (SONDAHL; SHARP, 1977).

Após a fase de regeneração, é realizada a diferenciação ou germinação de embriões somáticos que consiste na formação de plântulas a partir de embriões somáticos maduros. Nos protocolos de embriogênese somática, a germinação dos embriões é usualmente realizada em meios de cultura livre de reguladores de crescimento. Contudo, em algumas espécies, incluindo *C. arabica*, o uso de alguns tipos de citocininas como o BAP (6-benzilaminopurina) e a zeatina melhoram o desenvolvimento e, conseqüentemente, as taxas de germinação dos embriões somáticos (BARTOS et al., 2012).

As características morfológicas dos embriões somáticos podem afetar a germinação e, conseqüentemente, a conversão dos embriões somáticos em plântulas (FILIPPI; APPEZZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001). Assim, o acompanhamento histológico das estruturas formadas permite uma melhor caracterização dos processos embriogênicos, identificando as possíveis falhas na formação do embrião somático. A falta de sincronização dos embriões e o surgimento de embriões anormais durante a etapa de regeneração têm sido relatados em várias publicações (TITON et al., 2007).

Dentre os problemas relacionados à embriogênese somática, destaca-se a variação somaclonal, ou seja, variação genotípica e/ou fenotípica ocorrida em plantas regeneradas, devido ao longo período de manutenção do explante em altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura (LITZ, 2002). A reprogramação celular durante a produção e regeneração de embriões é um processo completamente diferente do que ocorre na natureza, e isso pode induzir à poliploidização, quebras de cromossomos, aneuploidização e outras mutações, resultando em anormalidades na mitose e no desenvolvimento do explante (HU; WANG, 1983; AMMIRATO, 1983). A variação somaclonal pode

ser utilizada para aumentar a variabilidade do germoplasma, mas é um inconveniente quando se pretende clonar genótipos de interesse ou para utilizar em processos de transformação genética (JAIN, 2001). Entretanto, de acordo com os estudos realizados por Ducos et al. (2000) e Etienne et al. (2002), o café apresenta uma estabilidade genética muito elevada *in vitro*. Segundo esses autores, há elementos suficientes para afirmar que a multiplicação clonal via embriogênese somática não acarreta variações genéticas que comprometam a qualidade da muda produzida.

A regeneração de plantas normalmente requer uma fase de macropropagação ou aclimatização, depois que as plântulas são produzidas. Essa fase envolve a exposição das plantas ao ambiente externo que possui umidade relativa mais baixa e variações das condições de luz e temperatura. Depois do crescimento sustentável, nesse meio ambiente, as plântulas podem ser colocadas em casa de vegetação.

2.2 Sementes sintéticas

Desde que Murashige (1977) definiu sementes sintéticas ou artificiais como “um único embrião somático encapsulado”, esta tecnologia tem se expandido, assim como este conceito. Atualmente, podemos dizer que sementes sintéticas referem-se a qualquer tecido ou órgão vegetal (ex: embriões somáticos, brotos, meristemas apicais) que possua potencial para converter-se em uma planta completa sob condições *in vitro* ou *ex vitro* e retenha este potencial após estocagem, mimetizando uma semente funcional (CAPUANO; PICCIONI; STANDARDI, 1998; ARA; JAISWAL; JAISWAL, 2000).

Os estudos a respeito da tecnologia de produção de sementes sintéticas apontam para aplicações e possibilidades interessantes, tanto do ponto de vista científico quanto comercial. Podemos citar, principalmente, as vantagens quanto

à propagação de genótipos de elite, plantas geneticamente modificadas e espécies com sementes inviáveis, além das aplicações relacionadas à conservação e troca de germoplasma vegetal entre instituições (SHARMA; SHAZAD; SILVA, 2013). O uso e aprimoramento da técnica também se justificam pelo baixo custo e rápida multiplicação dos propágulos, além de possibilitar a semeadura direta dos propágulos em campo, eliminando etapas de transplante e aclimatização (MARTIN, 2003). Adicionalmente, essa técnica pode ajudar no aumento do tempo entre subcultivos e reduzir a frequência de riscos de variações genéticas (RANI; PARIDA; RAINA, 1995).

Representando uma importante ferramenta de micropropagação massal, o desenvolvimento de sementes sintéticas tem sido reportado com sucesso em várias espécies vegetais, entre as quais se destacam as dos gêneros *Musa* (GANAPATHI et al., 1992; HASSANEIM et al., 2005), *Carica* (CASTILLO; SMITH; YADAVA, 1998), *Ananas* (SONEJI; RAO; MHATRE, 2002) e *Feijoa* (GUERRA et al., 2001), dentre outras. Espécies comerciais têm sido amplamente utilizadas em experimentos com sementes sintéticas e em alguns trabalhos observa-se taxas de germinação (rompimento da cápsula de alginato de cálcio em função do desenvolvimento do explante) superiores a 50%. Embriões somáticos encapsulados de *Vitis vinifera*, *Citrus nobilis* x *Citrus deliciosa*, *Musa* spp e *Oryza sativa*, exibiram taxas de germinação de 69,2%, 81,94%, 66% e 52%, respectivamente (NIRALA et al., 2010; SINGH et al., 2007; GANAPATHI et al., 2001; ARUN KUMAR; VAKESWARAN; KRISHNASAMY, 2005).

O encapsulamento de embriões somáticos em cápsulas de hidrogel para a constituição de sementes sintéticas foi proposto por Redenbaugh et al. (1986), tendo como vantagens principais, a proteção dos embriões somáticos, o fácil armazenamento, transporte e conversão em plantas (ONISHI; SAKAMOTO; HIROSAWA, 1994, GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Esta técnica

baseia-se na imersão de um explante vegetal em uma solução de alginato de sódio e posterior gotejamento desta mistura em solução de cloreto de cálcio para que ocorra a complexação e formação de uma cápsula ao redor do explante. A combinação entre alginato de sódio e cloreto de cálcio têm sido relatada como a melhor forma de encapsulamento, devido ao baixo preço destes compostos, pelo caráter não danoso, facilidade de utilização e resultarem em altas taxas de conversão de embriões em plantas (SHARMA; SHAZAD; SILVA, 2013).

Além do método de encapsulamento usual, há uma técnica para produção de sementes sintéticas denominada “hollow beads”, proposta por Patel et al. (2000). Esta metodologia permite a elaboração de cápsulas cujo núcleo permanece em estado líquido enquanto a área externa é solidificada, devido a um processo de complexação “de dentro para fora” (PATEL et al., 2000).

Em estudos com quatro cultivares de *Solanum tuberosum* L. (batata), Nyende et al. (2003) reportaram 100 % de regeneração de sementes sintéticas “hollow beads” em casa de vegetação, além de 70,8 % de regeneração para um dos cultivares após 280 dias de estocagem. Comparando as duas técnicas, Winkelmann; Meyer e Serek (2004) constataram maior regeneração com as cápsulas produzidas pelo método convencional, porém a técnica “hollow beads” proporcionou maior uniformidade na germinação das sementes sintéticas.

A concentração de alginato de sódio é um dos fatores limitantes em relação à rigidez da semente sintética, e esta deve ser otimizada para a formação de uma cápsula ideal (SAIPRASAD, 2001). Há uma amplitude de concentrações de alginato de sódio aplicáveis na produção das sementes artificiais, assumindo valores como 0,2 g L⁻¹ (NIRALA et al., 2010), 0,3 g L⁻¹ (TABASSUM et al., 2010), 0,4 g L⁻¹ (SINGH et al., 2007; ARUN KUMAR; VAKESWARAN; KRISHNASAMY, 2005), 0,5 g L⁻¹ (GANAPATHI et al., 2001), dentre outros.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas a partir de calos friáveis embriogênicos em cafeeiro, tem mostrado variação intraespecífica. Assim, o uso de marcadores moleculares, tais como o *SERK*, *BBM* e *WUS* relacionados com a competência embriogênica são importantes para a otimização dos protocolos de aquisição de suspensões celulares.

Analisando as características histológicas, moleculares e a capacidade de regeneração de suspensões celulares embriogênicas, não foram observadas diferenças nos aspectos histológicos das amostras analisadas, bem como não foi observada relação da expressão dos genes analisados com o potencial regenerativo das ECS. Contudo, foi possível observar uma relação transiente de indução entre *BBB* e *SERK*, altos níveis de expressão de *SERK* nos diversos estádios de desenvolvimento dos embriões, níveis basais de expressão do *WUS* em todas as amostras de ECS mostrando-se significativamente expresso a partir do estágio cordiforme/torpedo. Foi possível identificar que linhagens de ECS tidas como embriogênicas pelo aspecto visual não se comportaram da mesma maneira quanto aos padrões de regeneração.

Nas pesquisas realizadas visando à otimização de um protocolo para produção de sementes sintéticas a partir de embriões somáticos de *C. arabica* cv. Catiguá, observou-se que a maturação dos embriões em meio MGM líquido é favorável para a obtenção de embriões somáticos no estágio torpedo e cotiledonar, frente a este mesmo meio no estado sólido. Em relação à produção de sementes sintéticas, resultados apontam para a utilização da técnica convencional de encapsulamento, porém com a adição de solução nutritiva DEV na matriz de encapsulamento, para uma taxa de conversão das sementes sintéticas em plântulas de 77,5%.

REFERÊNCIAS

ALVES, J. D. et al. Morfologia do cafeeiro. In: **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: EMBRAPA Café, 2008. v. 1, p. 157-226.

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. v. 1, p. 82-123.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2003. p. 438.

ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Synthetic seeds: prospects and limitations. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 12, p. 1438-1444, June 2000.

ARROYO-HERRERA, A. et al. Expression of *WUSCHEL* in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 94, p. 171-180, June 2008.

ARUN KUMAR, M. B.; VAKESWARAN, V.; KRISHNASAMY, V. Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 81, p. 97-100, 2005.

BARENDSE, G. W. N.; PEETERS, T. J. M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 44, n. 1, p. 3-17, Mar. 1995.

BARTOS, P. M. C. **Embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e caracterização bioquímica e anatômica das diferentes etapas envolvidas no processo.** 2012. 176 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

BHALLA, P. L.; SINGH, M. B. Molecular control of stem cell maintenance in shoot apical meristem. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 4, p. 249–256, Apr. 2006.

BIEYSSE, C.; GOFFLOT, A.; MICHAUXFERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 71, n. 11, p. 14961502, 1993.

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

BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation e regeneration in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 44, n. 1, p. 7-17, Jan. 1996.

BRIDSON, D. M. Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East Africa. **Kew Bulletin**, London, v. 49, n. 2, p. 331-342, 1994.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimatização de plantas:** abordagens recentes. Brasília: Embrapa-CNPq, 1996. p. 12. (ABCTP Notícias, 25).

CAPUANO, G.; PICCIONI, E.; STANDARDI, A. Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds. **Journal of Horticulture Science and Biotechnology**, v. 73, p. 299-305, 1998.

CARVALHO, A. M. **Desempenho agrônômico de cultivares de cafeeiro resistentes à ferrugem**. 2011. 90 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Lavras, 2011.

CASTILLO, B.; SMITH, M. A. L.; YADAVA, U. L. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 172-176, 1998.

CHANDLER, J.; NARDMANN, J.; WERR, W. Plant development revolves around axes. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 78-84, Feb. 2008.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis in vitro as a developmental process. **HortScience**, Alexandria, v. 23, p. 515-519, 1988.

CHUGH, A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances. **Current Science**, Bangalore, v. 83, n. 6, p. 715-730, Sept. 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **2ª estimativa**. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/cafeicultura/2-estimativa-da-conab-para-safra-de-caf-do-brasil-maio2013>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

DONATO, V. M. T. S. et al. Embriogênese somática *in vitro* em couve-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 711-718, 2000.

DUCOS, J. P. et al. Technically and economically attractive way to propagate elite *Coffea canephora* (Robusta) clones: in vitro somatic embryogenesis. In: COLLOQUIUM OF INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION, 18., 2000, Helsinki, Finland. **Proceedings...** Vevey, Switzerland: ASIC, 2000. p. 295-301.

ETIENNE, H. et al. Biotechnological application for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Columbia, 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**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, Sept. 2003.

FERREIRA, M. G. R. et al. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.

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.

FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.

FILONOVA, L. H. et al. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, *Norway spruce*. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, pt. 24, p. 4399-4411, Dec. 2000.

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.

GANAPATHI, T. R. et al. Propagation of banana through encapsulated shoot tips. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, n. 11, p. 571-575, Oct. 1992.

GANAPATHI, T. R. et al. Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. rasthali (*Musa* spp. aab group). **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Columbia, v. 37, p. 178-181, Mar./Apr. 2001.

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

GUERRA, M. P. et al. Somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 2, p. 117-128, jun. 2001.

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

HAECKER, A. et al. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v. 131, n. 3, p. 657-668, Feb. 2004.

HASSANEIN, A. M. et al. Micro-propagation factors essential for massal production of synthetic seeds in banana. **Journal of Plant Biotechnology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 1-7, 2005.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, P. A. et al. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

HU, H.; XIONG, L.; YANG, Y. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. **Planta**, Berlin, n. 222, n. 1, p. 107-117, Nov. 2005.

JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**: netherlands journal of plant breeding, Wageningen, v. 118, n. 2, p. 153-166, 2001.

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, p. 196-223, 2001.

JONG, A. J.; SCHMIDT, E. D. L.; VRIES, S. C. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 367-377, 1993.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.

KIST, B. B. et al. **Anuário brasileiro do café 2011**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2011. 128 p.

KOMAMINE, A. et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: Physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 28, n. 1, p. 11-14, Jan. 1992.

LAUX, T. et al. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge, v. 122, p. 87-96, 1996.

LITZ, R. E. Biotechnology and mango improvement. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 645, p. 85-92, 2002.

LIU, Q. et al. Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 10, p. 1391-1406, 1998.

LOYOLA-VARGAS V. M. et al. Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 18., 1999. **Proceedings...** Helsinki: ASIC, 1999. p. 302-307.

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, 2003.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: _____. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-181.

MARTIN, K. P. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipea malabarica* (Reichb. F.) J. D. HOOK, an endangered orchid. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 39, p. 322-326, 2003.

MATSUMOTO, K. **Cultura de células em suspensão: focalizando a bananeira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 24 p. (Boletim de Pesquisa, 126).

MAYER, K. F. et al. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. **Cell**, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 805-815, Dec. 1998.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academics, 1995. p. 155-203.

MICHAUX-FERRIERE, N. et al. Étude histologique de l'embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 33, p. 207-217, 1989.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of *coffee*. **Biotechnology Research International**, p. 1-17, June 2012. Article ID 580857.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007. 66 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MURASHIGUE, T. Plant cell and organ culture as horticultural practices. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 78, p. 17-30, 1977.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NIRALA, N. K. et al. Encapsulated somatic embryos of grapes (*Vitis vinifera* L.): an efficient way for storage, transport and multiplication of pathogen free plant material. **Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 159-162, 2010.

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.

NOLAN, K. E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R. J. Expression of the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 1759-1771, Feb. 2009.

NYENDE, A. B. et al. Production, storability and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 39, p. 540-544, Sept./Oct. 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, July 1964.

ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds an application of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 137-145, 1994.

PASSARINHO, P. et al. Baby boom target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 225-237, Oct. 2008.

PATEL, A. V. et al. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 868-874, 2000.

PEREIRA, A. R. et al. Indução de embriões somáticos globulares e cordiformes de cafeeiro por BAP e sacarose. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 4, n. 1-2, p. 77-80, 2003.

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.

PÉREZ-NUÑÉZ, M. T. et al. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, n. 1, p. 11-19, Jan. 2009.

RANI, V.; PARIDA, A.; RAINA, S. N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micro-propagated plant of *Populus deltoids* March. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 7, p. 459-462, Apr. 1995.

REDENBAUGH, K. et al. Encapsulation of somatic embryos and for artificial seeds production. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 20, p. 256-257, 1984.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 2, n. 3-4, p. 159-167, jul./dez. 2004.

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 525-549, 2009.

SALAJ, J. et al. AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 46, p. 709-714, 2008.

SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares *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**, Bethesda, v. 4, n. 12, p. 1111-1113, Dec. 2009.

SANTOS, M. O. et al. Characterization of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, Limerick, v. 168, p. 723-729, 2005.

SANTOS, M. O. et al. Suppression of *SERK* gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 11, n. 1, p. 83-89, Jan. 2009.

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

SHARMA, S. et al. Cloning and molecular characterization of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. **Planta**, Berlin, v. 228, n. 2, p. 319-330, July 2008.

SHARMA, S.; SHAZAD, A.; SILVA, J. A. T. Synseed technology - a complete synthesis. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 186-207, Mar./Apr. 2013.

SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; SONDAHL, M. R. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokio, Maruzen, 1982. p. 759-762.

SCHOOOF, H. et al. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 6, p. 635-644, Mar. 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.

SINGH, B. et al. In vitro response of encapsulated and non-encapsulated embryos of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *Citrus deliciosa* Tenora). **Plant Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 101-107, 2007.

SÖNDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Zurich, v. 81, n. 4, p. 395-408, 1977.

SONEJI, J. R.; RAO, P. S.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 10, p. 891-894, Mar. 2002.

STARITSKY, G.; HASSELT, G. A. M. The synchronized mass propagation of *Coffea canephora* *in vitro*. In: INTERNATIONAL SCIENCE COLLOQUIUM COFFEE, 9, 1980, London. **Proceedings...** London: ASIC, 1980. p. 597-602.

STOCKINGER, E. J.; GILMOUR, S. J.; THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 3, p. 1035-1040, Feb. 1997.

TABASSUM, B. et al. Viability assessment of *in vitro* produced synthetic seeds of cucumber. **African Journal of Biotechnology**, Abuja, v. 9, p. 7026-32, 2010.

TAHARA, M. et al. Histological and biological aspects in somatic embryogenesis of *Coffea arabica*. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 16. Kyoto, 1995. **Annales...** Kyoto: ASIC, 1995. p. 860-867.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

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

TISSERAT, B.; ESAN, B. B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Reviews**, New York, v. 1, p. 1-78, 1979.

TITON, M. et al. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 417-426, maio/jun. 2007.

TOONEN, M. A. J. et al. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. **Planta**, Berlin, v. 194, n. 4, p. 565-572, Dec. 1994.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TORRES, L. F. **Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea arabica***. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. In: FUJIWARA, A. **Plant tissue culture**. Tokyo: Maruzen, 1982. p. 101-103.

WEIGEL, D.; JURGENS, G. Stem cells that make stems. **Nature**, London, v. 415, n. 6873, p. 751-754, Feb. 2002.

WINKELMANN, T.; MEYER, L.; SEREK, M. Germination of encapsulated somatic embryos of *Cyclamen persicum*. **Hortscience**, Alexandria, v. 39, n. 5, p. 1093-1097, 2004.

ZAMBOLIN, L. **Produção integrada de café**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003.

ZHOU, J.; TANG, X.; MARTIN, G. B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 16, p. 3207-3218, 1997.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, Oct. 1993.

SEGUNDA PARTE
ARTIGOS

ARTIGO 1
REVISTA CIENTÍFICA *PLANTA* (versão preliminar)

**EXPRESSÃO DOS GENES *SERK*, *BBM* E *WUS* EM SUSPENSÕES
CELULARES E EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Coffea arabica* L.**

Luciene de Oliveira Ribeiro¹; Luana Ferreira Torres¹, Natália Chagas Freitas¹, Luciana Lima Freire¹, Leonardo Augusto Zebral Rodrigues¹, Breno Régis Santos², Luciano Vilela Paiva^{1*}

1 Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil;

2 Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas, MG, Brasil;

* **Autor correspondente:** luciano@dqi.ufla.br

RESUMO

O acompanhamento do desenvolvimento do material embriogênico por meio de análises histológicas e de marcadores moleculares ligados aos eventos embriogênicos são de extrema utilidade para os trabalhos de obtenção de protocolos de suspensão celular embriogênica (ECS). Dentre os genes relacionados à embriogênese somática, destacam-se os genes *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*), *BBM* (*Baby Boom*) e *WUS* (*Wuschel*). Objetivou-se nesse trabalho analisar e relacionar as características morfológicas, moleculares e a capacidade de regeneração de ECS de *Coffea arabica* cv. Catiguá. De acordo com as análises histológicas não houve diferença entre as ECS no intervalo estudado (10 dias). Além disso, não houve relação direta entre a expressão de genes *SERK*, *BBM*, *WUS* com a regeneração das ECS em embriões, bem como entre as análises histológicas com a regeneração. Foi possível inferir que *SERK* e *BBM* podem desempenhar papel antagônico durante a embriogênese somática do cafeeiro, e *WUS* se mostrou mais expresso em embriões a partir do estágio cordiforme/torpedo. A regeneração de ECS em

embriões ocorreu numa frequência satisfatória, porém foi observado desenvolvimento dos embriões de maneira assíncronica.

Palavras-chave: marcadores moleculares, histologia, embriogênese.

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática tem sido utilizada eficientemente em diferentes aplicações biotecnológicas, especialmente para eventos de transformação genética em cafeeiro (RIBAS et al., 2011). A “*Embryogenic cell suspension (ECS)*” é obtida por meio de calos embriogênicos e se caracterizam por milhares de glomérulos celulares mantidos em meio líquido sob agitação constante. A metodologia para obtenção e manutenção deste tipo de material vegetal é conhecida, mas os protocolos são genótipo-dependente, o que torna necessário o desenvolvimento de protocolos específicos (SILVA et al., 2014).

O estudo do desenvolvimento embriogênico por meio de análises histológicas e de marcadores moleculares é importante para obtenção de protocolos de ECS. Análises histológicas permitem distinguir materiais potencialmente embriogênicos de não-embriogênicos levando em consideração características morfológicas das células sob cultivo. Adicionalmente, marcadores moleculares têm sido propostos para auxiliar na constatação da competência embriogênica. Dentre os genes relacionados à embriogênese somática, destacam-se o gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*), relacionado à transdução de sinal em células embriogênicas, o gene *BBM* (*Baby Boom*), que induz a formação espontânea de embriões somáticos e o gene *WUS* (*Wuschel*), que está ligado à transição do estado vegetativo para embriogênico e/ou mantém a identidade das células embriogênicas (KARAMI, AGHAVAI, POUR, 2009; ELHITI, STASOLLA, WANG, 2013). A confirmação do

potencial embriogênico das ECS se dá, de maneira mais conclusiva, pela regeneração das mesmas em plantas. Técnicas pré-estabelecidas, utilizando meios nutritivos e condições de cultivo adequadas, fornecem excelentes resultados na obtenção de inúmeras plantas provenientes de suspensões celulares embriogênicas.

Sendo assim, objetivou-se no presente trabalho analisar e relacionar as características morfológicas e moleculares com a capacidade de regeneração de suspensões celulares de *Coffea arabica* cv. Catiguá.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Calos embriogênicos (calos amarelos friáveis) de *Coffea arabica*, cultivar Catiguá, previamente obtidos segundo o protocolo de Samson et al. (2006) foram transferidos para meio de multiplicação MM (TEIXEIRA et al., 2004). A partir destes calos, duas linhagens de suspensões celulares (identificadas como L1 e L2, respectivamente) foram obtidas e mantidas no escuro a $27^{\circ}\text{C} \pm 2$, sob agitação de 100 rpm. A cada 10 dias foi realizada a renovação de 50% do volume de meio de cultura, e a partir do 40º dia, concomitantemente à renovação do meio, foram feitas coletas das amostras de ECS para análise histológica, molecular e regeneração.

Análise histológica

Amostras de suspensão celular foram coletadas de forma aleatória aos 40, 50, 60, 70 dias de cultivo. Estas foram fixadas em FAA 50% (10% de solução de formaldeído 40% + 5% de ácido acético glacial + 50% de álcool etílico, v/v) por 72 horas, permanecendo em álcool 70% até a preparação das lâminas citológicas. Depois de desidratadas em série etílica (70-100%) as amostras foram infiltradas durante 24 horas com solução 1:1 de resina epoxi

(Historesin® Leica) e etanol, de acordo com o protocolo do fabricante. Cortes com espessura de 3 µm foram realizados em micrótomo (Easypath EP-31-20091) e tratados com solução de azul de toluidina a 0,05%. As lâminas foram seladas com Entellan® e visualizadas em microscópio de luz com câmera acoplada (Zeiss, Axio Scope).

Análise por qPCR da expressão dos genes SERK, BBM e WUS

Amostras de ECS foram coletadas aos 40, 50, 60 e 70 dias de cultivo, bem como amostras de calo embriogênico, calo não-embriogênico e embriões somáticos nos estádios globular, cordiforme/torpedo e cotiledonar, e armazenadas em ultrafreezer (-80°C). Para extração do RNA, utilizou-se o Kit NucleoSpin® (*Macherey Nagel*) segundo o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram tratadas com o inibidor Turbo DNA-free Kit (*Ambion*), para eliminação de contaminação de DNA residual. A verificação quanto à ausência de DNA foi feita mediante PCR com o gene endógeno GAPDH e visualizada em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 0,8%. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue) e usadas para a síntese de cDNA, com o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (*Applied Biosystems*), as quais foram armazenadas a -20° C até o uso.

A expressão dos genes de interesse foi quantificada por RT-qPCR com *primers* SERK, BBM e WUS (desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (*Applied Biosystems*)). Os *primers* para os genes foram desenhados a partir de sequências encontradas no banco de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), gerado pelo projeto Genoma Brasileiro Café (CAFEST; VIEIRA et al., 2006) e comparadas com o banco de genes do NCBI (National Center for Biotechnology).

Com os cDNAs obtidos, foram realizadas análises quantitativas em PCR Tempo Real (qPCR) [ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)] mediante o uso de SYBR® Green, de acordo com o protocolo do fabricante. As amplificações ocorreram com cerca de 10 ng de cDNA e 0,1 µM de *primer* 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 os genes 14-3-3 e GAPDH (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009). As sequências dos *primers* dos genes de interesse, genes endógenos e a eficiência dos mesmos estão listadas na Tabela 1. Os dados de expressão, resultantes das amplificações, foram normalizados utilizando-se a equação [$\Delta CT = \text{média CT (gene alvo)} - \text{média CT (controle endógeno)}$]. A calibração foi determinada pela fórmula [$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$]. O valor da expressão foi quantificado pela fórmula ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$).

Tabela 1. *Primers* para qPCR (14-3-3, GAPDH, SERK, BBM, WUS)

Gene	Sequência do <i>primer</i>	E (%)
14-3-3 F	5' CGCCTGATCGTGCTTGTC 3'	92,33
14-3-3 R	5' GCACATCAGGAGTCCACAAAGTAA 3'	
GAPDH F	5' GGAAGAGCTGCTTCATTTAACA 3'	92,14
GAPDH R	5' CCATTGAGGGCTGGAAGAAC 3'	
SERK F	5' AAATGACCGGAGAGACCGGAAGTT 3'	96,57
SERK R	5' CTGCCCAGCACTGCTCAA 3'	
BBM F	5' CGAACTTGTCACGATCCACAT 3'	94,48
BBM R	5' ACCCTTGGGAAGGACTTGCT 3'	
WUS F	5' GGTCAGCCAGAAATTGCACAA 3'	91,70
WUS R	5' CGTTGCAACTCCATTGATGAAC 3'	

Regeneração das ECS

Amostras de ECS (cerca de 150 mg de células) foram coletadas aos 40, 50, 60 e 70 dias de cultivo e transferidas para meio de regeneração MRT (TEIXEIRA et al., 2004), onde permaneceram no escuro durante 120 dias. Os embriões formados foram transferidos para meio de maturação e germinação

MGM (TEIXEIRA et al., 2004), permanecendo no escuro durante 30 dias. Após esse período, o material foi transferido para a condição de luz, onde permaneceu por mais 30 dias. Após a germinação, os embriões foram contabilizados e transferidos para meio de cultura DEV (TEIXEIRA et al., 2004) para crescimento e enraizamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise histológica

Não houve grandes diferenças morfológicas e/ou anatômicas entre as amostras e linhagens de ECS coletadas no período estudado (Figura 1). De acordo com Pádua et al. (2014) e Silva et al. (2014), as características morfológicas que diferenciam material potencialmente embriogênico perpassam por agregados celulares pequenos (massas pró-embriogênicas - MPE), núcleo central volumoso, numerosos grãos de amido ao redor do núcleo, citoplasma muito denso rico em proteínas solúveis e de reserva (evidenciado pela coloração azul intensa) e variação na espessura da parede celular.

Nesse trabalho, observa-se regiões com características embriogênicas como agregados celulares pequenos e citoplasma denso (evidenciado pela coloração azul intensa) em todas as fases estudadas, porém também se observa regiões não-embriogênicas evidenciadas pelas células que não exibem um citoplasma denso (células vacuoladas e alongadas) (PÁDUA et al., 2014; SILVA et al., 2014). Esse tipo de heterogeneidade do material pode corresponder a uma rápida redução da qualidade das ECS, visto que o material não-embriogênico apresenta taxas de divisão celular superior e, portanto, rápido crescimento (RIBAS et al., 2011).

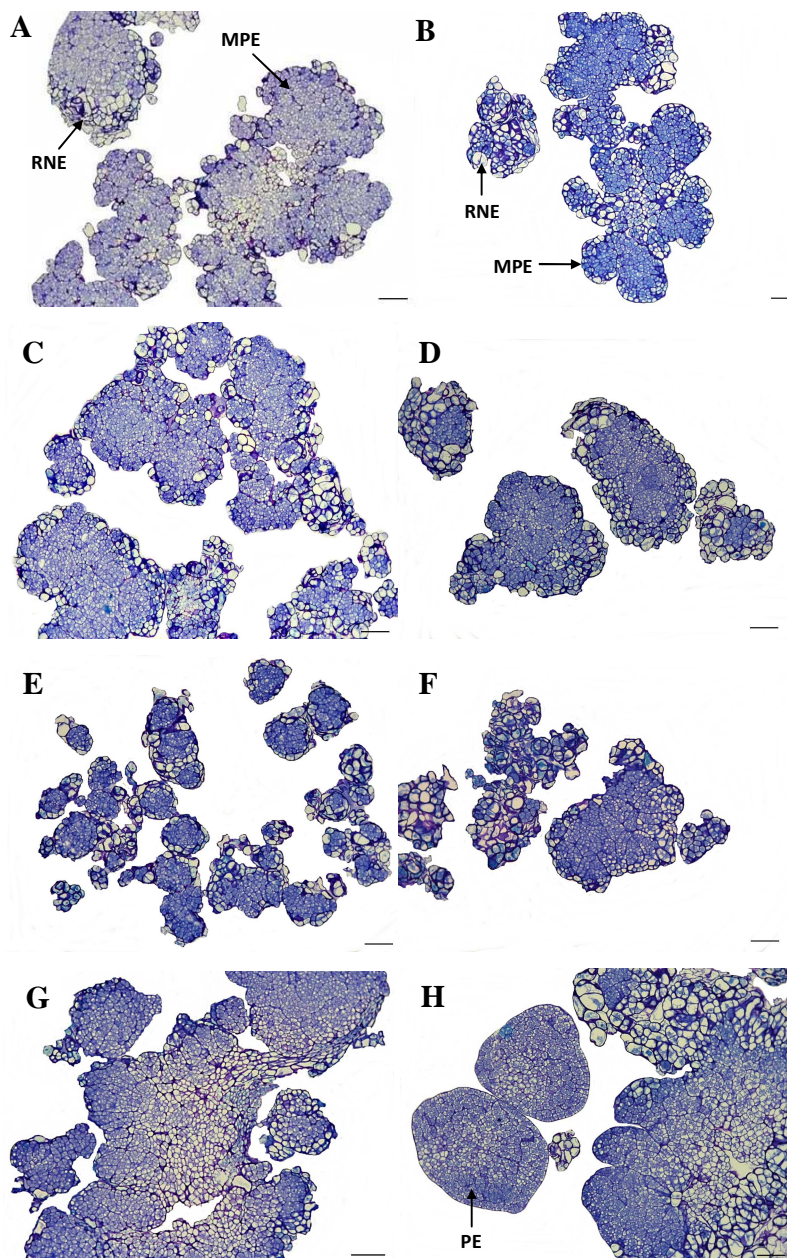


Figura 1 Caracterização histológica de ECS de *Coffea arabica*. A) L1 - 40 dias; B) L2 - 40 dias; C) L1 - 50 dias; D) L2 - 50 dias; E) L1 - 60 dias; F) L2 - 60 dias; G) L1 - 70 dias; H) L2 - 70 dias. MPE = Massa Pró-Embriogênica; RNE = Região Não-Embriogênica; PE = Pró-Embrião. Barra = 100 μm.

A presença de regiões potencialmente embriogênicas e não-embriogênicas constatada na análise histológica das suspensões celulares deve-se à heterogeneidade dos calos usados para iniciar as mesmas. De acordo com Ribas et al. (2011) os calos de cafeeiro podem ser classificados em amarelo-branco, amarelo-amarelo e amarelo-cinza, sendo que os calos de coloração amarelo-amarelo são tidos como adequados ao estabelecimento de suspensões celulares, bem como estão aptos para transformação genética, pois podem originar embriões somáticos numa frequência bastante elevada. Estes calos, portanto, devem ser subdivididos e subcultivados por cerca de 6 meses afim de obter material embriogênico mais uniforme.

Expressão dos genes *SERK*, *BBM* e *WUS*

Não houve correlação entre a expressão dos genes *SERK*, *BBM* e *WUS* e a regeneração das ECS para as duas linhagens estudadas (Figura 2).

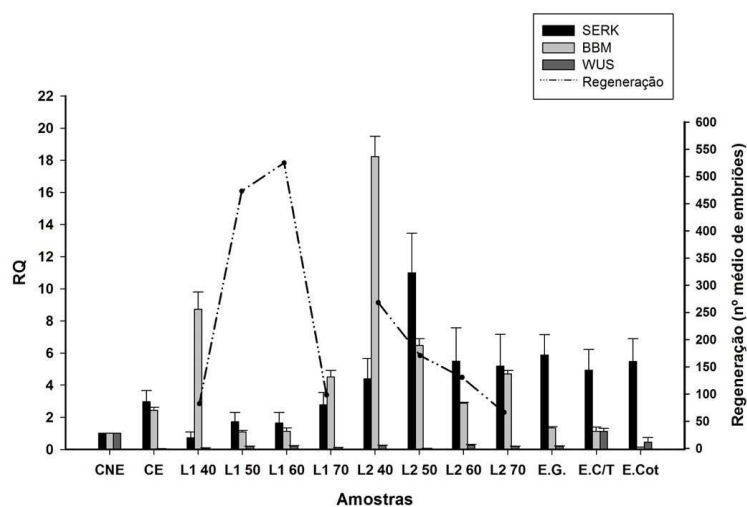


Figura 2 Expressão quantitativa relativa (RQ) de *SERK*, *BBM* e *WUS* em calo não-embriogênico (CNE), calo embriogênico (CE), linhagens de ECS (L1 e L2) cultivadas entre 40 e 70 dias, embrião globular (E.G.), embrião cordiforme/torpedo (E.C/T), embrião cotiledonar (E.Cot.). [Valores de RQ = média de réplicas técnicas; controles endógenos = *GAPDH* e *1433*; calos não-embriogênicos (CNE) = amostra de referência (RQ = 1)].

É possível observar que não há relação direta entre o padrão de expressão desses genes com a regeneração das duas linhagens de ECS. Contudo, constatações importantes podem ser feitas a partir das análises de expressão quantitativa relativa desses genes.

Há estudos que relataram que *SERK* se mostrava expresso na fase de indução da embriogênese somática até a fase de embrião globular em *Daucus carota* L. (cenoura) e *Dactylis glomerata* L., respectivamente SCHMIDT et al., 1997; SOMLEVA et al., 2000). Contudo, já se sabe que esse gene desempenha um papel mais vasto na embriogênese somática, não sendo apenas restrito à indução da embriogênese, mostrando-se também expresso em embriões somáticos no estágio cordiforme (*A. thaliana*) e em diversos estádios de desenvolvimento em outras espécies (HECHT et al., 2001; TUCKER et al., 2003; SANTOS et al., 2005). A expressão do gene *SERK* também foi observada no meristema apical do caule e em cotilédones de plântulas de *Arabidopsis* tratadas com auxina, indicando que sua expressão não é restrita a células embriogênicas, mas também àquelas capazes de responderem a sinais hormonais para formar embriões somáticos (HECHT et al., 2001). Nesse trabalho, *SERK* foi altamente expresso em todos os estádios de desenvolvimento dos embriões analisados, permitindo inferir que esse gene desempenha um papel importante também nas fases posteriores à indução da embriogênese em *Coffea*.

De modo geral, a expressão do *SERK* coincide com o requerimento de auxinas exógenas para a multiplicação celular indiferenciada que caracteriza os calos e ECS (SHARMA et al., 2008; SINGLA et al., 2008). De acordo com Hecht et al. (2001) e Nolan et al. (2003), a expressão de *SERK* foi induzida por 2,4-D em *Arabidopsis* sp. e *Medicago* sp., respectivamente. Nesse trabalho, o 2,4-D foi usado com fonte auxínica na fase de indução dos calos embriogênicos (meio MT2 - $4,52 \mu\text{M L}^{-1}$) e multiplicação das ECS (meio MM - $5 \mu\text{M L}^{-1}$). A alta expressão de *SERK* nos embriões em seus diferentes estádios de

desenvolvimento pode ser explicada (1) devido à mudança na fonte auxínica nos meios de cultivo necessários à regeneração (meio MRT) e germinação (meio MGM), visto que o meio MRT possui, em sua constituição, $2,68 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA, enquanto o meio MGM possui $2,57 \mu\text{M L}^{-1}$ de AIA; e (2) essa maior expressão de *SERK* em embriões em vista da expressão em ECS pode ser devido à presença de citocinina (BAP) nos meios MRT e MGM, ausente no meio de multiplicação (MM). Cabe ressaltar que depois de muitos subcultivos de ECS em *Arabidopsis*, o potencial embriogênico das células foi perdido. Isso implica que outros fatores devem interferir na expressão desse gene durante os períodos de subcultivos (IKEDA et al., 2006; THOMAS et al., 2004).

De acordo com Hecht et al. (2001) quatro genes *SERK* foram identificados no genoma de *Arabidopsis* (*AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSERK3*, *AtSERK4*). Além disso, foram identificados em milho, *ZmSERK1* e *ZmSERK2*, que pertencem à família do gene *SERK*, também com um padrão de expressão semelhante ao *DcSERK* (caracterizado em cenoura) na embriogênese. Embora tanto *ZmSERK1* e *ZmSERK2* tenham se mostrado expressos em materiais embriogênicos, bem como no calo não embriogênico, a expressão de *ZmSERK2* foi relativamente uniforme tanto em tecidos vegetativos como reprodutivos (HU, XIONG, YANG, 2005). Homólogos desse gene também foram identificados em *Medicago truncatula* (NOLAN et al., 2003) e girassol (THOMAS et al., 2004) com uma predominante expressão na embriogênese somática e organogênese. Esses resultados sugerem que *SERKs* constituem uma pequena família gênica conservada em plantas com um papel na embriogênese e, possivelmente, em outros processos de desenvolvimento (HU, XIONG, YANG, 2005). De acordo com estudos preliminares de Silva et al. (2014), o gene *SERK* usado no presente trabalho apresentou alta similaridade com os homólogos *DcSERK* (de *Daucus carota*), *AtSERK1* e *AtSERK3* (de *Arabidopsis thaliana*), os quais se mostraram

expressos em materiais embriogênicos (SCHMIDT et al., 1997; HECHT et al., 2001).

Outra relevante constatação é o fato de que *SERK* e *BBM* podem estar intrinsecamente relacionados visto que a expressão de um se mostra antagônica ao outro. De acordo com essa hipótese, pode haver uma relação transiente de indução e retroinibição entre esses genes durante o crescimento da suspensão celular. Nessa relação, supõem-se que *BBM* funciona como indutor da expressão de *SERK*. Essas indicações estão de acordo com o fato de *BBM* codificar um fator de transcrição que induz a expressão de genes associados à embriogênese (PASSARINHO et al., 2008), bem como se associa à proliferação e organização celular em regiões de crescimento (BOUTILIER et al., 2002).

Além disso, quando superexpresso, *BBM* mostrou capacidade para induzir a formação espontânea (sem adição de reguladores) de calos embriogênicos e de embriões somáticos (BOUTILIER et al., 2002). A capacidade de *BBM* para promover a organogênese e embriogênese na ausência de reguladores de crescimento sugerem que esse gene pode atuar estimulando a produção de hormônios (aumentando os níveis endógenos destes nas plantas) e/ou aumentando a sensibilidade da célula para estas substâncias (KARAMI, AGHAVAISI, POUR, 2009). Sendo assim, supõe-se que *BBM* poderia estimular a produção de auxinas e/ou aumentar a sensibilidade da célula para este hormônio, o qual é amplamente citado na literatura como indutor da expressão de *SERK* (SCHMIDT et al., 1997; HECHT et al., 2001; NOLAN et al. 2003; ELHITI, STASOLLA, WANG, 2013; KARAMI, AGHAVAISI, POUR, 2009).

Além dessa hipótese e de acordo com Santa-Catarina et al. (2004), componentes do meio de cultura podem ativar a expressão do gene *SERK*, como foi observado nos agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados nos meios de cultura MS suplementado com 2,4-D e no meio WPM. De acordo com esses mesmos autores, culturas mantidas em meio MS sem 2,4-D não apresentaram

esta resposta, sugerindo que a adição do 2,4-D ao meio de cultura MS contribuiu para a ativação da expressão do gene *SERK*. Esses dados também corroboram com demais trabalhos da literatura (ELHITI, STASOLLA, WANG, 2013), e com o fato da presença de $5 \mu\text{M L}^{-1}$ de 2,4-D no meio MM usado no presente trabalho para multiplicação das ECS.

O gene *WUS* se mostrou pouco expresso durante a fase de multiplicação das ECS, sendo sua expressão significativa a partir do estágio cordiforme/torpedo, fato que corrobora com a literatura pesquisada no que diz respeito à alta expressão desse gene a partir do estágio globular (MAYER et al., 1998; HAECKER et al., 2004; CHANDLER, NARDMANN, WERR, 2008; BOSCÁ, KNAUER, LAUX, 2011). Além disso, diversos autores constataram que *WUS* está envolvido na promoção e/ou manutenção de células-tronco embriogênicas totipotentes (ZUO et al., 2002; ARROYO-HERRERA et al., 2008; SOLÍS-RAMOS et al., 2009), o que pode ser visto, nesse trabalho, mediante a baixa expressão relativa nos materiais embriogênicos, evidenciando que o processo de indução já havia sido desencadeado, e a expressão basal desse gene atua apenas na manutenção do potencial embriogênico das ECS. No entanto, a literatura ainda relata que o mutante *WUS* ainda é capaz de produzir embriões somáticos, sugerindo que vários caminhos alternativos podem conduzir à expressão do potencial de totipotencialidade (ZUO et al., 2002).

Zuo e colaboradores (2002) também levantaram a hipótese de que *SERK* e *WUS* poderiam estar, de alguma maneira, correlacionados visto que (1) são essenciais para a manutenção da identidade da célula embrionária; e (2) a atividade do gene *CLV* (RODRIGUES e KERBAUY, 2009) deve ‘desligar’ *WUS* e *SERK* no momento apropriado, a fim de executar suas funções de promover a iniciação do órgão. No presente trabalho não foi possível identificar uma relação direta entre a expressão de *SERK* e *WUS*, visto que a expressão de *WUS* permaneceu basicamente inalterada e muito baixa em relação aos demais

genes estudados durante a fase de multiplicação das ECS (40 a 80 dias), sofrendo alteração significativa somente a partir do estágio cordiforme/torpedo. Contudo, durante a fase de multiplicação das ECS, um pequeno aumento na expressão de *WUS* foi observado aos 50 dias de cultivo, coincidindo justamente com o primeiro aumento na expressão de *SERK*, embora esse aumento de *WUS* não tenha se sustentado comparado ao aumento na expressão de *SERK* aos 70 e 80 dias. Assim, futuros estudos visando avaliar uma possível inter-relação entre *SERK* e *WUS* ainda se fazem necessários. Vale ressaltar que *WUS* é o único fator de transcrição encontrado até agora envolvido na regulação de ambas as células-tronco meristemáticas (pluripotentes) e as células-tronco embriogênicas (totipotentes) (ELHITI, STASOLLA, WANG, 2013).

Regeneração das ECS

O processo básico de regeneração das ECS foi obtido com sucesso até o estágio de plântulas (Figura 3), gerando em torno de até 5 embriões mg^{-1} de célula em suspensão inoculada em meio MRT, corroborando com os dados da literatura pesquisada (CARVALHO et al., 2013). Embora a frequência de embriões regenerados tenha sido satisfatória, alguns aspectos relevantes do desenvolvimento dos embriões ainda precisam ser considerados e ajustados para nosso laboratório.

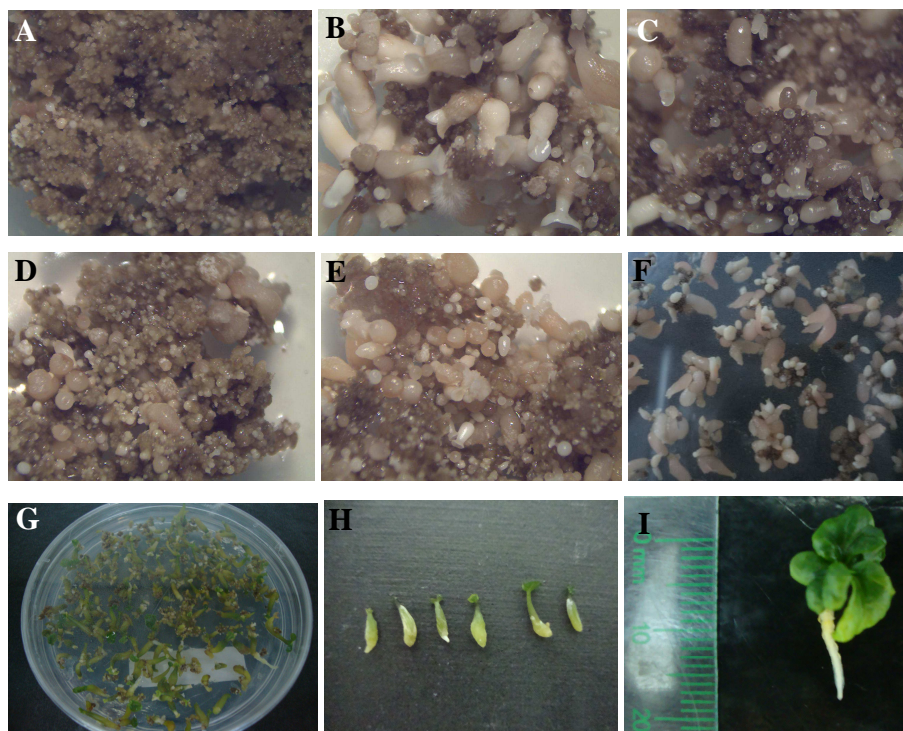


Figura 3 Regeneração de embriões somáticos de café, cv. Catiguá. A, B, C, D, E = embriões em meio MRT após 120 dias de cultivo, no escuro. A) ECS aos 40 dias de cultivo; B) ECS aos 50 dias de cultivo; C) ECS aos 60 dias de cultivo; D) ECS aos 70 dias de cultivo; E) ECS aos 80 dias de cultivo; F = embriões em meio MGM após 30 dias de cultivo, no escuro; G = embriões em meio MGM após 30 dias de cultivo, sob luz; H = embriões isolados e contabilizados para posterior transferência para meio DEV; I = plântula proveniente de embrião somático de café.

As duas linhagens de ECS se comportaram de maneira distinta quanto à taxa de regeneração em embriões somáticos, o que evidenciou uma grande heterogeneidade do material embriogênico inicial, ou seja, do calo embriogênico inoculado em meio líquido. Inicialmente, a linhagem 1 (L1) apresentou um comportamento ascendente com número máximo de embriões formados aos 60 dias e decréscimo na próxima coleta. Já a linhagem 2 (L2) teve o número

máximo de embriões formados aos 40 dias e decresceu com o passar das coletas (Figura 4).

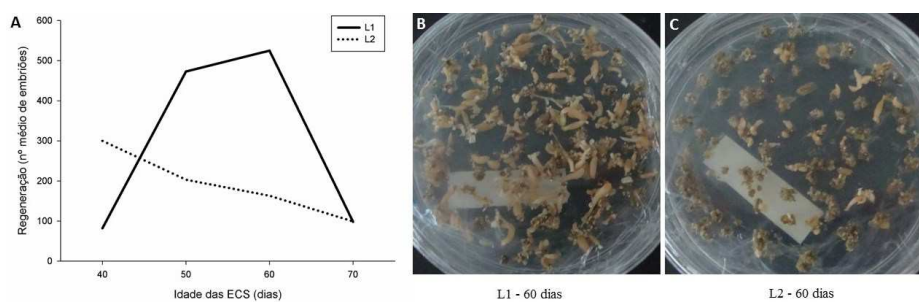


Figura 4 Diferença entre linhagens de ECS quanto à taxa de regeneração em embriões somáticos. A) Relação entre a idade das ECS das duas linhagens (L1 e L2) e o nº médio de embriões regenerados; B) Embriões em meio MGM provenientes de ECS da linhagem 1 coletada aos 60 dias de cultivo; C) Embriões em meio MGM provenientes de ECS da linhagem 2 coletada aos 60 dias de cultivo.

Um outro aspecto observado foi o escurecimento dos embriões (cor rosada) durante o cultivo em meio MRT, fato que pode ter ocorrido devido à (1) permanência prolongada (120 dias) dos embriões no mesmo meio de cultivo, e (2) permanência prolongada no escuro.

Estudos prévios em nosso laboratório revelaram que frequências mais elevadas de regeneração das ECS em embriões somáticos foram observadas quando o material permaneceu no mesmo meio de cultivo do que quando houve a renovação deste aos 30 dias de cultivo (dados não publicados). Isso pode ser explicado levando em consideração que condições estressantes são, em si, suficientes para induzir a embriogênese somática (VON ARNOLD et al. 2002). Reguladores de crescimento, a ausência e/ou a depleção destes são fatores de estresse, como por exemplo, o fato da auxina provocar acidificação da parede celular e induzir à metilação do DNA (VON ARNOLD et al., 2002).

Foi constatada grande assincronia na regeneração das ECS em embriões somáticos, visto que, no momento da contabilização dos embriões, ou mesmo durante o processo de regeneração e germinação, havia embriões nos estádios globular, cordiforme/ torpeda e cotiledonar (Figura 5). Essa assincronia na regeneração pode estar relacionada a diversos fatores como condições de luminosidade, densidade do material nas fases de multiplicação celular, regeneração e germinação dos embriões, concentração de regulador de crescimento, entre outros (TEIXEIRA et al., 2004; RIBAS et al., 2011).

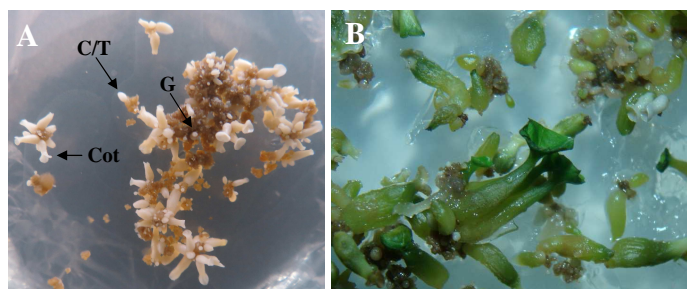


Figura 5 Assincronia na regeneração de embriões somáticos de café. A) Embriões de café cultivados em meio MRT na ausência de luz, em diversos estádios de desenvolvimento: G = Globular; C/T = Cordiforme/Torpeda; Cot = Cotiledonar. B) Embriões de café cultivados em meio MGM, sob luz.

CONCLUSÕES

Não foi possível diferenciar as linhagens de ECS a cada 10 dias somente com a análise histológica.

Não houve relação direta entre a expressão de genes *SERK*, *BBM*, *WUS* e a regeneração das ECS em embriões, bem como entre a histologia e a regeneração.

SERK e *BBM* podem desempenhar papel antagônico na embriogênese somática do cafeeiro.

A expressão basal do gene *WUS* permaneceu inalterada em todas as amostras de ECS, sendo mais expresso no embrião de cafeeiro a partir do estágio cordiforme/torpedo.

A regeneração de ECS em embriões ocorreu numa frequência satisfatória, porém foram observados embriões com desenvolvimento de maneira assincrônica.

As duas linhagens de ECS se comportaram de maneira muito diferente quanto à taxa de regeneração em embriões somáticos.

REFERÊNCIAS

ARROYO-HERRERA, A. et al. (2008) Expression of *WUSCHEL* in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 94:171-180.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, 10(1):1-11.

BOSCÁ, S.; KNAUER, S.; LAUX, T. (2011) Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. **Frontiers in Plant Science**, 2(93):1-6.

BOUTILIER, K. et al. (2002) Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **The Plant Cell Online**, 14(8):1737-1749.

CARVALHO, C. H. S. et al. (2013) Custo de produção de mudas clonais de café arábica produzidas por embriogênese somática. **Embrapa Circular técnica**, 3:1-14.

CHANDLER, J.; NARDMANN, J.; WERR, W. (2008) Plant development revolves around axes. **Trends Plant Science**, 13:78-84.

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cell Dev Biol – Plant**, 49:631-642.

HAECKER, A.; GROSS-HARDT, R.; GEIGES, B.; SARKAR, A.; BREUNINGER, H.; HERRMANN, M.; LAUX, T. (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, 131:657-668.

HECHT, V. et al. (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, 127:803-816.

HU, H.; XIONG, L.; YANG, Y. (2005) Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. **Planta**, 222:107-117.

IKEDA, Y. et al. (2006) The enhancer of shoot regeneration 2 gene in *Arabidopsis* regulates cupshaped cotyledon 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. **Plant and Cell Physiology**, 47(11):1443-1456.

KARAMI, O.; AGHAVAISI, B.; POUR, A. M. (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. **J Chem Biol**, 2:177-190.

MAYER, K.F. et al. (1998) Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. **Cell**, 95:805-815.

NOLAN, K. E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. (2003) Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, 133:218-230.

PÁDUA, M. P. et al. (2014) Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. **Ciência Rural**, 44(4):660-665.

PASSARINHO, P. et al. (2008) Baby boom target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. **Plant Molecular Biology**, 68:225-237.

RIBAS, A. et al. (2011) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biol**, 11(1):1-15.

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. (2009) Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, 36(4):525-549.

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

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

SANTOS, M.O. et al. (2005) Characterization of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Sci.**, 168:723-729.

SCHMIDT, E. D. L. et al. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells component to forma embryos. **Development**, 124:2049-2062.

SHARMA, S. et al. (2008) Cloning and molecular characterization of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. **Planta**, 228:319-330.

SILVA, A. T. et al. (2014) Characterization of a putative *SERK*-like ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. **Plant Mol Biol Rep**, 32:176-184.

SINGLA, B.; KHURANA, J.; KHURANA, P. (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. **Plant Cell Reports**, 27:833-843.

SOLÍS-RAMOS, L. Y. et al. (2009) Overexpression of *WUSCHEL* in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 96:279-287.

SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.L.; DE VRIES, S.C. (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. **Plant Cell Rep.**, 9:718-726.

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

THOMAS, C. et al. (2004) Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42(1):35-42.

TUCKER, M.R. et al. (2003) Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus pilosella are closely interrelated developmental pathways, **Plant Cell**, 15:1524-1537.

VIEIRA, L. G. E. et al. (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18(1):95-108.

VON ARNOLD, S. et al. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69:233-249.

ZUO, J. et al. (2002) The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, 30:349-359.

ARTIGO 2
REVISTA CIENTÍFICA *Ciência e Agrotecnologia* (versão preliminar)

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA A PROPAGAÇÃO DE
Coffea arabica VIA SEMENTES SINTÉTICAS**

Luciene de Oliveira Ribeiro¹, Renan Terassi Pinto², Luana Ferreira Torres¹, Natália Chagas Freitas¹, Breno Régis Santos², Luciano Vilela Paiva^{1*}

1 Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil;

2 Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade, Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), Alfenas, MG, Brasil;

* **Autor correspondente:** luciano@dqi.ufla.br

RESUMO

No Brasil, o café destaca-se como uma das culturas importantes no âmbito mercadológico, tanto para o mercado interno quanto para as exportações e, o processo de produção brasileiro necessita de incrementos na produtividade para manter-se competitivo perante aos outros países que também comercializam este produto. O desenvolvimento da biotecnologia brasileira pode auxiliar, dentre outras formas, tornando a propagação deste vegetal mais eficiente e, uma das possibilidades futuras baseia-se na produção de embriões somáticos em larga escala e propagação destes pela tecnologia de sementes sintéticas. Esta tecnologia permite que genótipos de elite e plantas geneticamente modificadas sejam propagados de modo clonal, preservando as características de interesse. A partir deste trabalho, objetivou-se desenvolver protocolo inicial para subsidiar o desenvolvimento de sementes sintéticas a partir de embriões somáticos de *Coffea arabica* cv. Catiguá. Constatou-se que a maturação dos embriões em

meio de cultura MGM líquido é favorável para a obtenção de embriões somáticos no estágio torpedo e cotiledonar, frente a este mesmo meio no estado sólido. Em relação à produção de sementes sintéticas, resultados apontam para a utilização de embriões somáticos com radícula, encapsulados de acordo com a técnica convencional com a adição de solução nutritiva DEV na matriz de encapsulamento, para uma taxa de aproximadamente 77,5% de conversão das sementes sintéticas em plântulas após 30 dias.

Palavras-chave: Embrião somático, cafeeiro, biotecnologia, encapsulamento.

INTRODUÇÃO

Dentre as culturas expressivas brasileiras, o cafeeiro destaca-se tanto no mercado interno quanto em nível de exportações, porém a continuidade deste quadro está intrinsecamente ligada à produtividade, que é dependente, principalmente, da qualidade da bebida e do custo da produção (TEIXEIRA et al., 2004). Para manter a competitividade desta cultura, o desenvolvimento da biotecnologia no Brasil pode ser considerado um fator de extrema importância.

A propagação clonal via embriogênese somática é promissora para a comercialização de plantas elite e/ou transformadas (RIBAS et al., 2011; ETIENNE et al., 2013). No entanto, esta metodologia necessita de otimização para adaptação aos padrões de propagação em larga escala (DONATO et al., 2000), e o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a inserção eficiente da embriogênese somática de cafeeiro no mercado pode contribuir com a produtividade deste setor brasileiro.

Os estudos a respeito da tecnologia de produção de sementes sintéticas apontam para aplicações e possibilidades comerciais e cientificamente interessantes. Podemos citar, principalmente, as vantagens quanto à propagação

de genótipos-elite, plantas geneticamente modificadas e espécies com sementes inviáveis, além das aplicações relacionadas à conservação e troca de germoplasma vegetal entre instituições (SHARMA et al., 2013).

Embriões somáticos de espécies comerciais como *Vitis vinifera*, *Citrus nobilis* x *Citrus deliciosa*, *Musa* spp e *Oryza sativa* tem sido utilizados em experimentos com sementes sintéticas, exibindo taxas de germinação de 69,2%, 81,94%, 66% e 52%, respectivamente (NIRALA et al., 2010; SINGH et al., 2007; GANAPATHI et al., 2001; ARUN KUMAR et al., 2005).

A combinação entre alginato de sódio e cloreto de cálcio tem sido relatada como a melhor forma de encapsulamento, devido ao baixo preço destes compostos, pelo caráter não danoso, facilidade de utilização e por resultarem em altas taxas de conversão de embriões em plantas (SHARMA et al., 2013).

Além do método de encapsulamento usual, há uma nova técnica para produção de sementes sintéticas, denominada “hollow beads”, proposta por Patel et al. (2000). Em estudos com cultivares de *Solanum tuberosum* L., Nyende et al. (2003) reportaram 100% de regeneração de sementes sintéticas “hollow beads” em casa de vegetação, além de 70,8% de regeneração para um dos cultivares após 280 dias de estocagem.

Com este trabalho objetivou-se subsidiar o estabelecimento de protocolo para a propagação de *Coffea arabica* cv. Catiguá via produção de sementes sintéticas, por meio da obtenção de informações quanto à influência dos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos bem como fatores nutricionais e físicos que interferem no desenvolvimento de sementes sintéticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Comparação da germinação de embriões em meio sólido e líquido

O experimento visando comparar a germinação e maturação dos embriões em meio MGM sólido e líquido foi executado com embriões

provenientes de ECS (cultivadas por aproximadamente 80 dias em meio líquido MM), os quais permaneceram em meio MRT por 120 dias, no escuro (TEIXEIRA et al., 2004). Após esse período, embriões provenientes de cerca de 150mg de ECS foram colocados em meio MGM sólido e MGM líquido, sendo que a diferença entre os meios consistiu apenas na presença ou ausência de agente geleificante (ágar).

Todos os embriões foram cultivados por 30 dias no escuro, sendo posteriormente transferidos para condição luminosa onde permaneceram por mais 30 dias. Os embriões mantidos em meio sólido permaneceram em placa de Petri, e os embriões mantidos em meio líquido foram colocados em erlenmeyers sob agitação (100 rpm). Decorrido o tempo de cultivo sob condição luminosa, os embriões foram contabilizados em seus diversos estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme/torpedo e cotiledonar), bem como o número total de embriões formados.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições para cada tratamento (sólido e líquido). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando o software R.

Encapsulamento convencional

No processo de encapsulamento, as seguintes soluções foram utilizadas: alginato de sódio em concentrações de 9,25; 18,5 e 37 mM; cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em concentração de 100 mM e nitrato de potássio (KNO_3) em concentração de 100 mM. Todas as soluções foram preparadas com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar, sendo que os equipamentos, utensílios e reagentes foram previamente desinfestados por radiação ultravioleta por 30 minutos ou autoclavagem à 121 °C e 1,5 atm por 20 minutos, dependendo da especificação de cada material.

Para obtenção das cápsulas, o material vegetal foi imerso em solução de alginato de sódio. Com auxílio de uma micropipeta (1000 μL) ajustada para o volume de 200 μL e ponteiros adaptadas, os explantes foram individualmente resgatados e gotejados em solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, onde permaneceram em processo de complexação por 20 minutos. Após, as cápsulas complexadas foram imersas em água destilada autoclavada por 5 minutos para a retirada do excesso de íons Ca^{2+} e, em seguida procedeu-se o processo de descomplexação a partir da imersão em solução de KNO_3 por 10 minutos.

Por fim, as cápsulas foram enxaguadas novamente com água destilada autoclavada por 5 minutos para a retirada do excesso dos íons de K^+ e inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962).

Encapsulamento segundo o método “hollow beads”

Os reagentes e os procedimentos de esterilização dos materiais utilizados neste método de encapsulamento foram os mesmos descritos para o método convencional, com exceção do reagente carboximetilcelulose, que foi utilizado na concentração de 57,2 mM e esterilizado por radiação ultravioleta.

O material vegetal foi imerso em solução de carboximetilcelulose, acrescido de 68,02 mM de cloreto de cálcio. Com a utilização de uma micropipeta (1000 μL), essa mistura foi resgatada e gotejada em uma solução de 37 mM de alginato de sódio, onde houve a formação de uma camada externa de alginato de cálcio, com a manutenção do núcleo em estado líquido. As cápsulas permaneceram nesta solução por 10 minutos e, em seguida, procedeu-se duas lavagens com água destilada. Então, as cápsulas foram imersas em uma solução de cloreto de cálcio dihidratado por 20 minutos, para que ocorresse a complexação da camada externa de alginato de cálcio.

Influência de estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos e concentrações de alginato de sódio

Inicialmente foram selecionados embriões somáticos em estágio cotiledonar, porém com características diferentes quanto ao desenvolvimento. Estes foram classificados em: 1- embriões obtidos a partir do cultivo em meio de cultura DEV sólido, com parte aérea pouco desenvolvida, sem radícula; 2- embriões obtidos a partir de meio de cultura DEV sólido, com parte aérea bem desenvolvida, sem radícula; 3- embriões obtidos a partir do cultivo em meio de cultura MGM líquido, com parte aérea pouco desenvolvida, com radícula desenvolvida.

Neste experimento foram utilizados embriões somáticos classificados em estágio 1, 2 e 3, e o encapsulamento feito a partir de diferentes concentrações de alginato de sódio (9,25; 18,5 e 37 mM), segundo o método de encapsulamento convencional. As sementes sintéticas bem como os controles para cada estágio (embriões sem cápsula) foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962).

As placas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e, após 30 dias procedeu-se a avaliação dos seguintes parâmetros: taxa de germinação, que consiste no rompimento da cápsula pelo desenvolvimento da radícula; taxa de rompimento da cápsula pelo desenvolvimento da parte aérea; taxa de morte dos embriões.

Para cada tratamento foram estabelecidas três repetições com 10 sementes sintéticas cada, totalizando 270 sementes sintéticas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando o software R.

Influência dos métodos de encapsulamento

Neste experimento foram utilizadas duas técnicas diferentes para o encapsulamento do material vegetal: a convencional e “hollow beads”, como descritas anteriormente.

Foram utilizados embriões somáticos em estágio cotiledonar sem radícula e as sementes sintéticas produzidas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura DEV (TEIXEIRA et al., 2004). Após 30 dias de incubação do material em sala de crescimento, procedeu-se a avaliação dos seguintes parâmetros: taxa de germinação; taxa de rompimento; taxa de morte dos embriões encapsulados; taxa de oxidação; presença de folhas; área foliar e diferença no comprimento médio da parte aérea.

Para cada tratamento foram estabelecidas 3 repetições com 15 sementes sintéticas e elaborou-se o controle a partir da inoculação de 15 embriões somáticos em placa de Petri com meio MS. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando o software R. Os dados binários (presença de folhas) foram submetidos à análise pelo modelo de regressão logística e o ajuste foi realizado utilizando-se o programa R (R Development Core Team 2008). Para verificar a significância do modelo foi utilizado o teste de Qui-Quadrado que, segundo Collet (1991) é comumente utilizado para verificar se a inclusão do parâmetro no modelo é significativo ao nível α de probabilidade.

Influência da composição da matriz de encapsulamento

Para a execução deste experimento os embriões somáticos em estágio cotiledonar com radícula desenvolvida foram submetidos ao encapsulamento em matrizes constituídas diferencialmente em relação à suplementação nutricional, à base de água ou meio de cultivo DEV (TEIXEIRA et al., 2004), e foram inoculadas em meio de cultivo DEV. Após 30 dias em sala de crescimento com

fotoperíodo de 12 horas, os parâmetros avaliados foram: taxa de germinação, taxa de rompimento, morte, oxidação, diferença no comprimento médio da parte aérea, diferença no comprimento médio da radícula, presença de folhas e área foliar. Foram estabelecidas 2 repetições com 10 sementes sintéticas para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação da germinação de embriões em meio sólido e líquido

Com o objetivo de averiguar a influência da condição do meio de cultura (MGM sólido ou líquido) na germinação e maturação de embriões foi analisado o número de embriões em cada estágio de desenvolvimento. O meio MGM líquido propiciou uma média de 326 embriões, sendo que a maior porcentagem destes se encontravam no estágio cordiforme/torpedo, seguido pelos embriões nos estádios cotiledonar e globular. No meio sólido (média de 191 embriões), a maior porcentagem de embriões contados se encontrava no estágio globular, seguido por cordiforme/torpedo e cotiledonar (Figura 1).

Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que (1) o material vegetal inoculado na superfície do meio sólido não dispõe de sua área de contato total para absorção da solução nutritiva, e/ou (2) foi observado ocorrência de embriogênese somática secundária no meio líquido.

No caso da massa embriogênica em meio líquido, a incorporação de nutrientes pode ser maximizada pela completa submersão no meio nutritivo e pela movimentação rotativa controlada desta solução exercida por intermédio do shaker. A possível absorção privilegiada de nutrientes por parte do material em meio líquido pode explicar o número superior de embriões em estágio mais desenvolvido em relação ao meio sólido e, além disso, em escala comercial, a não utilização do ágar pode refletir em redução dos custos do produto final.

Adicionalmente, em termos de praticidade, há uma simplificação no processo de elaboração do meio de cultura.

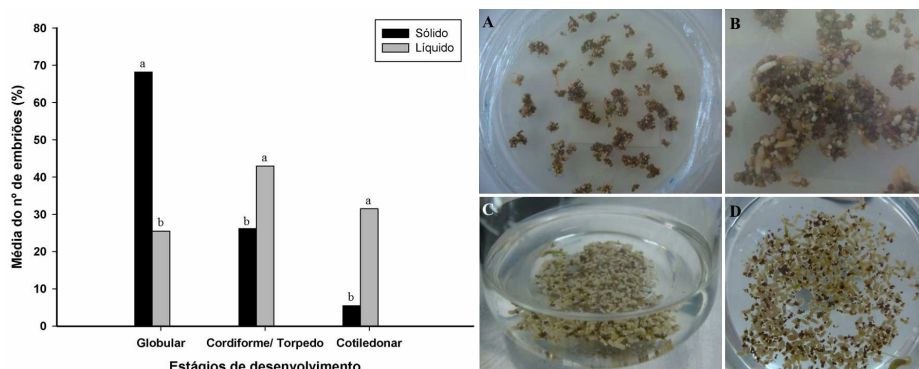


Figura 1 Média, em porcentagem, dos embriões somáticos em cada estágio de desenvolvimento em meios de cultivo MGM líquido e MGM sólido. *Médias relacionadas aos mesmo estágio de desenvolvimento do embrião seguidas por letras distintas são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Scott-Knott a 5% de significância. A e B) Embriões somáticos de café em meio MGM sólido; C e D) Embriões somáticos de café em meio MGM líquido.

Além disso, durante a condução dos experimentos com meio MGM líquido foi observada ocorrência de embriogênese somática secundária ou embriogênese repetitiva (Figura 2). Estudos realizados com *O. catharinensis* mostraram que a embriogênese repetitiva pode aumentar significativamente a quantidade de embriões somáticos e representa um importante sistema *in vitro* de produção para essa espécie haja visto os diversos entraves em sua propagação (SANTA-CATARINA et al., 2004).

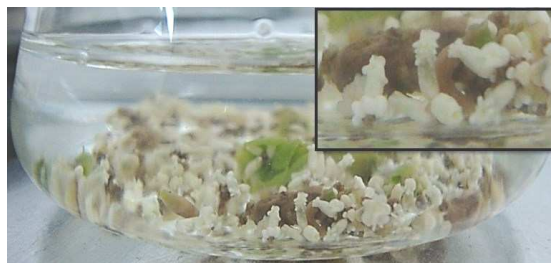


Figura 2 Embriões somáticos de *C. arabica*, cv. Catiguá, em meio de cultivo MGM líquido com ocorrência de embriogênese somática secundária.

Influência de estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos e concentrações de alginato de sódio

De acordo com a análise estatística não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de alginato de sódio e a interação estágio de desenvolvimento dos embriões x concentração de alginato de sódio não foi significativa para nenhuma das variáveis resposta.

Entretanto, foi constatada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos para as variáveis taxa de germinação, taxa de rompimento e morte dos embriões (Tabela 1).

Tabela 1 Influência do estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos de *Coffea arabica* na taxa de germinação, taxa de rompimento e morte dos embriões encapsulados.

Tratamento	Germinação (%)	Rompimento (%)	Morte (%)
Estádio 1	1,11 b	35,55 b	39,53 a
Estádio 2	1,11 b	79,16 a	32,60 a
Estádio 3	34,44 a	60,00 a	11,66 b

*Médias seguidas por letras distintas na coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Scott-Knott a 5% de significância.

A taxa superior de germinação observada nos embriões no estágio 3 era prevista, visto que estes possuíam radícula desenvolvida, ao contrário dos embriões pertencentes aos estádios 1 e 2. A presença de radículas, inclusive o

expressivo alongamento das mesmas nos embriões do estágio 3 (dados não mostrados) em detrimento da ausência de radículas nos demais estádios analisados provavelmente deve-se à diferença na composição e condições do meio de cultivo de onde os embriões foram obtidos. Os embriões classificados em estágio 1 e 2 foram obtidos a partir do cultivo em meio DEV sólido, o qual possui em sua composição 1,33 μM de citocinina BAP, enquanto que os embriões do estágio 3 foram cultivados em meio MGM líquido, composto por 2,57 μM de auxina (AIA) e 1,11 μM de citocinina (BAP). O balanço ideal de auxina e citocinina aliado à condição de cultivo em meio líquido propiciaram o desenvolvimento de radícula nos embriões, o que está de acordo com a literatura (REZENDE et al., 2011).

É interessante notar que embriões sem radícula submetidos ao encapsulamento nas condições de trabalho citadas apresentaram taxas muito baixas de germinação. Assim, reguladores de crescimento na composição da matriz de encapsulamento podem ser uma alternativa para a indução e maximização do desenvolvimento do sistema radicular nos embriões como demonstrado em trabalhos com *C. torelliana* x *C. citriodora*, *C. grandiflora*, *A. comosus* (HUNG & TRUEMAN, 2012; PINKER & ABDEL RAHMAN, 2005; SONEJI et al., 2002).

Neste experimento, as taxas superiores de rompimento para os embriões nos estádios 2 e 3 demonstraram-se em função da presença de sistema radicular e parte aérea bem desenvolvida, respectivamente. Foi constatado que o estágio 3 apresentou valores inferiores em relação a taxa de morte, indicando possível interferência da presença do sistema radicular na baixa mortalidade dos embriões. A presença de raízes e, conseqüentemente maior absorção de nutrientes do meio atua como fator positivo na sobrevivência de embriões encapsulados.

Influência dos métodos de encapsulamento

Não foi possível avaliar a influência dos métodos de encapsulamento convencional e “hollow beads” sobre a germinação das sementes sintéticas, uma vez que não houve desenvolvimento de raízes nos embriões somáticos encapsulados e nos inoculados sem cápsula (controle). Em relação às variáveis rompimento, morte e oxidação, constataram-se resultados absolutos em todos os tratamentos, sendo 100% para o rompimento e zero para morte e oxidação (Figura 3).

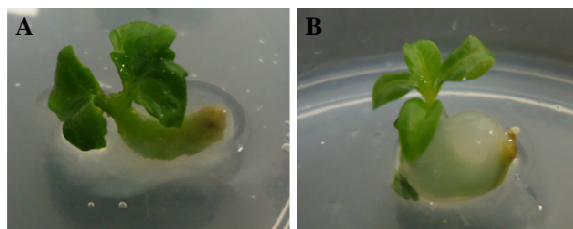


Figura 3 Rompimento da cápsula pelo desenvolvimento do embrião somático nos diferentes métodos de encapsulamento. A) método “hollow beads”; B) método convencional.

Para as variáveis área foliar e diferença no comprimento médio da parte aérea não houve diferença estatística entre os dois métodos de encapsulamento. Contudo, foi observada diferença significativa para a variável presença de folhas, segundo o modelo de regressão logística múltipla a 95% de confiabilidade. De acordo com as análises houve influência positiva do método de encapsulamento “hollow beads” sobre esta variável nos embriões somáticos, aumentando em 2,3 a chance de ocorrer este efeito. Em experimentos com calos embriogênicos de *Daucus carota*, Patel et al. (2000) relataram a influência positiva do encapsulamento “hollow beads” consequente da redução de barreiras espaciais e para a difusão de nutrientes.

Apesar do bom rendimento da técnica em aspectos fisiológicos, é importante ressaltar que, no caso deste experimento, as “hollow beads” demonstraram menor resistência mecânica e, conseqüentemente dificuldades inerentes à manipulação comparadas às sementes sintéticas produzidas pelo método convencional. Sementes sintéticas podem tornar-se instrumentos ideais para a estocagem e transporte de material vegetal (SHARMA et al., 2013). Contudo, para que essa possibilidade concretize-se, a resistência mecânica das cápsulas é um fator essencial a ser considerado e otimizado.

Influência da composição nutricional da matriz de encapsulamento

Constatou-se que as sementes sintéticas produzidas a partir de cápsulas elaboradas com solução nutritiva DEV apresentaram taxas superiores de germinação (77,5%) em relação às sementes sintéticas produzidas com cápsulas à base de água (60%) (Tabela 2).

Tabela 2 Influência dos tratamentos na porcentagem de germinação das sementes sintéticas de *Coffea arabica*.

Tratamento	Germinação (%)
Cápsula com DEV	77,5 a
Cápsula com H ₂ O	60,0 b

*Médias seguidas por letras distintas são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5% de significância.

A adição de solução nutritiva na matriz de encapsulamento já foi relatada com sucesso em diversos trabalhos (IPEKEI e GOZUKIRMIZI, 2003; MANJKHOLA et al., 2005; UTOMO et al., 2008; CARTES et al., 2009). A otimização dos aspectos nutricionais interferentes no desenvolvimento do embrião encapsulado é fundamental para que a cápsula atue como endosperma artificial, possibilitando a conversão das sementes sintéticas em plântulas (Figura 4).

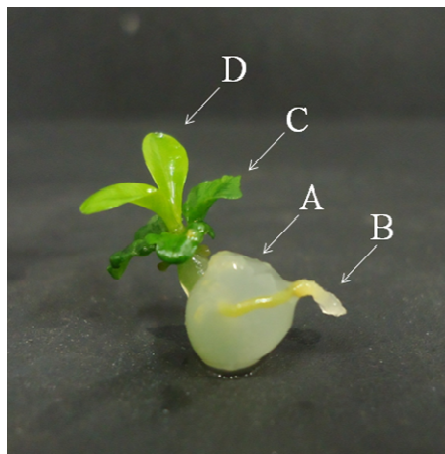


Figura 4 Semente sintética de *Coffea arabica*, cv. Catiguá germinada. A) Cápsula de alginato de cálcio; B) Protusão da radícula do embrião somático; C) Cotilédone; D) Desenvolvimento foliar.

Neste experimento foram obtidas taxas totais de rompimento das sementes sintéticas em ambos os tratamentos e não houve constatações de morte e oxidação dos embriões somáticos. Para as variáveis presença de folhas, área foliar, diferença no comprimento médio de raízes e parte aérea não houve diferença significativa.

A partir da análise dos dados, pode-se ressaltar que o encapsulamento em gel de alginato de cálcio não foi prejudicial em relação a nenhum aspecto do desenvolvimento dos embriões somáticos, como evidência disto, a taxa de rompimento das cápsulas em ambos os tratamentos foi total (100%). Na literatura, há vários relatos de taxas diferentes de conversão de sementes sintéticas elaboradas a partir de embriões somáticos, como nos experimentos com *Acca sellowiana* (70,3%), *Psidium guajava* (91,6%), *Dalbergia sisso* (43,3%) e *Clitoria ternatea* (92%) (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2007; RAI et al., 2008; SINGH & CHAND, 2010; KUMAR & THOMAS, 2012).

CONCLUSÕES

A maturação dos embriões em meio de cultura MGM líquido é favorável para a obtenção de embriões somáticos no estágio cordiforme/ torpeda e cotiledonar.

A técnica convencional de encapsulamento é de fácil manipulação para produção das cápsulas.

Os embriões com radícula desenvolvida exibiram maior eficiência para a produção de sementes sintéticas, com taxas de germinação e rompimento superiores e taxas de morte inferiores aos outros estádios de desenvolvimento.

A adição de solução nutritiva DEV na matriz de encapsulamento refletiu em taxas de conversão das sementes sintéticas em plântulas de 77,5%.

Faz-se importante ressaltar que estudos para a adaptação desta metodologia para a aplicação das sementes sintéticas em ambiente *ex vitro* são pertinentes e promissores.

REFERÊNCIAS

- ARUN KUMAR, M.B.; VAKESWARAN, V.; KRISHNASAMY, V.
Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. **Plant Cell and Organ Culture**. 81:97-100, 2005.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G.C. et al. Improvements in somatic embryogenesis protocol in feijoa (*Acca selowiana* (Berg) Burret): induction, conversion and synthetic seeds. **Scientia Horticulturae**. 111:228-234, 2007.
- CARTES, P.R. et al. Encapsulated somatic embryos and zygotic embryos for obtaining artificial seeds of rauli-beech [*Nothofagus alpine* (Poepp. & Endl.) Oerst]. **Chile Journal of Agricultural Research**, 69:112-118, 2009.
- COLLET, D. **Modelling binary data**. London: Chapman & Hall. 1991. 369p.
- DONATO, V.M.T.S. et al. Embriogênese somática *in vitro* em couve-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 35(4):711-718, 2000.

ETIENNE, H. et al. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. **Tree Physiology**. 33:640-653, 2013.

GANAPATHI, T.R. et al. Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. rasthali (*Musa* spp. AAB group). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 37:178-181, 2001.

HUNGH, C. D.; TRUEMAN, S. J. Alginate encapsulation of shoot tips and nodal segments for short term storage and distribution of the eucalypt *Corymbia torelliana* x *C. citrodora*. **Acta Physiologiae Plantarum**. 34:117-128, 2012.

IPEKEI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Direct somatic embryogenesis and synthetic production seed production from *Paulownia elongate*. **Plant Cell Reports**. 22:16-24, 2003.

KUMAR, G.K.; THOMAS, T.D. High frequency embryogenesis and synthetic seeds production in *Clitoria ternatea* Linn. **Plant Cell and Organ Culture**. 110:141-151, 2012.

MANJKHOLA, S.; DHAR, U.; JOSHI, M. Organogenesis, embryogenesis and synthetic seed production in *Arnebia euchroma*-a critically endangered medicinal plant of the Himalaya. **In vitro Cellular and Development Biology-Plant**. 41:244-248, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15(3):473-497, 1962.

NIRALA, N.K. et al. Encapsulated somatic embryos of grapes (*Vitis vinifera* L.): An efficient way for storage, transport and multiplication of pathogen free plant material. **Journal of Molecular Biology and Biotechnology**. 18:159-162, 2010.

NYENDE, A.B. et al. Production, storability and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads. **In Vitro Cellular Development and Biology-Plant**. 39:540-544, 2003.

PATEL, A.V. et al. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. **Plant Cell Reports**. 19:868-874, 2000.

- PINKER, I.; ABDEL-RAHMAN, S.S.A. Artificial seed for propagation of *Dendranthema grandiflora* (Ramat). **Propagation of Ornamental Plants**. 5:186-191, 2005.
- RAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). **Scientia Horticulturae**. 117:302-305, 2008.
- REZENDE, J. C. et al. Influência de auxina e citocinina no desenvolvimento de embriões somáticos de *Coffea arabica* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 7(1):1-8, 2011.
- RIBAS, A. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biology**. 11(1):1-15, 2011.
- SANTA-CATARINA, C. et al. Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of embryoid developmental stage, activated charcoal and dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 78:51-53, 2004.
- SHARMA, S., SHAZAD, A.; SILVA, J.A.T. Synseed technology- A complete synthesis. **Biotechnology Advances**. 31:186-207, 2013.
- SINGH, A.K.; CHAND, S. Plant regeneration from alginate-encapsulated somatic embryos of *Dalbergia sisso* Roxb. **Indian Journal of Biotechnology**. 9:319-324, 2010.
- SINGH, B. et al. *In vitro* response of encapsulated and non-encapsulated embryos of *Kinnow mandarin* (*Citrus nobilis* Lour x *Citrus deliciosa* Tenora). **Plant Biotechnology Reports**. 1:101-107, 2007.
- SONEJI, J.R.; RAO, P.S.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **Plant Cell Reports**. 20:891-894, 2002.
- TEIXEIRA, J. B. et al. Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. **EMBRAPA Documentos**, 121:39, 2004.
- UTOMO, H.S. et al. Synthetic as a potencial direct delivery system of mass produced somatic embryos in the coastal marsh plant smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 92:281-291, 2008.