



**NATÁLIA CHAGAS FREITAS**

**SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA E  
PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DA FAMÍLIA  
LAV DURANTE A EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA EM CAFEIEIRO**

**LAVRAS – MG  
2015**

**NATÁLIA CHAGAS FREITAS**

**SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA E PERFIS DE EXPRESSÃO  
GÊNICA DA FAMÍLIA LAV DURANTE A EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA EM CAFEIEIRO**

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

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientadores

Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Freitas, Natália Chagas.

Seleção de genes de referência e perfis de expressão gênica da família LAV durante a embriogênese somática em cafeeiro / Natália Chagas Freitas. – Lavras : UFLA, 2015.

107 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Café arábica. 2. Genes normalizadores. 3. Bioinformática. 4. RT-qPCR. 5. VAL2. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**NATÁLIA CHAGAS FREITAS**

**SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA E PERFIS DE EXPRESSÃO  
GÊNICA DA FAMÍLIA LAV DURANTE A EMBRIOGÊNESE  
SOMÁTICA EM CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2015.

Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho	EMBRAPA
Dr. Horllys Gomes Barreto	UFT
Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz	EMBRAPA

Orientador  
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Aos meus pais; Valda e Alfeu, pela importância incondicional que têm na minha vida, sempre abdicando de suas próprias vontades para que meus sonhos e objetivos se realizem.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por guiar meus passos.

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelos recursos utilizados na condução dos experimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelos ensinamentos, críticas, sugestões e conversas de incentivo e motivação para prosseguir minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto pela coorientação, disponibilidade em me ajudar e ensinar, com paciência e dedicação. Obrigada por contribuir 110% pela execução deste trabalho.

Ao Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz pela coorientação e conselhos.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beijo pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho pelas sugestões essenciais sobre a regeneração de embriões somáticos.

Ao Prof. Dr. Antônio Chalfun Júnior pela parceria estabelecida.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) e Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP) da UFLA, por fornecerem as instalações para a realização dos experimentos.

Aos meus amigos do LCBM e LFMP, pela agradável convivência, em especial ao Grupo Café (Jéssica, Leonardo, Luana, Luciana, Luciene e Renan), Flávia, Wesley, Claudiana, Heliete, Christiane, Bruno e Rafael.

Aos companheiros de mestrado da Biotecnologia Vegetal 2014/1, Rayana e Jaire, pela amizade, apoio e ajuda de sempre.

Aos amigos e familiares de Ibiraci-MG, pelas orações e incentivo dessa conquista.

Aos meus pais e meu irmão, por torcerem e sempre acreditar no meu potencial.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Visando contribuir para a compreensão do processo de indução da embriogênese somática, fundamental para o desenvolvimento de protocolos de regeneração mais eficientes, objetivou-se com esse trabalho identificar, caracterizar e analisar os padrões de expressão dos genes da família LAV durante a embriogênese somática indireta de *Coffea arabica* L. a partir da normalização de dados de RT-qPCR com genes de referência adequados. A correlação da expressão dos genes com o potencial embriogênico foi realizada comparativamente com o auxílio de análises histológicas e regeneração de embriões somáticos em duas linhagens independentes de suspensões celulares. Primeiramente, foi analisada a estabilidade de expressão de doze candidatos a genes de referência (*24S*, *ACT*, *GAPDH*, *CYCL*, *EF1a*, *TUB*, *PP47*, *PP2A*, *RPL39*, *APRT*, *UBQ*, *14-3-3*) em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento relacionados a embriogênese somática do cafeeiro. As análises foram realizadas através da ferramenta *RefFinder* que compila os algoritmos estatísticos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct*. Os resultados obtidos sugerem que não há um gene de referência universal adequado para todas as variáveis experimentais. A expressão mais estável em calo não embriogênico, calo embriogênico e suspensão celular em diferentes tempos de cultivo correspondeu aos genes *UBQ*, *ACT* e *APRT*, respectivamente. O gene *RPL39* apresentou maior estabilidade na análise em conjunto de calos não embriogênicos e embriogênicos. Enquanto em plântula e embrião nos diferentes estádios, *PP2A* apresentou maior estabilidade de expressão. A análise em conjunto de todas as amostras indicou que *24S* e *PP2A* são os genes de referência mais adequados para normalização de dados de RT-qPCR. Com o auxílio de ferramentas de bioinformática, foram identificados apenas três possíveis ortólogos de *VAL2* (*C15*, *SEA1* e *SIC1*) dentre os genes da família LAV. Os perfis de expressão verificados *in vivo* diferiram dos obtidos *in silico*, os dados mostraram expressão quantitativa relativa variável do *C15* e *SIC1* em todas as amostras analisadas e ausência de expressão de *SEA1* em todos os tecidos. Não foi verificada relação dos níveis de expressão de *C15* e *SIC1* com o potencial embriogênico. As linhagens de suspensões celulares apresentaram o mesmo padrão histológico e aumento da taxa de regeneração em função do tempo de cultivo. O bom desenvolvimento das plântulas obtidas a partir do protocolo utilizado pode ser reflexo da alta expressão de *VAL2* nos embriões cotiledonares. O conhecimento da expressão de *VAL2* abre perspectiva para a melhoria do sistema de propagação via embriogênese somática, visando assegurar a conversão de embriões em plântulas normais.

Palavras-chave: Café arábica. Genes normalizadores. Bioinformática. RT-qPCR. *VAL2*.

## ABSTRACT

In order to contribute to the understanding of the induction process of somatic embryogenesis, critical to the development of more effective regeneration protocols, this work aimed to identify, characterize, and analyze the expression patterns of LAV gene family during indirect somatic embryogenesis of *Coffea arabica* L. through the RT-qPCR data normalization with suitable reference genes. The correlation of the gene expression with the embryogenic potential was performed comparatively with the aid of histological analyses and somatic embryo regeneration in two independent lineages of cell suspension. First, the stability of the expression of twelve candidates to reference genes (*24S*, *ACT*, *GAPDH*, *CYCL*, *EF1a*, *TUB*, *PP47*, *PP2A*, *RPL39*, *APRT*, *UBQ*, *14-3-3*) was analyzed in different tissues and developmental stages related to coffee somatic embryogenesis. Analyses have been performed using the *RefFinder* tool which compiles *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper*, and *Delta-Ct* statistical algorithms. Results suggest that there is no universal reference gene suitable to all experimental variables. The most stable expression in non-embryogenic callus, embryogenic callus, and cell suspension on different cultivation periods corresponds to the genes *UBQ*, *ACT*, and *APRT*, respectively. The *RPL39* gene presented the highest stability on analysis of embryogenic and non-embryogenic calli. Meanwhile, in seedlings and embryos in different stages, *PP2A* exhibited the highest expression stability. The analyses of all samples together indicated that *24S* and *PP2A* are the most suitable reference genes for RT-qPCR data normalization. With the aid of bioinformatics tools, only three possible *VAL2* (C15, SEA1, and SIC1) orthologs were identified among LAV gene family. The expression profiles confirmed *in vivo* differed from those obtained *in silico*, and the data showed variable quantitative relative expression of C15 and SIC1 in all analyzed samples and lack of SEA1 expression in all tissues. No relations at the expression level of C15 and SIC1 with the embryogenic potential have been found. The lineages of cell suspension presented the same histological pattern and increased regeneration rate due to the cultivation time. The successful development of seedlings obtained using the protocol may be a consequence of the high expression of *VAL2* in cotyledonary embryos. The knowledge of *VAL2* expression gives a chance to improve the propagation via somatic embryogenesis in order to ensure the conversion of embryos to normal seedlings.

Keywords: Arabica coffee. Normalization genes. Bioinformatics. RT-qPCR. *VAL2*.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1 O cafeeiro e sua importância econômica</b> .....	14
<b>2.2 Embriogênese somática</b> .....	16
<b>2.3 Potencial embriogênico das suspensões celulares</b> .....	18
<b>2.4 Caracterização histológica de células embriogênicas</b> .....	19
<b>2.5 Genes relacionados à embriogênese somática</b> .....	20
<b>2.5.1 Genes AFL</b> .....	22
<b>2.5.2 Genes VAL</b> .....	23
<b>2.6 Projeto Brasileiro do Genoma Café</b> .....	24
<b>2.7 RT-qPCR e genes referência</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	43
<b>ARTIGO 1 Seleção de genes de referência para análises de RT-qPCR em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento relacionados à embriogênese somática de <i>Coffea arabica</i> L.</b> .....	44
<b>ARTIGO 2 Análise <i>in silico</i> dos genes da família LAV e expressão quantitativa de VAL2 durante a embriogênese somática indireta de <i>Coffea arabica</i> L.</b> .....	78

**PRIMEIRA PARTE**  
Introdução geral

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma das culturas de maior importância na economia mundial, destacando-se como um dos produtos básicos mais valiosos. Seu cultivo, transporte, processamento, comércio e *marketing* geram milhões de empregos em todo o mundo. Dentre as espécies de café existentes, café arábica (*Coffea arabica* L.) apresenta melhor qualidade de bebida e corresponde a mais de 60% de toda produção e comercialização mundial (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ - OIC, 2014).

Na busca por uma cafeicultura mais eficiente, há uma demanda constante de novas variedades resistentes a pragas e doenças, e também adaptadas às diferentes condições de cultivo, com elevadas produções e grãos de alta qualidade. A biotecnologia aplicada ao cafeeiro é uma importante ferramenta de auxílio aos programas de melhoramento convencional, possibilitando a identificação, avaliação e multiplicação de novos genótipos; conservação de germoplasma e obtenção de novos materiais genéticos com características agronômicas superiores em menor tempo através da transformação genética (MORAIS; MELO, 2011).

Entre as técnicas biotecnológicas que auxiliam o melhoramento genético de plantas destaca-se a embriogênese somática. O processo é característico das plantas vasculares pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta, através de uma série de estágios embrionários semelhantes à formação de um embrião zigótico (RODRÍGUEZ et al., 2000; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Os embriões somáticos podem ser formados de forma direta ou indireta. No processo de embriogênese somática indireta, as células precursoras passam por uma etapa intermediária de formação de calo e na via direta o embrião somático se origina diretamente do explante (SHARP et al., 1980).

A utilização de suspensões celulares de café na metodologia de embriogênese somática indireta é a mais promissora. As suspensões celulares correspondem ao calo embriogênico friável, isolado do seu explante de origem, e mantido em meio líquido em estado indiferenciado até o momento da diferenciação em embriões. A taxa de regeneração de embriões de genótipos arábica em cultura líquida chega a ser 15 vezes maior quando comparado a calos embriogênicos cultivados em meio semi-sólido (MACIEL et al., 2003; SÖNDAHL; SHARP, 1977).

Apesar da alta frequência de embriões somáticos induzidos a partir de suspensões celulares embriogênicas de café, torna-se necessário o desenvolvimento e aplicação de parâmetro(s) que aumente(m) a eficiência metodológica para identificação de suspensões celulares com alta capacidade regenerativa. Uma vez que, linhagens consideradas embriogênicas podem não regenerar embriões em meio de indução embriogênica (TEIXEIRA et al., 2004).

A caracterização de células embriogênicas pode ser realizada por análises histológicas, porém a técnica é demorada e incapaz de inferir sobre a taxa de regeneração de embriões somáticos. Esse potencial embriogênico pode ser identificado de forma eficiente e confiável por meio da análise da expressão de genes marcadores relacionados à indução da embriogênese somática (SILVA et al., 2014).

Os fatores de transcrição pertencentes à superfamília B3 estão entre os genes que codificam proteínas que fazem parte da cascata de sinais de indução e de desenvolvimento dos embriões (SUZUKI; McCARTY, 2008). No genoma de *Arabidopsis* a superfamília B3 é composta pelas famílias LAV, RAV, ARF e REM sendo a LAV a que exerce papel fundamental na embriogênese e é constituída pelos genes AFL (*ABI3*, *FUS3* e *LEC2*) e VAL (*VAL1*, *VAL2* e *VAL3*), estando os genes AFL diretamente envolvidos com a embriogênese zigótica e somática e os genes VAL relacionados à percepção de sinalização de

açúcares durante o desenvolvimento vegetativo (BARRETO, 2013; GAJ et al., 2005; IKEDA-IWAI; SATOH; KAMADA, 2002; IKEDA-IWAI et al., 2003; KIKUCHI et al., 2006; LEDWON; GAJ, 2011; SHARMA, 2013; SHIOTA et al., 1998; TSUKAGOSHI et al., 2005; TSUKAGOSHI; MORIKAMI; NAKAMURA, 2007; ZHANG et al., 2014). Estudos sobre a caracterização funcional dos genes VAL durante a embriogênese somática permanecem inexplorados.

A simplicidade conceitual e prática da técnica de RT-qPCR, em conjunto com a rapidez, sensibilidade, alto rendimento, precisão e reprodutibilidade (BUSTIN et al., 2005; LOGAN; EDWARDS; SAUNDERS, 2009) tornaram este método bastante viável para a quantificação de expressão gênica. No entanto, a obtenção de resultados confiáveis por RT-qPCR é dependente da utilização de genes de referência adequados que serão utilizados como controle interno para normalizar e acompanhar a variação de expressão entre as amostras (PFALL et al., 2004; SANTIS; SMITH-KEUNE; JERRY, 2011; VANDESOMPELE et al., 2002). Vários estudos relataram a inexistência de um gene de referência universal para ser empregado amplamente em diferentes tecidos e condições experimentais (CHEN et al., 2011; CHENG et al., 2013; GUTIERREZ et al., 2008; IMAI et al., 2014; LIN et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009; ZENG et al., 2014). Assim, a identificação de genes de referência adequados é um passo inicial essencial no desenvolvimento de métodos de RT-qPCR (DOCIMO et al., 2013).

O presente trabalho visou contribuir para a elucidação do processo de aquisição de competência embriogênica em café, fundamental para o desenvolvimento de protocolos de regeneração mais eficientes. Para isso, os genes da família LAV foram identificados, caracterizados e analisados quanto a seus respectivos padrões de expressão durante a embriogênese somática de

*Coffea arabica* L. a partir da normalização de dados de RT-qPCR com genes de referência adequados.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 O cafeeiro e sua importância econômica**

O cafeeiro é uma cultura perene pertencente à família Rubiaceae, gênero *Coffea*. Dentre as 103 espécies de café existentes (DAVIS et al., 2006), as mais importantes no mercado mundial são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre, vulgarmente conhecidos como café arábica e robusta, respectivamente. O café é uma das *commodities* mais comercializadas no mundo, sendo produzido em cerca de 60 países, destacando-se entre as atividades de maior importância socioeconômica (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ - OIC, 2014).

O Brasil lidera a produção mundial de café, ocupando atualmente uma área cultivada de 2,257 milhões de hectares, dos quais 85,7% estão em produção e 14,3% estão em formação. As maiores áreas de cultivo concentram-se nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Bahia sendo o estado mineiro responsável por 67,7% da área ocupada com café arábica em nível nacional. A média de produção na safra cafeeira em 2015 está estimada entre 44,11 e 46,61 milhões de sacas de café beneficiado, das quais 73,7% são de café arábica e os 26,3% restantes de café robusta (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015).

Alguns indicadores econômicos reforçam a importância da cadeia produtiva vinculada ao café, uma vez que o setor cafeeiro nacional é responsável por gerar cerca de 8,4 milhões de empregos diretos e indiretos no país (BRASILEIRO, 2014).

Mesmo *C. arabica* sendo extensamente cultivado, há fatores limitantes à sua produção. A espécie é suscetível a doenças e pragas, como fungos, ácaros, nematóides endoparasíticos, bicho-mineiro, cigarras, cochonilhas, lagarta dos cafezais e a broca-do-café, causando anualmente aos produtores bilhões de dólares em prejuízos (ZAMBOLIN, 2003). Cerca de 35 a 40% da perda de produção de café arábica é atribuída a ferrugem da folha que possui como agente causal o fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome (GARCIA; RODRIGUES; COSTA, 2000; KUMAR; NAIDU; RAVISHANKAR 2006). Estresses abióticos, como a seca, salinidade e temperaturas extremas, também são sérias ameaças para a cafeicultura. As mudanças nos padrões climáticos, devido à mudança climática global são consideradas cada vez mais importantes e limitantes para o cultivo de café (CARVALHO et al., 2013; MISHRA; SLATER, 2012).

A fim de diminuir as perdas de produção, os programas de melhoramento genético do cafeeiro são motivados a obter plantas tolerantes à estresses abióticos e resistentes à pragas e doenças. Associada às características de variedades superiores há também uma demanda constante por genótipos capazes de produzir grãos de alta qualidade, sendo a excelência em qualidade do café um critério para se atingir os mercados que melhor remuneram o produtor (MATOS, 2003).

Através do melhoramento clássico, a obtenção de novas variedades pode levar cerca de 30 anos, pois a espécie possui ciclo de seleção longo, e a obtenção de sementes de plantas homozigóticas somente é possível após seis gerações (SÖNDAHL; SÖNDAHL; GONÇALVES, 1999). A biotecnologia associada ao melhoramento convencional é essencial nos dias atuais, pois permite acelerar a liberação de variedades com características agronômicas superiores (GATICARIAS; ARRIETA-ESPINOZA; ESQUIVEL, 2008).

Dentre as técnicas biotecnológicas mais promissoras ao melhoramento genético de plantas está a produção assexuada de embriões *in vitro*. A embriogênese somática abre perspectivas para propagação clonal massal de genótipos elite e conservação de germoplasma, além de ser um eficiente sistema de regeneração no processo de transformação genética.

## 2.2 Embriogênese somática

A embriogênese somática é definida como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se formando estruturas semelhantes ao embrião zigótico, dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão gamética (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Este fenômeno ocorre em células vegetais que recebem estímulo e condições adequadas (ALMEIDA; OLIVEIRA; DANTAS, 2001; ANANDAN et al., 2012; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; PINTO et al., 2011; SUN et al., 2011;), pois apresentam as propriedades de totipotência e plasticidade genética (AMMIRATO, 1983; VERDEIL et al., 2007).

O embrião somático é uma estrutura bipolar, o qual apresenta como particularidade a presença de sistema vascular fechado, sem conexão com o tecido de origem (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). Os estádios de desenvolvimento embrionário - globular, codiforme, torpedo e cotiledonar - são semelhantes ao padrão de desenvolvimento do embrião zigótico (HACCIUS, 1978; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999). A similaridade entre os processos da embriogênese somática e zigótica também é verificada em padrões bioquímicos e moleculares (FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007; IKEDA et al, 2006; WINKELMANN et al., 2006; ZIMMERMAN, 1993).

Apenas as 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 (FLOH; SANTA-CATARINA; SILVEIRA, 2007), qualificando a embriogênese somática como modelo efetivo para os estudos em diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões (DODEMAN; DUCREUX; KREIS, 1997; ZIMMERMANN, 1993).

Além do emprego da embriogênese somática como modelo de referência em estudos a nível morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular esta técnica é a mais promissora para propagação clonal. Comparando-se às demais técnicas de propagação, a embriogênese somática apresenta vantagens como: a) obtenção de grande quantidade de embriões somáticos em pequeno espaço físico; b) permite alto grau de automatização através do uso de biorreatores, levando a redução dos custos por unidade produzida; c) os embriões somáticos podem ser produzidos com alto grau de uniformização e pureza genética; d) pode ser utilizada como ferramenta integrada a programas de melhoramento genético, em especial quando associada a técnicas de criopreservação e engenharia genética (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

A embriogênese somática *in vitro* pode apresentar dois padrões de desenvolvimento embriogênico: embriogênese somática direta (ESD), na qual os embriões somáticos são formados diretamente sobre o tecido vegetal, sem a formação de calo e a embriogênese somática indireta (ESI), na qual os embriões somáticos originam-se de células embriogênicas induzidas de calos (SHARP et al., 1980). Relatos bibliográficos relacionados à embriogênese somática de café demonstram maior sucesso na frequência de embriões induzidos pela ESI, especificamente, através de suspensões celulares embriogênicas (NORIEGA; SÖNDAHL, 1993; SÖNDAHL; SHARP, 1977; TEIXEIRA et al., 2004; VAN BOXTEL; BERTHOULY, 1996).

### 2.3 Potencial embriogênico das suspensões celulares

A embriogênese somática por via indireta pode ser realizada em meio líquido através de suspensões celulares. As suspensões celulares de café correspondem a setores embriogênicos que apresentam coloração amarela intensa, textura granular e alta friabilidade (TEIXEIRA et al., 2004) inoculados em meio líquido sob agitação constante.

Suspensões celulares de *Coffea arabica*, em condições adequadas, podem ser subcultivadas por um período de tempo relativamente longo, sem variação somaclonal (ETIENNE; BERTRAND, 2003) e sem a perda da capacidade regenerativa (TEIXEIRA et al., 2004). Além da manutenção das células, as suspensões celulares propiciam maior propagação dos setores embriogênicos, uma vez que as taxas de divisão celular são muito mais elevadas em sistema líquido (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; MATSUMOTO, 2006), constituem também um sistema *in vitro* utilizado em diversos trabalhos, como por exemplo, para transformação genética e isolamento de protoplastos (MAZAREI et al., 2011).

Estudos realizados para estabelecer protocolos de embriogênese somática em *C. arabica* demonstraram que suspensões celulares possuem maior eficiência na taxa regenerativa de embriões. Enquanto calos originam cerca de 200 embriões por grama cultivado em meio semi-sólido (MACIEL et al., 2003), em cultura líquida, os agregados celulares podem produzir cerca de 12.300 embriões/grama de matéria fresca (SÖNDAHL; SHARP, 1977). Contudo, a eficiência da regeneração de embriões somáticos pode ser extremamente reduzida devido à qualidade das células em suspensão, em que a competência embriogênica pode estar restrita a uma pequena fração dos aglomerados

celulares (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Neste sentido, estudos para a identificação de suspensões com grande quantidade de células competentes a regenerar embriões são importantes para a otimização de protocolos.

#### **2.4 Caracterização histológica de células embriogênicas**

O conhecimento anatômico do material, através de análises histológicas, auxilia na compreensão dos eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro* (YEUNG, 1995) como, por exemplo, verificação e confirmação de embriões somáticos e a definição da origem direta ou indireta (RODRIGUES; OLIVEIRA; MARIATH, 2004).

O estudo dos eventos morfoanatômicos pode melhorar significativamente o entendimento dos mecanismos da embriogênese somática por meio da identificação das mudanças celulares e compreensão da dinâmica das células (SILVA et al., 2014). A observação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos, permite o aumento da manipulação das respostas embriogênicas (BARBOSA et al., 2003).

As suspensões celulares podem apresentar dois tipos celulares distintos: células maiores altamente vacuoladas (células não embriogênicas) e células menores densamente citoplasmáticas (células com potencial embriogênico) (MAZAREI et al., 2011).

Estudos realizados em *Coffea* spp. demonstraram que as células embriogênicas apresentam modificações características a nível do núcleo, citoplasma e parede celular. As células embriogênicas foram identificadas como sendo pequenas, isodiamétricas, apresentam núcleo grande e nucléolo proeminente, vacúolo diminuto, intensa divisão celular e alta densidade citoplasmática (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002; PÁDUA et al., 2014; RIBAS et al., 2011; SILVA et al., 2014), devido ao alto metabolismo celular também

apresentam elevada quantidade de grãos de amido (MOURA, 2007; STEINMACHER et al., 2011).

Apesar das análises histológicas serem de grande utilidade metodológica para a distinção de células embriogênicas (SCHMIDT et al., 1997), não são capazes de inferir a capacidade regenerativa do material vegetal além de ser relativamente demorada. Com isso, estudos da embriogênese a nível molecular, identificando, caracterizando e analisando a expressão de genes relacionados à indução de embriões somáticos, vêm sendo intensamente realizados em diversas espécies (GRUSZCZYNSKA; RAKOCZY-TROJANOWSKA, 2011; HECHT et al., 2001; MA et al., 2012; NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003; SALAJ et al., 2008; SCHELLENBAUM et al., 2008; SCHMIDT et al., 1997; SILVA et al., 2014; ZHANG et al., 2014) a fim de selecionar genes marcadores para melhoria do sistema de embriogênese somática e de suas aplicações. A identificação de genes envolvidos no processo de aquisição de competência embriogênica pode auxiliar de maneira mais rápida e sensível o desenvolvimento de protocolos de regeneração mais eficientes.

## **2.5 Genes relacionados à embriogênese somática**

A embriogênese somática pode ser dividida nas fases de indução e expressão (JIMÉNEZ, 2001), nessas fases a manifestação da totipotencialidade vegetal envolve a desdiferenciação das células somáticas, por meio da qual são alterados os perfis de expressão gênica e reprogramação das células que estão envolvidas no processo, permitindo o estabelecimento de um novo programa de desenvolvimento capaz de induzir embriões somáticos (ELHITI; STASOLLA; WANG, 2013; RODRIGUES e KERBAUY, 2009).

A indução embriogênica é provavelmente a etapa mais importante do processo e sua frequência está relacionada com a interação complexa entre

fatores genéticos (MALABADI et al., 2011; PINTO et al., 2011), fisiológicos (ALMEIDA; OLIVEIRA; DANTAS, 2001; FARZANA et al., 2008; JIMÉNEZ, 2001) e condições de cultivo (ALMEIDA; OLIVEIRA; DANTAS, 2001; ANANDAN et al., 2012; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; PINTO et al., 2011; SUN et al., 2011).

A identificação de marcadores moleculares relacionados ao potencial embriogênico deve ser realizada na fase de indução embriogênica, pois é a fase antecedente à regeneração de embriões somáticos. Vários estudos que correlacionam o potencial embriogênico ao padrão de expressão de genes específicos levaram à identificação dos genes *SERK*. Homólogos ao *SERK* são considerados como marcadores da embriogênese em diversas culturas vegetais como, por exemplo, em *Arabidopsis thaliana* (HECHT et al., 2001; SALAJ et al., 2008); *Daucus carota* (SCHIMIDT et al., 1997); *Medicago truncatula* (NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003); *Vitis vinifera* (SCHELLENBAUM et al., 2008); *Secale cereale* (GRUSZCZYNSKA; RAKOCZY-TROJANOWSKA, 2011); *Ananas comosus* (MA et al., 2012), entre outras.

Recentemente, foi identificado e caracterizado um ortólogo ao gene *SERK* em *C. arabica* e verificou-se que sua expressão não se dá exclusivamente em células embriogênicas (calos e suspensões celulares) (SILVA et al., 2014). Além disso, dados obtidos por Ribeiro (2014) indicam que *CaSERK* não possui correlação com a taxa regenerativa de embriões somáticos e é expresso também em diferentes fases de desenvolvimento do embrião, sugerindo que o gene *SERK* desempenha um amplo papel na embriogênese, não sendo restrito à fase de indução embriogênica.

Estudos com outros genes relacionados à embriogênese em café são necessários a fim de identificar mecanismos moleculares envolvidos nas fases iniciais do desenvolvimento embriogênico. Os genes pertencentes à família LAV do domínio B3 também estão sendo estudados nos processos de embriogênese

(LE et al., 2010; LEDWON; GAJ, 2011; SANTOS-MENDOZA et al., 2008; STONE et al., 2001; TSUCHIYA et al., 2004; UMEHARA; IKEDA; KAMADA, 2007).

Swaminathan, Peterson e Jack (2008), compilaram, em uma revisão bibliográfica, informações sobre a superfamília B3. Esta superfamília no genoma de *Arabidopsis* contém 118 genes e é composta pelas famílias LAV, RAV, ARF e REM. A família LAV exerce papel fundamental na embriogênese e já foi bem caracterizada em *Arabidopsis* e arroz, sendo constituída por duas subfamílias: LEC2/ABI3 e VAL (SANTOS-MENDOZA et al., 2008). A subfamília LEC2/ABI3 é composta pelos genes AFL (*ABI3*, *FUS3* e *LEC2*) e a subfamília VAL pelos genes *VAL1*, *VAL2* e *VAL3*.

### 2.5.1 Genes AFL

Os genes *ABI3* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*), *FUS3* (*FUSCA3*) e *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON2*) são comumente denominados genes AFL (SUZUKI; McCARTY 2008). *LEC2* é determinante para o desenvolvimento de embriões somáticos (LEDWON; GAJ, 2009; STONE et al., 2001) e sua mutação diminui a capacidade embriogênica de explantes cultivados *in vitro* (GAJ et al., 2005) demonstrando que o fator de transcrição *LEC2* está envolvido na indução da resposta embriogênica em tecidos somáticos.

Recentemente, Zhang et al. (2014) observaram alta expressão do ortólogo de *LEC2* em tecido embriogênico de *Theobroma cacao*, identificando *TcLEC2* como biomarcador para a melhoria do sistema de propagação via embriogênese somática bem como para seleção de variedades elite de cacau.

Semelhante a *LEC2*, o gene *FUS3* parece estar envolvido na regulação da embriogênese somática. Possui atividade específica em culturas embriogênicas de *Arabidopsis* (LEDWON; GAJ, 2011) e seus mutantes são

incapazes de induzir a formação de embriões somáticos de forma eficiente (GAJ et al., 2005).

O trabalho realizado com *Medicago truncatula* demonstrou que os genes *MtFUSCA3* e *MtABI3* são ativados nos períodos iniciais da indução da embriogênese somática. Níveis de expressão 1500 e 120 vezes maior do *MtABI3* e *MtFUSCA3*, respectivamente, foram verificados para a linhagem embriogênica comparada ao controle, enquanto que a linhagem com baixo potencial embriogênico apresentou níveis de expressão basal (BARRETO, 2013).

A expressão diferencial do gene *ABI3* também foi verificada em culturas embriogênicas de *Arabidopsis* (IKEDA-IWAI; SATOH; KAMADA, 2002; IKEDA-IWAI et al., 2003) e cenoura (KIKUCHI et al., 2006; SHIOTA et al., 1998). A expressão do gene *CABI3* em células embriogênicas de cenoura está relacionada com a frequência de formação de embriões (KIKUCHI et al., 2006), reforçando a idéia de que os genes AFL estão envolvidos na indução da embriogênese somática e são promissores quanto à identificação do alto potencial embriogênico em culturas vegetais.

### 2.5.2 Genes VAL

Os genes *VAL1* (*VIVÍPAROS ABI3-LIKE1*), *VAL2* (*VIVÍPAROS ABI3-LIKE2*), e *VAL3* (*VIVÍPAROS ABI3-LIKE3*), também são chamados de *HSI2* (*HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SUGAR-INDUCIBLE GENE2*), *HSL1* (*HSI2-LIKE1*) e *HSL2* (*HSI2-LIKE2*), respectivamente (TSUKAGOSHI et al., 2005; TSUKAGOSHI; MORIKAMI; NAKAMURA, 2007; SUZUKI; WANG; McCARTY, 2007). As proteínas codificadas por *VAL1* e *VAL2* além de pertencerem à superfamília B3 apresentam também o domínio CW do tipo *zinc-finger*. Devido a essas características estruturais implica-se que as proteínas

VAL possuam funções relacionadas à remodelação da cromatina e de ligação ao DNA (SUZUKI; WANG; McCARTY, 2007).

Diferentemente dos genes AFL, há apenas relatos bibliográficos do papel dos genes VAL durante o desenvolvimento vegetativo (SHARMA et al., 2013; TSUKAGOSHI et al., 2005). Os genes VAL em *Arabidopsis* são intimamente relacionados com os fatores de transcrição *ABI3*, *FUS3* e *LEC2* (SUZUKI; WANG; McCARTY, 2007). A análise da expressão ectópica dos genes AFL em mutantes duplos *VAL1/VAL2* sugere que a repressão das vias AFL seja necessária durante a germinação para que o crescimento de plântulas ocorra normalmente em conjunto com a atuação de outros fatores de transcrição repressores (JIA; McCARTY; SUZUKI, 2013).

A expressão dos genes VAL é regulada pela percepção de sinalização de açúcares (SHARMA et al., 2013; TSUKAGOSHI et al., 2005; TSUKAGOSHI; MORIKAMI; NAKAMURA, 2007) que atuam como fonte de energia e/ou como sinalizadores para a formação do embrião e o papel dessas moléculas é considerado importantíssimo para as fases iniciais do processo embriogênico (BAUD et al., 2002; LOU et al., 1996; VERMA; DOUGALL, 1977) No entanto, a caracterização funcional dos genes VAL durante a embriogênese somática permanece inexplorada. Sugere-se que a expressão de tais genes seja diferencial durante o processo de indução de embriões somáticos em café.

## **2.6 Projeto Brasileiro do Genoma Café**

A identificação e caracterização de genes de interesse no genoma do café são facilitadas pela base de dados *online* <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe> de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) do cafeeiro. A base de dados é resultado do armazenamento de informações gerado pelo Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC). O Projeto, formulado em 2002, é uma iniciativa do Consórcio

Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP & D-Café) que reúne quarenta universidades públicas e institutos de pesquisa, e foi projetado para desenvolver e implantar ferramentas úteis para a descoberta de genes e análise genética funcional no café e espécies afins (VIEIRA et al., 2006).

A base de dados de ESTs do cafeeiro resultou na identificação de cerca de 33.000 unigenes distintos. Para isso, foram sequenciados clones de 37 bibliotecas de cDNA de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. Cada biblioteca representa estádios específicos do desenvolvimento de células e de tecidos do cafeeiro submetidos ou não a tratamentos de estresse (Tabela 1) (VIEIRA et al., 2006).

Tabela 1. Descrição das bibliotecas de ESTs de café do Projeto Brasileiro do Genoma Café.

Library code	Tissue/Developmental stage	Number of valid reads
AR1, LP1	Plantlets and leaves treated with araquidonic acid	5664
BP1	Suspension cells treated with acibenzolar-S-methyl	12379
CB1	Suspension cells treated with acibenzolar-S-methyl and brassinoesteroids	10311
CL2	Hypocotyls treated with acibenzolar-S-methyl	11615
CS1	Suspension cells treated with NaCl	10803
EA1,IA1,IA2	Embryogenic calli	9191
EB1	Zygotic embryo (immature fruits)	192
EC1	Embryogenic calli from <i>Coffea canephora</i>	8050
EM1,SI3	Germinating seeds (whole seeds and zygotic embryos)	9201
FB1,FB2,FB4	Flower buds in different developmental stages	23036
FR1,FR2	Flower buds + pinhead fruits + fruits at different stages	14779
FR4	Fruits ( <i>Coffea racemosa</i> )	7967
FV2	Fruits, stages 1,2 and 3 ( <i>Coffea racemosa</i> )	7195
CA1,IC1,PC1	Non embryogenic calli with and without 2,4 D	12135
LV4,LV5	Young leaves from orthotropic branch	15067
LV8,LV9	Mature leaves from plagiotropic branches	11864
NS1	Roots infected with nematodes	569
PA1	Primary embryogenic calli	2483
RM1	Leaves infected with leaf miner and coffee leaf rust	5567
RT3	Roots	560
RT5	Roots with acibenzolar-S-methyl	2311
RT8	Suspension cells with stressed with aluminum	9119

RX1	Stems infected with <i>Xylella spp.</i>	9563
SH1	Leaves from water deficit stresses plants ( <i>Coffea canephora</i> )	7368
SH2	Water deficit stresses field plants (pool of tissues)	6824
SS1	Well-watered field plants (pool of tissues)	960

Fonte: VIEIRA et al., 2006.

Sendo assim, a base de dados do PBGC fornece um recurso muito valioso para encontrar genes relacionados com processos e tecidos específicos do estudo em questão, possibilitando que a identificação e implantação de genes marcadores ocorram de forma dinâmica e rápida.

### 2.7 RT-qPCR e genes referência

As análises de níveis de expressão gênica é amplamente realizada através da amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR), este método destaca-se por sua rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade, alto rendimento e precisão na quantificação de transcritos (BUSTIN et al., 2005; LOGAN; EDWARDS; SAUNDERS, 2009). Essa ferramenta tem permitido a análise de grande número de genes envolvidos em diversos processos biológicos (DONSON et al., 2002). No entanto, a obtenção de resultados confiáveis na quantificação por RT-qPCR depende de muitos fatores tais como a integridade e quantidade do RNA, qualidade do cDNA, número de repetições, eficiência da amplificação e escolha adequada dos genes de referência que serão utilizados como controles interno para normalizar e acompanhar a variação de expressão entre as amostras (PFAFFL et al., 2004; SANTIS; SMITH-KEUNE; JERRY, 2011; VANDESOMPELE et al., 2002).

A utilização de um ou mais genes de referência permite controlar parâmetros experimentais e avaliar a estabilidade de expressão dos genes alvo sob condições adversas (GUTIERREZ et al., 2008; VANDESOMPELE;

KUBISTA; PFAFFL, 2009). Um gene de referência adequado para a realização de análise RT-qPCR deve ter expressão estável em diferentes tipos de células e condições experimentais; não deve estar associado a pseudogenes, para evitar a amplificação de genes não funcionais e exibir moderados níveis de expressão (HONGJIAN et al., 2010; LLAND; HERTZBERG; MARLTON, 2006; LING et al., 2014).

Geralmente, os genes codificadores de proteínas responsáveis pelo metabolismo básico e manutenção estrutural da célula são os mais utilizados para análise de expressão gênica. Em plantas, os genes de referência mais usuais são actinas (*ACT*), tubulinas (*TUB*), fatores de alongamento (*EF*), ubiquitinas (*UBQ*) e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) (KUMAR et al., 2011). Genes com essas funções celulares básicas não deveriam variar sua expressão nas diferentes células de um organismo e sob diferentes condições experimentais (VANDESOMPELE et al., 2002).

Diversos estudos estão sendo realizados para escolher o gene mais adequado para tecidos e condições experimentais específicas e verificaram que a estabilidade desses genes pode variar consideravelmente (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009; CARVALHO et al., 2013; CHAO et al., 2012; IMAI et al., 2014; LIN et al., 2013). Assim, encontrar genes de referência adequados é um passo inicial essencial no desenvolvimento de métodos de RT-qPCR (DOCIMO et al., 2013).

Alguns modelos matemáticos foram desenvolvidos para calcular a estabilidade de expressão de candidatos a genes de referência e inferir o mais adequado para normalização de RT-qPCR. Os algoritmos *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004), *Bestkeeper* (PFAFFL et al., 2004) e *Delta-Ct* (SILVER et al., 2006) têm sido utilizados para esse fim. Estes quatro algoritmos foram integrados na ferramenta *RefFinder*

(<http://www.leonxie.com/referencegene.php>) a qual compara e classifica os candidatos a genes de referência testados, baseado nos *rankings* obtidos de cada um dos programas, atribui-se um peso adequado a um gene individual e calcula a média geométrica dos seus pesos para o *ranking* geral final (ZHANG, 2014).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. A. de.; OLIVEIRA, R. P. de.; DANTAS, J. L. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 51-54, jan/mar. 2001.
- 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, v.1, p. 82-123, 1983.
- ANANDAN, R. et al. *In vitro* somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 136, p. 43-49, mar. 2012.
- ANDERSEN C.L.; JENSEN J.L.; ORNTOFT T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245–5250, aug. 2004.
- ASCENCIO-CABRAL, A. et al. Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, p. 155-160, sept. 2008.
- BARBOSA, N. M. L. et al. Indução de alterações morfológicas e anatômicas em folhas de abacaxizeiro “pérola” pelo ácido 2-(3-clorofenoxi) propiônico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 386-389, 2003.
- BARRETO, H. G. **Identificação e análise transcricional de componentes genéticos envolvidos com embriogênese somática em *Medicago truncatula***. 2013. 88 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, London, v. 10, n. 1, jan. 2009.

BAUD, S. et al. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 151-160, feb. 2002.

BRASILEIRO, S. Balanço semanal – 09 a 13/06/2014. **Conselho Nacional do Café**. Online. Disponível em: <<http://www.cncafe.com.br/site/capa.asp?id=17722>>. Acesso em: 12 jul. 2014.

BUSTIN, S.A. et al. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, London, v. 34, p. 597–601, jun. 2005.

CARVALHO, K. et al. Nitrogen Starvation, Salt and Heat Stress in Coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and Validation of New Genes for qPCR Normalization. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 53, p. 315–325, mar. 2013.

CHAO, W.S. et al. Selection and Validation of Endogenous Reference Genes for qRT-PCR Analysis in *Leafy Spurge* (*Euphorbia esula*). **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 8, aug. 2012.

CHEN, L. et al. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta**, Berlin, v. 234, p. 377–390, apr. 2011.

CHENG, D. et al. Validation of Reference Genes in *Solenopsis invicta* in Different Developmental Stages, Castes and Tissues. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 2, feb. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB.  
Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Primeiro Levantamento, Brasília,  
2015.

DAVIS, A. et al. An annotated checklist of the genus *Coffea* L. (Rubiaceae).  
**Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 152, p. 465-512, dec.  
2006.

DOCIMO T. et al. Selection and validation of reference genes for quantitative  
gene expression studies in *Erythroxylum coca* [v1; ref status: indexed,  
<http://f1000r.es/y1>]. **F1000Research**, 2:37, fev. 2013.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus  
somatic embryogenesis. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 1493-  
1509, aug. 1997.

DONSON, J. et al. Comprehensive gene expression analysis by transcript  
profiling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, p. 75-95, jan. 2002.

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic  
embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**,  
Wallingford, v. 49, n. 6, p. 631–642, ago. 2013.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects  
of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype  
of variants. **Tree Physiology**, Victoria, v. 23, n. 6, p. 419-426, mar. 2003.

FARZANA, A. R. F. et al. Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.  
cv. Rathna). **Jornal National Scienc Foundation**, v. 36, n. 1, p. 41-50, 2008.

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.

GAJ, M. D. et al. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. **Planta**, Berlin, v. 222, p. 977–988, jul. 2005.

GARCIA, A.; RODRIGUES, A. N. A.; COSTA, J. N. M. Ocorrência das principais doenças causadas por fungos em cafeeiros de Rondônia, 34p. **Embrapa Circular Técnica**, p.51, 2000.

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

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

GRUSZCZYŃSKA, A.; RAKOCZY-TROJANOWSKA M. Expression analysis of somatic embryogenesis-related SERK, LEC1, VP1 and NiR ortologues in rye (*Secale cereale* L.). **Journal of Applied Genetics**., Poznań, v. 52, n. 1, p. 1-8, jan. 2011.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568, 1999.

GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, p. 609-618, apr. 2008.

HACCIUS, B. Questions of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v. 28, p. 74-81, 1978.

HECHT, V. et al. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Lancaster, v.127, p. 803-816, nov. 2001.

HONGJIAN, W. et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 399, n. 2, p. 257-261, apr. 2010.

IKEDA, Y. et al. The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 47, n. 11, p. 1443-1456, nov. 2006.

IKEDA-IWAI, M.; SATOH S.; KAMADA, H. Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of Arabidopsis somatic embryos. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p.1575-1580, mar. 2002.

IKEDA-IWAI, M. et al. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, p. 107-114, apr. 2003.

IMAI, T. et al. Evaluation of Reference Genes for Accurate Normalization of Gene Expression for Real Time- Quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* Using Different Tissue Samples and Seasonal Conditions. **Plos One**, San Francisco, v.9, n. 1, 2014.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Comércio cafeeiro mundial (1963 – 2013): uma análise dos mercados, desafios e oportunidades para o setor. London, 2014.

JIA, H.; McCARTY, D.R.; SUZUKI, M. Distinct Roles of LAFL Network Genes in Promoting the Embryonic Seedling Fate in the Absence of VAL Repression. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 163, p. 1293-1305, nov. 2013.

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

KIKUCHI, A. et al. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. **Planta**, Berlin, v. 223, n. 4, p. 637-645, mar. 2006.

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

KUMAR, V. et al. Traditional and novel references towards systematic normalization of qRT-PCR data in plants. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.5, n.11, p.1455-1468, oct. 2011.

LEDWON, A.; GAJ M. D. LEAFY COTYLEDON2 gene expression and auxin treatment in relation to embryogenic capacity of *Arabidopsis* somatic cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 1677-1688, nov. 2009.

LEDWON, A.; GAJ E. M. D. LEAFY COTYLEDON1, FUSCA3 expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, v. 65, p.157-167, sept. 2011.

LIN, L. et al. Identification of appropriate reference genes for normalizing transcript expression by quantitative real-time PCR in *Litsea cubeba*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.288, p. 27-737, dec. 2013.

LING, H. et al. Comprehensive Selection of Reference Genes for Gene Expression Normalization in Sugarcane by Real Time Quantitative RT-PCR. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 5, may. 2014.

LLAND, H.; HERTZBERG, M.; MARLTON, P. Myeloid leukemia Methods and Protocols. **Humana**, 2006.

LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N.A. Real-time PCR: current technology and applications. **Caister Academic Press**, 2009.

LOU, H. et al. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, p. 497-502, 1996.

MA, J. et al. Cloning and Molecular Characterization of a SERK Gene Transcriptionally Induced During Somatic Embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 30, p. 195–203, feb. 2012.

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

MALABADI, R. B. et al. Induction of somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya*). **Research in Biotechnology**, Vellore, v. 2, p. 40-55, 2011.

MATOS, A. T. Tratamento e Destinação Final dos Resíduos Gerados no Beneficiamento do Fruto do Cafeeiro: In: ZAMBOLIN, L., **Produção Integrada de Café**. Viçosa: UFV: DFP. 2003. 710 p. 648 - 695.

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

MAZAREI, M. et al. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cell suspension cultures: Establishment, characterization, and application. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, Shannon, v. 181, n. 6, p. 712–5, dec. 2011.

MISHRA, M. K.; SLATER A. Recent Advances in the Genetic Transformation of Coffee. **Biotechnology Research International**, v. 2012, 17p., jun. 2012.

MORAIS, T. P.; MELO, B. Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p. 753-760, may. 2011.

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.

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

NORIEGA, C.; SÖNDAHL, M. R. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 15, 1993. Montpellier. **Annales...** Paris: ASIC, p.73-81, 1993.

PÁDUA, M. P. et al. Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 4, p. 660-665, apr. 2014.

PFAFFL, M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, p. 509-515, mar. 2004.

PINTO, D.L.P. et al. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Boston, v. 107, p. 521-530, dec. 2011.

QUIROZ-FIGUEROA, F. et al. Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 159, n. 11, p. 1267-1270, 2002.

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

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

RIBEIRO, L. O. **Caracterização de suspensões celulares e obtenção de sementes sintéticas de *Coffea arabica* cv. Catiguá**. 2014. 87 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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, nov. 2009.

RODRIGUES, T. B. et al. Validation of Reference Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **Plos One**, San Francisco, v.9, n 11, oct. 2014.

RODRÍGUEZ, M.; CEVALLOS, A. M.; MONTES, S. Proteínas extracelulares marcadoras del potencial embriogénico en suspensiones celulares de *Coffea* spp. **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 21, n. 2, p. 11-15, abr/jun. 2000.

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

SANTIS, C.D.; SMITH-KEUNE, C.; JERRY, D.R. Normalizing RT-qPCR data: are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish *Lates calcarifer*. **Marine Biotechnology**, New York, v. 13, p.170-180, apr. 2011.

SANTOS-MENDOZA, M. et al. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 54, p. 608-620, may. 2008.

SCHELLENBAUM, P. et al. Characterization of VvSERK1, VvSERK2, VvSERK3 and VvL1L genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 12, p. 1799–1809, dec. 2008.

SCHMIDT, E. D. L. et al. Leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v.124, p. 2049-2062, may. 1997.

SHARMA, N. et al. High-level expression of sugar inducible gene2 (HSI2) is a negative regulator of drought stress tolerance in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, p. 170, oct. 2013.

SHARP, W. R. et al. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v. 2, p. 268-310, 1980.

SHIOTA, H. et al. C-ABI3, the carrot homologue of the Arabidopsis ABI3, is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryo-specific ABA-inducible genes. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 39, p. 1184-1193, nov. 1998.

SILVA, A. T. et al. Characterization of a putative serk-like ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 32, p. 176-184, feb. 2014.

SILVER N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v.7, n. 33, oct. 2006.

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, p. 395-408, 1977.

SÖNDAHL, M. R., SÖNDAHL, C. N., GONÇALVES, W. Custo comparativo de diferentes técnicas de clonagem. In: Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeteira 3, Londrina, PR, Brasil. **Anais...**, p. 59-65, 1999.

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

STONE S.L. et al. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, Washington, v. 98, p. 11806-11811, set. 2001.

SUN, D-Q. et al. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 104, n. 1, p. 23-29, jan. 2011.

SUZUKI M.; WANG H. H.; McCARTY D. R. Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. **Plant Physiology**, Lancaster, v.143, p. 902-911, feb. 2007.

SUZUKI M.; MCCARTY D. R. Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 11, p. 548-553, oct. 2008.

SWAMINATHAN K.; PETERSON K.; JACK T. The plant B3 superfamily. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 13, p. 647-655, dec. 2008.

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

TSUCHIYA Y, et al. The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in Arabidopsis. **Plant Journal**, New York, v. 37, p. 73–81, 2004.

TSUKAGOSHI, H. et al. Analysis of a sugar response mutant of arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. **Plant Physiology**, Lancaster, v.138, p.675–685, jun. 2005.

TSUKAGOSHI, H.; MORIKAMI A.; NAKAMURA K. Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in arabidopsis seedlings. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, Washington, v. 104, p. 2543–2547, feb. 2007.

UMEHARA M., IKEDA M., KAMADA, H. Endogenous factors that regulate plant embryogenesis: recente advances. **Japanese Journal of Plant Science**, 1(1), p. 1-6, feb. 2007.

VAN BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Berlin, v.44, p.4-17, 1996.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, 3: RESEARCH0034, jun. 2002.

VANDESOMPELE, J.; KUBISTA, M.; PFAFFL, M. W. Reference gene validation software for improved normalization. Real-time PCR: **Current Technology and Applications**, p. 47-64, 2009.

VERDEIL, J. L. et al. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n.6, p. 245-252, jun. 2007.

VERMA, D.C.; DOUGALL, D. K. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, p. 81-85, jan. 1977.

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

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, n. 4, p.443-462, 1986.

WINKELMANN, T. et al. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos and endosperm tissue of *cyclamen persicum* - ISHS Acta Horticulturae 714: **XXII International Eucarpia Symposium**, Section Ornamentals, Breeding for Beauty, 2006.

YEUNG, E.C. Structural and development patterns in somatic embryogenesis. In: **In vitro embryogenesis in plants**. Thorpe, T.A. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p.205-248, 1995.

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

ZENG, S. et al. Identification and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization and Its Applications in *Lycium*. **Plos One**, San Francisco, v.9, n.5, may. 2014.

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

ZHANG, B. Evaluating Reference Genes Expression>> RefFinder. Copyright @ 2013 - 2014 Dr.Zhang's Lab. Em: < <http://www.leonxie.com/referencegene.php> >. Acesso em: 01 fevereiro 2015.

ZHANG, Y. et al. The *Theobroma cacao* B3 domain transcription factor TcLEC2 plays a dual role in control of embryo development and maturation. **BMC Plant Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 106, jan. 2014.

**SEGUNDA PARTE**

Artigos

**ARTIGO 1** Seleção de genes de referência para análises de RT-qPCR em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento relacionados à embriogênese somática de *Coffea arabica* L.

**SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISES DE RT-qPCR EM DIFERENTES TECIDOS E FASES DE DESENVOLVIMENTO RELACIONADOS À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Coffea arabica* L.**

**RESUMO**

A embriogênese somática é uma técnica com alto potencial de aplicação na cultura cafeeira, pois permite micropropagação em larga escala e regeneração de plantas geneticamente modificadas. Focando nestas abordagens, clonagem e transgenia, muitos estudos têm sido realizados através de análises em RT-qPCR, a fim de elucidar os processos que controlam a embriogênese somática *in vitro*. Para se obter resultados confiáveis e precisos da expressão de genes alvo através da técnica de RT-qPCR é necessária a normalização dos dados pela comparação com genes de referência que apresentem níveis de expressão uniformes nas condições avaliadas. Neste trabalho foi analisada a estabilidade de expressão de doze candidatos a genes de referência (*24S*, *ACT*, *GAPDH*, *CYCL*, *EF1a*, *TUB*, *PP47*, *PP2A*, *RPL39*, *APRT*, *UBQ*, *14-3-3*) em um conjunto de 54 amostras biológicas relacionadas à embriogênese somática, incluindo diferentes tecidos e fases de desenvolvimento de *Coffea arabica* L.. As análises foram realizadas através da ferramenta *RefFinder* que compila os algoritmos estatísticos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct*. Os resultados mostraram que os genes de referência *24S* e *PP2A* apresentam expressão mais estável entre os diferentes tecidos e fases de desenvolvimento enquanto o *GAPDH* se comportou como o gene menos estável. As análises isoladas dos diferentes tecidos e fases de desenvolvimento indicaram genes distintos para o nível de expressão de maior estabilidade. A expressão mais estável em calo não embriogênico, calo embriogênico e suspensão celular em diferentes tempos de cultivo correspondeu aos genes *UBQ*, *ACT* e *APRT*, respectivamente. O gene *RPL39* apresentou maior

estabilidade na análise em conjunto de calos não embriogênicos e embriogênicos. Enquanto em plântula e embrião em diferentes estádios de desenvolvimento, o gene *PP2A* apresentou maior estabilidade de expressão. Este é o primeiro estudo a fornecer informações sobre a estabilidade de candidatos a genes de referência para normalizar dados de RT-qPCR em amostras relacionadas à embriogênese somática em *Coffea* sp.

## INTRODUÇÃO

O café é uma das principais *commodities* comercializadas no mundo e dentre as espécies de café existentes, *Coffea arabica* L. corresponde a mais de 60% da produção e comercialização mundial (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ - OIC, 2014). A fim de atingir mercados que melhor remuneram o produtor e diminuir as perdas de produção, os programas de melhoramento genético do cafeeiro visam à obtenção de genótipos capazes de produzir grãos de alta qualidade e plantas resistentes às pragas e doenças. A liberação de variedades com características agronômicas superiores são aceleradas com técnicas biotecnológicas associadas ao melhoramento convencional (GATICA-ARIAS; ARRIETA-ESPINOZA; ESQUIVEL, 2008). A embriogênese somática é uma técnica com grande potencial pois abre perspectivas para propagação clonal massal de genótipos de elite e conservação de germoplasma, além de ser um eficiente sistema de regeneração no processo de transformação genética (PATHI; TULA; TUTEJA, 2013; RIBAS et al, 2011; WINKELMANN, 2010). Muitos estudos foram realizados através de análises em RT-qPCR, a fim de identificar os mecanismos que controlam a embriogênese somática *in vitro* (GRUSZCZYNSKA; RAKOCZY-TROJANOWSKA, 2011; MA et al., 2012; SILVA et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) é um método amplamente utilizado em análises de expressão gênica,

devido a sua rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade, alto rendimento e precisão na quantificação dos níveis de transcrição gênica (BUSTIN et al., 2005; LOGAN; EDWARDS; SAUNDERS, 2009). No entanto, a obtenção de resultados confiáveis depende de fatores como a integridade do RNA, qualidade do cDNA, número de repetições, eficiência da amplificação e escolha adequada dos genes de referência que serão utilizados como controle interno para normalizar e acompanhar a variação de expressão entre as amostras (PFALL et al., 2004; SANTIS; SMITH-KEUNE; JERRY, 2011; VANDESOMPELE et al., 2002). Um gene de referência adequado para a realização de análise de RT-qPCR deve possuir expressão estável em diferentes tipos de células e condições experimentais; não deve estar associado a pseudogenes e exibir moderados níveis de expressão (HONGJIAN et al., 2010; LING et al., 2014; LLAND; HERTZBERG; MARLTON, 2006).

Genes de referência como actina, tubulina, fatores de alongamento, ubiquitina e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase são os mais empregados para análise de expressão gênica em plantas (KUMAR et al., 2011). Porém, estudos relatam que não existe um gene de referência universal para ser usado em todos os experimentos e/ou em todos os tecidos vegetais (CHEN et al., 2011; CHENG et al., 2013; GUTIERREZ et al., 2008a; IMAI et al., 2014; LIN et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; ZENG et al., 2014). É importante a avaliação da estabilidade dos genes normalizadores anteriormente à sua utilização como controles internos na montagem experimental e condições empregadas (VANDESOMPELE; KUBISTA; PFAFFL, 2009), pois o uso de genes de referência inadequados pode afetar a precisão da análise de expressão gênica e a confiabilidade dos resultados gerados (CARVALHO et al., 2013a; FAN et al., 2013; KONG et al., 2014; NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006). Sendo assim, a seleção de genes de referência adequados é um passo inicial essencial para o uso da RT-qPCR (DOCIMO et al., 2013).

Atualmente, os principais modelos matemáticos desenvolvidos para calcular a estabilidade de expressão de candidatos a genes de referência e inferir o mais adequado sobre a normalização de RT-qPCR são *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004), *Bestkeeper* (PFAFFL et al., 2004) e *Delta-Ct* (SILVER et al., 2006). Estes quatro algoritmos foram integrados na ferramenta *RefFinder* a qual foi desenvolvida para avaliação e triagem de genes de referência de extensos conjuntos de dados experimentais (ZHANG, 2014).

Apesar de já terem sido descritos genes de referência em café (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009; CARVALHO et al., 2013a; CRUZ et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2013), até o momento, genes normalizadores ainda não foram avaliados em amostras relacionadas à embriogênese somática. No presente estudo, doze genes (*24S*, *ACT*, *GAPDH*, *CYCL*, *EF1a*, *TUB*, *PP47*, *PP2A*, *RPL39*, *APRT*, *UBQ* e *14-3-3*) foram selecionados como candidatos a genes de referência e avaliados em 54 amostras com o objetivo de determinar os genes de referência que devem ser utilizados em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento relacionados à embriogênese somática, fornecendo resultados que suportem futuros trabalhos de expressão gênica em *Coffea arabica* L.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Embriogênese somática**

Calos embriogênicos e não embriogênicos foram obtidos segundo o protocolo de Teixeira et al. (2004) a partir de plantas matrizes da cv. Catuaí Amarelo IAC 62 cultivadas em casa de vegetação. As suspensões celulares foram obtidas cultivando calos embriogênicos em frascos de Erlenmeyer com meio líquido de multiplicação T3 (VAN BOXTEL; BERTHOULY, 1996) com densidade inicial de biomassa de 10 g L<sup>-1</sup> de meio (ZAMARRIPA, 1991) com

renovação total do meio a cada 15 dias de cultivo. Os frascos foram mantidos em ausência de luz em agitadores orbitais a 100 rpm a 25°C. Os embriões foram regenerados a partir das suspensões celulares cultivadas com densidade inicial de biomassa de 1 g L<sup>-1</sup> de meio RR (CARVALHO et al., 2013b). A maturação e germinação dos embriões somáticos foram realizadas seguindo procedimento descrito por Teixeira et al. (2004).

### **Amostragem**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e cada amostragem foi composta por três repetições biológicas. Os tecidos avaliados foram: calo não embriogênico, calo embriogênico, suspensão celular em diferentes tempos de cultivo, embrião somático em diferentes estádios e plântula. Em relação aos calos não embriogênicos e embriogênicos cada repetição foi constituída por um conjunto de dez calos obtidos de explantes foliares distintos. Cada repetição biológica de embrião globular foi composta por 275 unidades enquanto que para os embriões em estágio cordiforme/torpedo e cotiledonar, e plântulas cada repetição foi constituída por 25 unidades. Para as suspensões celulares, cada repetição foi constituída por 200 mg de aglomerados celulares, sendo seis tempos de cultivo (60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias) e duas linhagens de suspensões celulares. As amostras foram armazenadas a - 80 °C até o momento da extração de RNA.

### **Extração de RNA total e Síntese de cDNA**

A extração de RNA a partir de calo embriogênico, suspensão celular e de embrião globular foi realizada utilizando o *Kit NucleoSpin®* (Macherey Nagel), e a extração de calo não embriogênico, embrião cordiforme/torpedo, embrião cotiledonar e plântula utilizando *Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen). Todas as amostras foram tratadas com o *Kit Turbo DNA-free*

(Ambion) para a remoção total de DNA genômico. A quantidade e pureza do RNA foram mensuradas em *Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000*, enquanto que sua qualidade e integridade foram verificadas pelo *Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)*, assegurando valores de RIN igual e/ou superior a 7,0. O *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* foi utilizado para a síntese de cDNA a partir de 1000 ng de RNA conforme recomendação do fabricante.

### **Seleção dos Genes de Referência e Desenho de *Primers***

Foram selecionados doze genes, citados na literatura em trabalhos com café e/ou outras espécies, utilizados como controles interno nas análises de RT-qPCR. Os genes selecionados foram: proteína ribossomal 24S (*24S*), actina (*ACT*); gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GADPH*), ciclofilina (*CYCL*), fator de alongamento-1 $\alpha$  (*EF1a*),  $\beta$ -tubulina (*TUB*), proteína fosfatase 2A (*PP2A*), subunidade média do complexo adaptador de clatrina (*AP47*), proteína ribossomal L39 (*RPL39*), adenina fosforribosiltransferase (*APRT*), ubiquitina (*UBQ*) e proteína 14-3-3 (*14-3-3*).

As sequências ortólogas aos candidatos a genes de referência foram identificadas tendo-se como fonte de dados o banco de *ESTs* gerado pelo projeto Genoma Brasileiro Café (CAFEST; VIEIRA et al., 2006). A busca foi realizada por meio da ferramenta *BLAST (Basic Local Alignment Search)*, utilizando-se as sequências dos genes em estudo disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir das sequências obtidas do estudo *in silico*, *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer Express* versão 3.0 (*Applied Biosystems*). A especificidade de cada par de *primers* foi verificada através da curva de dissociação (*Melting curve*). A eficiência de amplificação da PCR (E) e o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) foram determinados para validação dos *primers* através do método da curva padrão, utilizando um conjunto de todas

as amostras de cDNA em uma diluição serial de cinco vezes. As informações sobre os genes selecionados e pares de *primers* estão listados na Tabela 1.

### **RT-qPCR**

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *Rotor Gene-Q* (*Qiagen*) em um volume total de 15  $\mu$ L contendo 1  $\mu$ L de cDNA diluição 1:25, 1X *Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit* e concentrações otimizadas para cada par de *primers* (Tabela 1). As amplificações ocorreram durante 5 minutos a 95°C, 5 segundos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 10 segundos a 60°C. As curvas de dissociação foram registradas após 40 ciclos para confirmar a especificidade dos *primers* por aquecimento de 60°C para 95°C. Cada reação foi realizada com triplicata técnica e biológica.

### **Análise da Estabilidade de Expressão dos Candidatos a Genes de Referência**

Os níveis de expressão dos candidatos a genes de referência foram determinados pelos valores C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação). Todas as amostras foram analisadas com um valor de limiar de fluorescência igual a 0,2 utilizando o programa *Rotor Gene-Q Series* (*Qiagen*). Os diagramas de caixa foram plotados através do programa *SigmaPlot* versão 12.0 para ilustrar os níveis e variações de expressão dos genes testados. A ferramenta *RefFinder* ([www.leonxie.com/referencegene.php](http://www.leonxie.com/referencegene.php)) foi utilizada para avaliar a estabilidade dos genes avaliados a partir de seis conjuntos amostrais: (1) *pool* das amostras biológicas; (2) suspensão celular em diferentes tempos de cultivo; (3) calo não embriogênico; (4) calo embriogênico; (5) calo não embriogênico e calo embriogênico; (6) embrião nos estádios globular, cordiforme/torpedo e cotiledonar; (7) plântula. Os dados de entrada utilizados foram os valores C<sub>q</sub>

corrigidos pela eficiência de cada par de *primers* através do programa *GenEx Enterprise* (<http://genex.gene-quantification.info/>).

## RESULTADOS

### Especificidade e Eficiência dos *Primers*

A especificidade das amplificações de PCR de cada um dos *primers* foi confirmada pela presença de um único pico na curva de dissociação (Figura Suplementar 1). A eficiência da PCR (E) e o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) foram calculados utilizando a inclinação da curva padrão estabelecida para cada par de *primers* (Figura Suplementar 1). Os valores de eficiência dos *primers* variaram de 80% a 100% e os coeficientes de regressão apresentaram valores igual/superior a 0,947 (Tabela 1), indicando que ao final de cada ciclo o transcrito molde foi duplicado com êxito.

### Perfis de Expressão dos Candidatos a Genes de Referência

A RT-qPCR foi realizada para determinar os perfis de expressão dos candidatos a genes de referência. As amostras para cada gene candidato foram executadas em dois rotores, incluindo amostra interensaio para assegurar a reprodutibilidade técnica da reação. Os níveis de expressão foram determinados pelo valor Cq que corresponde ao ponto que detecta o número de ciclos de amplificação necessários para alcançar o limiar de detecção da fase exponencial. Os níveis e variações de expressão dos genes testados foram analisados para o conjunto de amostras e para os diferentes tecidos e fases de desenvolvimento de forma isolada (Figura 1). Os doze potenciais genes de referência apresentaram expressão com amplo intervalo de valores Cq (17 a 28).

Entre todas as amostras, *UBQ* mostrou o nível mais baixo de expressão com o valor médio Cq equivalente a 25,3 ciclos. Em comparação, *Efla* apresentou o mais alto nível de expressão com um valor médio de 18,7 ciclos.

Entre os doze genes, seis dos candidatos a genes de referência apresentaram valores médios de Cq dentro da faixa de 18 a 22 ciclos. A menor e maior variação nas expressões entre todas as amostras testadas foram verificadas nos genes *APRT* e *GAPDH*, respectivamente.

Nas diferentes fases de desenvolvimento da suspensão celular, os níveis de expressão variaram de 17,8 a 26,5 ciclos. O gene mais expresso foi *Ef1a*, com valor médio Cq equivalente a 18,6 ciclos. *UBQ* foi o candidato a gene de referência menos expresso, com valor médio Cq entre 23,9 e 26,5 ciclos.

Os candidatos a genes de referência também apresentaram uma ampla variação na expressão em calo não embriogênico (17,3 a 25,4 ciclos). *GAPDH* apresentou valor médio Cq abaixo de 18 ciclos, enquanto *UBQ* foi o gene menos expresso, com valor médio Cq acima dos 25 ciclos.

Em calo embriogênico, as expressões médias dos genes analisados variaram de 17,7 a 24,6 ciclos. *EF1a* foi o gene que apresentou nível de expressão mais alto, com valores Cq de 17,7 a 18,8 ciclos. *PP2A* foi o menos expresso entre os candidatos, com valor médio Cq próximo aos 24 ciclos.

Na análise em conjunto de calo não embriogênico e calo embriogênico os genes candidatos apresentaram expressões variáveis (17,2 a 25,4 ciclos). O gene mais expresso foi *GAPDH*, com valor médio Cq igual a 18,1 ciclos. *UBQ* foi o candidato a gene de referência menos expresso, com valor médio Cq equivalente a 24,5 ciclos.

Os doze genes analisados nos diferentes estádios do embrião mostrou ampla expressão de 18,7 a 27,5 ciclos. *CYCL*, *EF1a* e *RPL39* apresentaram uma expressão média abaixo dos 20 ciclos. *24S*, *ACT*, *GAPDH*, *TUB*, *PP2A*, *AP47*, *APRT* e *14-3-3* obtiveram valor médio Cq abaixo de 24,3 ciclos e *UBQ* apresentou valores Cq no intervalo de 24 a 28 ciclos.

A análise da expressão dos genes candidatos em plântula obteve níveis variáveis de expressão, 19,1 a 25,4 ciclos. O gene mais expresso foi *CYCL*, com

valor médio Cq equivalente a 18,3 ciclos. *UBQ* foi o candidato a gene de referência menos expresso, com valor Cq entre 25,3 e 25,5 ciclos.

### **Estabilidade da Expressão dos Candidatos a Genes de Referência**

Foram utilizados quatro algoritmos distintos *geNorm*, *NormFinder*, *Bestkeeper* e *Delta-Ct* para inferir a estabilidade de expressão dos doze candidatos a genes de referência através da ferramenta *RefFinder* que, além de gerar as análises de cada algoritmo, realiza a comparação e classificação geral dos genes candidatos testados. *RefFinder* compara e classifica os candidatos a genes de referência testados baseado nos *rankings* obtidos de cada um dos programas, atribui um peso adequado a um gene individual e calcula a média geométrica dos seus pesos para o *ranking* geral final (ZHANG, 2014).

A estabilidade dos genes de referência pelo programa *geNorm* é calculada a partir de um valor (M), o qual é definido como a variação média de determinado gene em relação a todos os outros testados. Genes com os menores valores M tem a expressão mais estável (VANDESOMPELE et al., 2002), valores de M igual a 1,5 são geralmente considerados valores de corte (MAMO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2014; SPINSANTI et al., 2006). Já o programa *NormFinder* baseia-se na análise de variância e permite estimar o valor de variação intra e interamostra, bem como o cálculo de valores de estabilidade de expressão (SV) para os candidatos a genes de referência. Gene com menor SV é considerado o mais estável e apresenta a mínima variação combinando a expressão intra e interamostra (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004). O algoritmo *BestKeeper* avalia a estabilidade de expressão gênica para todos os genes individuais baseado em três variáveis: desvio padrão (DP), coeficiente de correlação ( $r$ ) e porcentagem de covariância (PC) (PFAFFL et al., 2004). O método *Delta-Ct* analisa o índice de variabilidade entre os valores Cq das

amostras testadas, o menor valor é considerado mais estável (SILVER et al., 2006).

Na análise da estabilidade de expressão dos genes candidatos a referência nos diferentes tecidos e fases de desenvolvimento relacionados à embriogênese somática (Tabela 2), os valores de M calculados pelo algoritmo *geNorm* apresentaram valores abaixo do valor de corte de estabilidade. Os genes mais estáveis foram *24S* e *RPL39* ( $M = 0,273$ ) e os menos estáveis *AP47* ( $M = 0,677$ ) e *GAPDH* ( $M = 0,706$ ). *NormFinder* identificou *PP2A* ( $SV = 0,290$ ) como o gene de referência mais estável e *GAPDH* ( $SV = 0,711$ ) com o menos estável. O algoritmo *BestKeeper* indicou *24S* e *APRT* como os genes candidatos mais estáveis ( $DP = 0,425$  e  $0,435$ ), *GAPDH* apresentou o valor DP máximo ( $0,677$ ), porém não excedeu o valor de corte. O método *Delta-Ct* determinou *PP2A* seguido de *24S* como os genes mais estáveis, com valores de estabilidade iguais a  $0,592$  e  $0,628$ , respectivamente. O gene *GAPDH* apresentou a menor estabilidade ( $0,850$ ), como verificado nas outras análises. O *ranking* final sugere que o gene de referência mais estável foi *24S* seguido por *PP2A*, enquanto o *GAPDH* apresentou-se como o gene menos estável, embora os valores de estabilidade não tenham excedido os valores de corte recomendados.

Para suspensão celular em diferentes tempos de cultivo, o algoritmo *geNorm* indicou os genes *24S* e *RPL39* como os mais estáveis com valores M igual a  $0,249$ . Já as análises realizadas pelo *NormFinder* e *Delta-Ct* identificaram o gene *APRT* como o mais estável, com valores de estabilidade de  $0,257$  e  $0,494$ , respectivamente. O algoritmo estatístico *BestKeeper* indicou os genes *EF1a* e *APRT* mais estáveis, com valores  $DP = 0,342$  e  $0,361$ . A média geométrica de classificação indicou *APRT* seguido de *EF1a* como os genes mais estáveis e *GAPDH* e *AP47* como os mais instáveis (Tabela 3).

Em relação aos dados obtidos apenas em calo não embriogênico (Tabela 4), o algoritmo *geNorm* mostrou que os genes mais estáveis foram *ACT* e *TUB*

com valores M igual a 0,042. Os genes *RPL39* e *UBQ* apresentaram maior estabilidade pela análise *NormFinder*, com valores  $SV = 0,029$  e  $0,032$ , respectivamente. Já os algoritmos *Delta-Ct* e *BestKeeper* identificaram a *UBQ* como o gene de referência mais estável com valores de estabilidade de  $0,098$  e  $0,013$ , respectivamente. O *ranking* geral combinando os valores de estabilidade de todos os algoritmos determinou *UBQ* e *ACT* os genes mais estáveis, embora todos os genes analisados apresentaram expressão relativamente estável.

O algoritmo *geNorm* mostrou para calos embriogênicos que *24S* e *UBQ* foram os genes mais estáveis com valores  $M = 0,094$ . *NormFinder* identificou *ACT* e *TUB* como os genes de referência mais estáveis com valores  $SV = 0,040$ . O algoritmo *BestKeeper* indicou *RPL39* e *24S* os genes com expressão mais estável com valores  $DP = 0,047$  e  $0,106$ , respectivamente. De acordo com o método *Delta-Ct*, *ACT* apresenta maior estabilidade de expressão ( $0,253$ ), assim como na análise realizada pelo *NormFinder*. O *ranking* geral determinou *ACT* seguido de *24S* como os genes mais estáveis e *GAPDH* e *EF1a* os mais variáveis (Tabela 5).

Para a análise em conjunto de calo não embriogênico e calo embriogênico (Tabela 6), o algoritmo *geNorm* indicou os genes *24S* e *RPL39* como os mais estáveis com valores M igual a  $0,106$ . *NormFinder* e *BestKeeper* também identificaram os genes *24S* e *RPL39* como os mais estáveis, com valores  $SV = 0,053$  e  $0,094$  e  $DP = 0,083$  e  $0,145$ , respectivamente. O algoritmo estatístico *Delta-Ct* indicou os genes *24S* e *RPL39* mais estáveis, com valores de estabilidade de  $0,488$  e  $0,489$ , respectivamente. A média geométrica de classificação indicou *RPL39* seguido de *24S* como os genes mais estáveis e *GAPDH* e *UBQ* como os mais instáveis.

Os resultados obtidos para estabilidade de expressão dos candidatos a genes de referência em embrião nos estádios globular, cordiforme/torpedo e cotiledonar estão listados na Tabela 7. *GeNorm* inferiu que os genes *PP2A* /

*RPL39* são os mais estáveis com valores M igual a 0,200. Os algoritmos *NormFinder* e *Delta-Ct* também determinaram *PP2A* como o gene menos variável com valores de estabilidade equivalente a 0,074 e 0,470. Em contrapartida, *BestKeeper* indicou *APRT* e *14-3-3* como o gene mais estável com DP = 0,421 e 0,427. A média geométrica dos quatro programas apresentou *PP2A* e *RPL39* como os genes com menores valores de estabilidade (1,627 e 2,213), sendo, portanto, os genes de referência mais adequados para as análises em embrião nos diferentes estádios.

Para plântula, *geNorm* indicou os gene *PP2A* e *AP47* como os genes de maior estabilidade com valores M = 0,024. *BestKeeper* também apresentou *PP2A* como o gene mais estável (DP = 0,014). Os algoritmos *NormFinder* e *Delta-Ct* determinaram *AP47* com valores de maior estabilidade de expressão (0,017 e 0,069, respectivamente). O *ranking* geral considerando os resultados obtidos pelos algoritmos utilizados inferiram que *PP2A* seguido de *AP47* são os genes com maior estabilidade, embora todos os genes candidatos apresentaram expressão relativamente estável (Tabela 8).

## DISCUSSÃO

A precisão da RT-qPCR é bastante influenciada pela utilização de genes de referência que permitem normalizar os dados e inferir a expressão dos genes alvo sob condições adversas (GUTIERREZ et al., 2008a). Supõe-se que os genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo e manutenção estrutural da célula sejam expressos de maneira uniforme independentemente das condições experimentais e tipo celular (VANDESOMPELE et al., 2002). Porém, estudos sugerem que não há genes de referência universal adequado para todas as variáveis (CHEN et al., 2011; CHENG et al., 2013; GUTIERREZ et al., 2008b; IMAI et al., 2014; LI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; ZENG et al., 2014), pois estes genes podem também participar de outras funções celulares, o

que implica a necessidade de uma validação sistemática de possíveis genes de referência.

Este é o primeiro relato sobre seleção de genes de referência em amostras relacionadas à embriogênese somática em *C. arabica* a partir das análises de estabilidade gênica realizadas pelo *RefFinder*. Atualmente, essa ferramenta é a mais promissora na seleção de genes adequados de referência, pois fornece o *ranking* final baseado nos resultados de quatro algoritmos distintos (*geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct*), gerando resultados mais consistentes e apropriados para análises de RT-qPCR.

Neste estudo, *GAPDH* apresentou-se como um dos genes mais expressos (menores valores Cq) e foi classificado na maioria das análises como um dos genes mais instáveis (9<sup>a</sup> à 12<sup>a</sup> posição nos *rankings*), com semelhança de resultados gerados entre os quatro algoritmos. Isto pode ser explicado pelo fato de que entre os critérios para a seleção de um gene de referência se enquadra a expressão gênica em nível moderado (LING et al., 2014). Além disso, evidências apontam que *GAPDH* cumpre papéis alternativos às funções metabólicas (ZAFFAGNINI et al., 2013) podendo, portanto, ter níveis de expressão variáveis. Resultado semelhante foi verificado em hipocótilos de café inoculados com o fungo *C. kahawae* (FIGUEIREDO et al., 2013). Em contrapartida, *GAPDH* apresentou expressão mais estável em outros tecidos/órgãos de *C. arabica* (raiz, caule, folha, flor e fruto) (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009) e em folhas e raízes submetidas a estresses abióticos (CARVALHO et al., 2013a). Dados de PCR em tempo real são frequentemente normalizados em plantas com genes de referência sem validação adequada utilizando referências que diferem das condições experimentais e tecidos testados (GUTIERREZ et al., 2008b). *ACT* e *GAPDH* foram anteriormente utilizados na literatura para normalização da expressão gênica em calos e suspensão celular de café (SILVA et al., 2014), entretanto, estes genes não

foram identificados como os genes de referência adequados no presente trabalho. Estudos verificaram que a utilização de genes de referência escolhidos arbitrariamente gera normalização inadequada e afeta os níveis de quantificação do gene alvo, podendo comprometer a precisão da técnica de RT-qPCR e dos resultados (CARVALHO et al., 2013a; FAN et al., 2013; KONG et al., 2014; NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006).

Os resultados obtidos identificaram *24S* e *PP2A* como os genes mais estáveis em todas as amostras testadas, porém as análises isoladas dos diferentes tecidos e fases de desenvolvimento indicaram genes distintos para o nível de expressão de maior estabilidade. Em calo não embriogênico, *UBQ* apresentou a expressão mais estável; enquanto em calo embriogênico e na suspensão celular em diferentes tempos de cultivo os genes *ACT* e *APRT*, respectivamente, foram os menos variáveis. Já o gene *PP2A* apresentou maior estabilidade de expressão em plântula e embrião nos diferentes estádios. É comum nos trabalhos que visam à identificação de genes de referência a falta de genes com níveis de expressão constantes em todos os tecidos (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009; CARVALHO et al., 2013a; CHAO et al., 2012; IMAI et al., 2014; LIN et al., 2013). A discrepância de expressão dos doze genes candidatos nas amostras testadas reforça a importância na escolha de um gene de referência adequado para normalização dos dados em tecidos e condições específicas.

## **CONCLUSÃO**

Os genes de referência *24S* e *PP2A* apresentaram perfis de expressão mais estáveis em todas as amostras testadas. Já a expressão mais estável em calo não embriogênico, calo embriogênico e suspensão celular em diferentes tempos de cultivo correspondeu aos genes *UBQ*, *ACT* e *APRT*, respectivamente. Em calos não embriogênicos e embriogênicos o gene *RPL39* apresentou expressão mais estável. Enquanto em plântula e embrião em diferentes estádios de

desenvolvimento, o gene *PP2A* apresentou maior estabilidade de expressão. As análises isoladas dos diferentes tecidos e fases de desenvolvimento identificaram genes distintos para a maior estabilidade gênica reforçando a importância na escolha de genes de referência adequados para normalização dos dados em tecidos e condições específicas, garantindo uma maior confiabilidade dos resultados gerados.

## REFERÊNCIAS

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v.64, p.5245–5250, 2004.

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

BUSTIN, S.A. et al. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 597–601, 2005.

CARVALHO, K. et al. Nitrogen Starvation, Salt and Heat Stress in Coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and Validation of New Genes for qPCR Normalization. **Molecular Biotechnology**, v. 53 p. 315–325, 2013a.

CARVALHO, C. H. S. et al. Custo de Produção de Mudas Clonais de Café Arábica Produzidas por Embriogênese Somática. **Embrapa Circular Técnica** 3, 2013b.

CHAO, W.S. et al. Selection and Validation of Endogenous Reference Genes for qRT-PCR Analysis in Leafy Spurge (*Euphorbia esula*). **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012.

CHEN, L. et al. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta**, 234, 377–390, 2011.

CHENG, D. et al. Validation of Reference Genes in *Solenopsis invicta* in Different Developmental Stages, Castes and Tissues. **Plos One**, v. 8, n. 2, 2013.

CRUZ, F. et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, 23(4), 607–616, 2009.

DOCIMO, T. et al. Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression studies in *Erythroxylum coca*. **F1000Research**, 2: 37. doi: 10.3410/f1000research.2-37.v1, 2013.

FAN, C.J. et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Plos One**, 8: e56573, 2013.

FIGUEIREDO, A. et al. Validation of reference genes for normalization of qPCR gene expression data from *Coffea* spp. hypocotyls inoculated with *Colletotrichum kahawae*. **BMC Research Notes**, 6:388, 2013.

GATICA-ARIAS, A. M; ARRIETA-ESPINOZA, G; ESQUIVEL, A. M. E. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. **Journal of Biotechnology**, v. 11, jan, 2008.

GRUSZCZYNSKA, A.; RAKOCZY-TROJANOWSKA M.C. Expression analysis of somatic embryogenesis-related SERK, LEC1, VP1 and NiR orthologues in rye (*Secale cereale* L.). **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2011.

GUTIERREZ, L. et al. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. **The Plant Cell**, 20: 1734-1735, 2008a.

GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcriptionpolymerase chain reaCtion (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, 6. pp. 609–618, 2008b.

- HONGJIAN, W. et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber **Analytical Biochemistry** 399(2):257–261, 2010.
- IMAI, T. et al. Evaluation of Reference Genes for Accurate Normalization of Gene Expression for Real Time- Quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* Using Different Tissue Samples and Seasonal Conditions. **Plos One**, v.9, n. 1, 2014.
- KONG, Q. et al. Screening Suitable Reference Genes for Normalization in Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR Analysis in Melon. **Plos One**, v. 9, n. 1, 2014.
- KUMAR, V. et al. Traditional and novel references towards systematic normalization of qRT-PCR data in plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 1, p. 1455-1468, 2011.
- LIN, L. et al. Identification of appropriate reference genes for normalizing transcript expression by quantitative real-time PCR in *Litsea cubeba*. **Molecular Genetics Genomics**, v.288, p. 27–737, 2013.
- LING, H. et al. Comprehensive Selection of Reference Genes for Gene Expression Normalization in Sugarcane by Real Time Quantitative RT-PCR. **Plos One**, v. 9, n. 5, 2014.
- LLAND, H.; HERTZBERG, M.; MARLTON, P. Myeloid leukemia Methods and Protocols, **Humana**, 2006.
- LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N.A. Real-time PCR: current technology and applications. Norfolk, UK: **Caister Academic Press**, 2009.
- MA, J. et al. Cloning and Molecular Characterization of a SERK Gene Transcriptionally Induced During Somatic Embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, p. 195–203, 2012.

MAMO, S. et al. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. **BMC Developmental Biology**, 7: 14, 2007.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time PCR. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1559–1582, 2006.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Comércio cafeeiro mundial (1963 – 2013): uma análise dos mercados, desafios e oportunidades para o setor. London, 2014.

RODRIGUES, T.B. et al. Validation of Reference Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **Plos One**, v.9, n 11, 2014.

PATHI, K.M.; TULA, S.; TUTEJA, N. High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient Agrobacterium-mediated genetic transformation of tobacco. **Plant Signal Behavior**, 8(6):e24354. doi: 10.4161/psb.24354, 2013.

PFÄFFL, M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 509–515, 2004.

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

SANTIS, C.D.; SMITH-KEUNE, C.; JERRY, D.R. Normalizing RT-qPCR data: are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish *Lates calcarifer*. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 170–180, 2011.

SILVA, A. T. et al. Characterization of a putative serk-like ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 176-184, 2014.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology** 7, 2006.

SPINSANTI, G. et al. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies. **BMC Molecular Biology**; 7: 32. doi:10.1186/1471-2199-7-32, 2006.

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

VAN BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.44, p.4-17, 1996.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3: RESEARCH0034, 2002.

VANDESOMPELE, J.; KUBISTA M.; PFAFFL, M. Reference gene validation software for improved normalization. In: Logan J, Edwards K, Saunders N (eds) Real-time PCR: current technology and applications. **Caister Academic Press**, London, pp 47–64, 2009.

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

WINKELMANN, T. Clonal propagation of *Cyclamen persicum* via somatic embryogenesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 589, p. 281-290, 2010.

ZAFFAGNINI, M. et al. Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 4:450, 2013.

ZAMARRIPA, A. et al. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café Cacao Thé**, v. 35, n. 4, p. 233-244, 1991.

ZENG, S. et al. Identification and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization and Its Applications in *Lycium*. **Plos One**, v.9, n.5, 2014.

ZHANG, B. Evaluating Reference Genes Expression>> RefFinder. Copyright @ 2013 - 2014 Dr.Zhang's Lab. Em: < <http://www.leonxie.com/referencegene.php> >. Acesso em: 01 fevereiro 2015.

ZHANG, Y. et al. The Theobroma cacao B3 domain transcription factor TcLEC2 plays a dual role in control of embryo development and maturation. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 106, jan. 2014.

## Tabelas

Tabela 1. Informações gerais dos doze candidatos a genes de referência.

Gene	Acesso	Sequência do primer (5' – 3')	Concentração (µM)	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon (pb)	E (%)	R <sup>2</sup>
<b>24S - proteína ribossomal 24S</b>	GT730897.1 <sup>a</sup>	F: GACCAATCGTCTTCTTCCAGAAA R: TCAACTCAGCCTTGGAAACATTAG	2	60,0 58,0	83	100,0	0,984
<b>ACT – actina</b>	GT000704.1 <sup>a</sup>	F: GCCAGATGGACAAGTGATTACCA R: CAGCAGCTTCCATTCTATGATAG	1	60,0 58,0	87	100,0	0,969
<b>GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase</b>	GW488886.1 <sup>a</sup>	F: GGG AAGAGCTGCTCATTTAACA R: CCATTGAGGGCTGGAAGAAC	1,5	59,0 58,0	84	95,0	0,987
<b>CYCL – ciclofilina</b>	GT007167.1 <sup>a</sup>	F: TGGTCCAGGGATTTGTCCAT R: CGGTCTGTCCGGTGCAGAT	1	60,0 58,0	82	96,0	0,997
<b>EF1a - fator de alongamento 1a</b>	GR996930.1 <sup>a</sup>	F: GGTGGTTTTGAAGCTGGTATTTCT R: TGTTGCAGCAGCAGATCATTT	1	59,0 58,0	81	92,0	0,997
<b>TUB - β-tubulina</b>	GT707405.1 <sup>a</sup>	F: TCGGGCTGTCTCATGGAT R: TTGTCGGGCCTGAAGATCTG	1	60,0 60,0	84	90,0	0,995
<b>PP2A - proteína fosfatase 2A</b>	GT005097.1 <sup>a</sup>	F: ACCTATGGGTGAAATGAAGATGGA R: AGCGCGGAGATGAATCTTT	2	60,0 60,0	80	97,0	0,973
<b>AP47 - subunidade média do complexo adaptador de clatrina</b>	DV690764.1 <sup>a</sup>	F: GGTGTACGCTACCATTTTCATC R: AGCCAACAGCACCCAGTAACTTG	1,5	59,0 58,0	74	97,0	0,947
<b>RPL39 - proteína ribossomal L39</b>	GT720707.1 <sup>a</sup>	F: GCGAAGAAGCAGAGGCAGAA R: TTGGCATTGTAGCGGATGGT	2	59,0 60,0	80	87,0	0,991
<b>APRT - adenina fosforribosiltransferase</b>	GR996015.1 <sup>a</sup>	F: TGGAGAACGGGCTCTGGTAGT R: ACGCGCTCAAGTAGCCTGAT	2	60,0 59,0	80	92,0	0,992
<b>UBQ – ubiquitina</b>	KP770021 <sup>a</sup>	F: AATCCGTCCC GCATGTT R: CCAGTGCATCCTGTTGTCTCA	1	60,0 58,0	80	99,0	0,999
<b>14-3-3 - proteína 14-3-3</b>	SGN-U356404 <sup>b</sup>	F: AGCTCAGCAAGATATGTGATGGAA R: TGGTAGTCACCTTCATTTTCAGA	1	59,0 59,0	80	80,0	0,955

<sup>a</sup>Número de acesso NCBI; <sup>b</sup>Número de acesso SOL Genomics Network; F, *primer forward*; R, *primer reverse*; T<sub>m</sub>, temperatura de *Melting*; E, eficiência da amplificação; R<sup>2</sup>, coeficiente de regressão.

Tabela 2. *Ranking* dos candidatos a genes de referência de acordo com seu valor de estabilidade pelos algoritmos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct* em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento relacionados à embriogênese somática em *Coffea arabica* L..

Gene	Valor de estabilidade M ( <i>geNorm</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>geNorm</i> )	Valor de estabilidade SV ( <i>NormFinder</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>NormFinder</i> )	Valor de estabilidade DP ( <i>BestKeeper</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>BestKeeper</i> )	Valor de estabilidade ( <i>Delta-Ct</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>Delta-Ct</i> )	Valor de estabilidade Geral	<i>Ranking</i> Geral
<i>24S</i>	0,273	1	0,390	2	0,425	1	0,628	2	1,414	1
<i>ACT</i>	0,588	6	0,456	5	0,562	8	0,682	5	5,886	7
<i>GAPDH</i>	0,706	12	0,711	12	0,677	12	0,850	12	12,00	12
<i>CYCL</i>	0,620	8	0,496	7	0,525	6	0,706	7	6,964	8
<i>EF1a</i>	0,517	4	0,424	4	0,489	5	0,661	4	4,229	5
<i>TUB</i>	0,554	5	0,415	3	0,539	7	0,656	3	4,213	4
<i>PP2A</i>	0,457	3	0,290	1	0,478	4	0,592	1	1,861	2
<i>AP47</i>	0,677	11	0,649	11	0,613	11	0,804	11	11,00	11
<i>RPL39</i>	0,273	1	0,548	8	0,464	3	0,721	8	3,722	3
<i>APRT</i>	0,605	7	0,470	6	0,435	2	0,687	6	4,736	6
<i>UBQ</i>	0,640	9	0,556	10	0,606	10	0,739	9	9,487	9
<i>14-3-3</i>	0,656	10	0,554	9	0,578	9	0,742	10	9,487	9

Tabela 3. *Ranking* dos candidatos a genes de referência de acordo com seu valor de estabilidade pelos algoritmos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct* em suspensão celular em diferentes tempos de cultivo de *Coffea arabica* L..

Gene	Valor de estabilidade M ( <i>geNorm</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>geNorm</i> )	Valor de estabilidade SV ( <i>NormFinder</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>NormFinder</i> )	Valor de estabilidade DP ( <i>BestKeeper</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>BestKeeper</i> )	Valor de estabilidade ( <i>Delta-Ct</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>Delta-Ct</i> )	Valor de estabilidade Geral	<i>Ranking</i> Geral
<i>24S</i>	0,249	1	0,334	5	0,444	8	0,525	5	3,761	5
<i>ACT</i>	0,369	4	0,298	3	0,396	4	0,515	2	3,130	3
<i>GAPDH</i>	0,548	11	0,598	11	0,533	10	0,705	11	10,74	11
<i>CYCL</i>	0,476	8	0,429	8	0,428	6	0,592	8	7,445	8
<i>EF1a</i>	0,434	6	0,295	2	0,342	1	0,521	4	2,632	2
<i>TUB</i>	0,405	5	0,302	4	0,427	5	0,520	3	4,162	6
<i>PP2A</i>	0,454	7	0,356	6	0,443	7	0,548	6	6,481	7
<i>AP47</i>	0,583	12	0,665	12	0,643	12	0,755	12	12,00	12
<i>RPL39</i>	0,249	1	0,419	7	0,395	3	0,574	7	3,482	4
<i>APRT</i>	0,313	3	0,257	1	0,361	2	0,494	1	1,565	1
<i>UBQ</i>	0,523	10	0,494	10	0,537	11	0,634	10	10,24	10
<i>14-3-3</i>	0,503	9	0,458	9	0,496	9	0,607	9	9,00	9

Tabela 4. *Ranking* dos candidatos a genes de referência de acordo com seu valor de estabilidade pelos algoritmos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct* em calo não embriogênico de *Coffea arabica* L..

Gene	Valor de estabilidade M ( <i>geNorm</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>geNorm</i> )	Valor de estabilidade SV ( <i>NormFinder</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>NormFinder</i> )	Valor de estabilidade DP ( <i>BestKeeper</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>BestKeeper</i> )	Valor de estabilidade ( <i>Delta-Ct</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>Delta-Ct</i> )	Valor de estabilidade Geral	<i>Ranking</i> Geral
<i>24S</i>	0,102	9	0,085	6	0,094	8	0,126	7	7,416	8
<i>ACT</i>	0,042	1	0,065	3	0,029	2	0,108	3	2,060	2
<i>GAPDH</i>	0,048	3	0,087	7	0,051	4	0,120	6	4,738	5
<i>CYCL</i>	0,096	8	0,098	8	0,037	3	0,127	8	6,260	6
<i>EF1a</i>	0,115	11	0,131	11	0,075	6	0,152	11	9,453	10
<i>TUB</i>	0,089	7	0,077	5	0,106	9	0,120	5	6,300	7
<i>PP2A</i>	0,061	4	0,075	4	0,077	7	0,114	4	4,601	4
<i>AP47</i>	0,084	6	0,102	9	0,112	10	0,129	9	8,349	9
<i>RPL39</i>	0,072	5	0,029	1	0,059	5	0,099	2	2,659	3
<i>APRT</i>	0,127	12	0,172	12	0,160	12	0,188	12	12,00	12
<i>UBQ</i>	0,042	1	0,032	2	0,013	1	0,098	1	1,189	1
<i>14-3-3</i>	0,108	10	0,127	10	0,132	11	0,148	10	10,24	11

Tabela 5. *Ranking* dos candidatos a genes de referência de acordo com seu valor de estabilidade pelos algoritmos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct* em calo embriogênico de *Coffea arabica* L..

Gene	Valor de estabilidade M ( <i>geNorm</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>geNorm</i> )	Valor de estabilidade SV ( <i>NormFinder</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>NormFinder</i> )	Valor de estabilidade DP ( <i>BestKeeper</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>BestKeeper</i> )	Valor de estabilidade ( <i>Delta-Ct</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>Delta-Ct</i> )	Valor de estabilidade Geral	<i>Ranking</i> Geral
<i>24S</i>	0,094	1	0,114	3	0,106	2	0,279	3	2,060	2
<i>ACT</i>	0,101	3	0,040	1	0,144	3	0,253	1	1,732	1
<i>GAPDH</i>	0,299	11	0,387	11	0,293	8	0,455	11	10,16	11
<i>CYCL</i>	0,260	10	0,220	6	0,218	6	0,353	7	7,085	7
<i>EF1a</i>	0,358	12	0,636	12	0,440	12	0,654	12	12,00	12
<i>TUB</i>	0,122	4	0,040	1	0,154	4	0,265	2	2,828	3
<i>PP2A</i>	0,194	6	0,300	8	0,385	10	0,358	8	7,872	8
<i>AP47</i>	0,168	5	0,249	7	0,336	9	0,326	6	6,593	6
<i>RPL39</i>	0,234	9	0,172	5	0,047	1	0,319	5	3,873	5
<i>APRT</i>	0,204	7	0,318	10	0,395	11	0,371	9	9,124	10
<i>UBQ</i>	0,094	1	0,145	4	0,177	5	0,280	4	2,991	4
<i>14-3-3</i>	0,220	8	0,317	9	0,285	7	0,380	10	8,426	9

Tabela 6. *Ranking* dos candidatos a genes de referência de acordo com seu valor de estabilidade pelos algoritmos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct* em calo não embriogênico e calo embriogênico de *Coffea arabica* L..

Gene	Valor de estabilidade M ( <i>geNorm</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>geNorm</i> )	Valor de estabilidade SV ( <i>NormFinder</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>NormFinder</i> )	Valor de estabilidade DP ( <i>BestKeeper</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>BestKeeper</i> )	Valor de estabilidade ( <i>Delta-Ct</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>Delta-Ct</i> )	Valor de estabilidade Geral	<i>Ranking</i> Geral
<i>24S</i>	0,106	1	0,094	2	0,145	2	0,488	1	1,414	2
<i>ACT</i>	0,529	10	0,719	10	0,648	10	0,806	10	10,00	10
<i>GAPDH</i>	0,590	11	0,890	11	0,760	11	0,946	11	11,00	11
<i>CYCL</i>	0,266	5	0,315	6	0,283	6	0,563	5	5,477	5
<i>EF1a</i>	0,354	7	0,421	7	0,274	5	0,656	8	6,654	7
<i>TUB</i>	0,294	6	0,472	8	0,445	8	0,633	7	7,200	8
<i>PP2A</i>	0,220	4	0,231	4	0,302	7	0,538	4	4,601	4
<i>AP47</i>	0,397	8	0,288	5	0,249	4	0,574	6	5,566	6
<i>RPL39</i>	0,106	1	0,053	1	0,083	1	0,489	2	1,189	1
<i>APRT</i>	0,468	9	0,592	9	0,492	9	0,729	9	9,000	9
<i>UBQ</i>	0,667	12	1,025	12	0,920	12	1,056	12	12,00	12
<i>14-3-3</i>	0,169	3	0,215	3	0,207	3	0,529	3	3,000	3

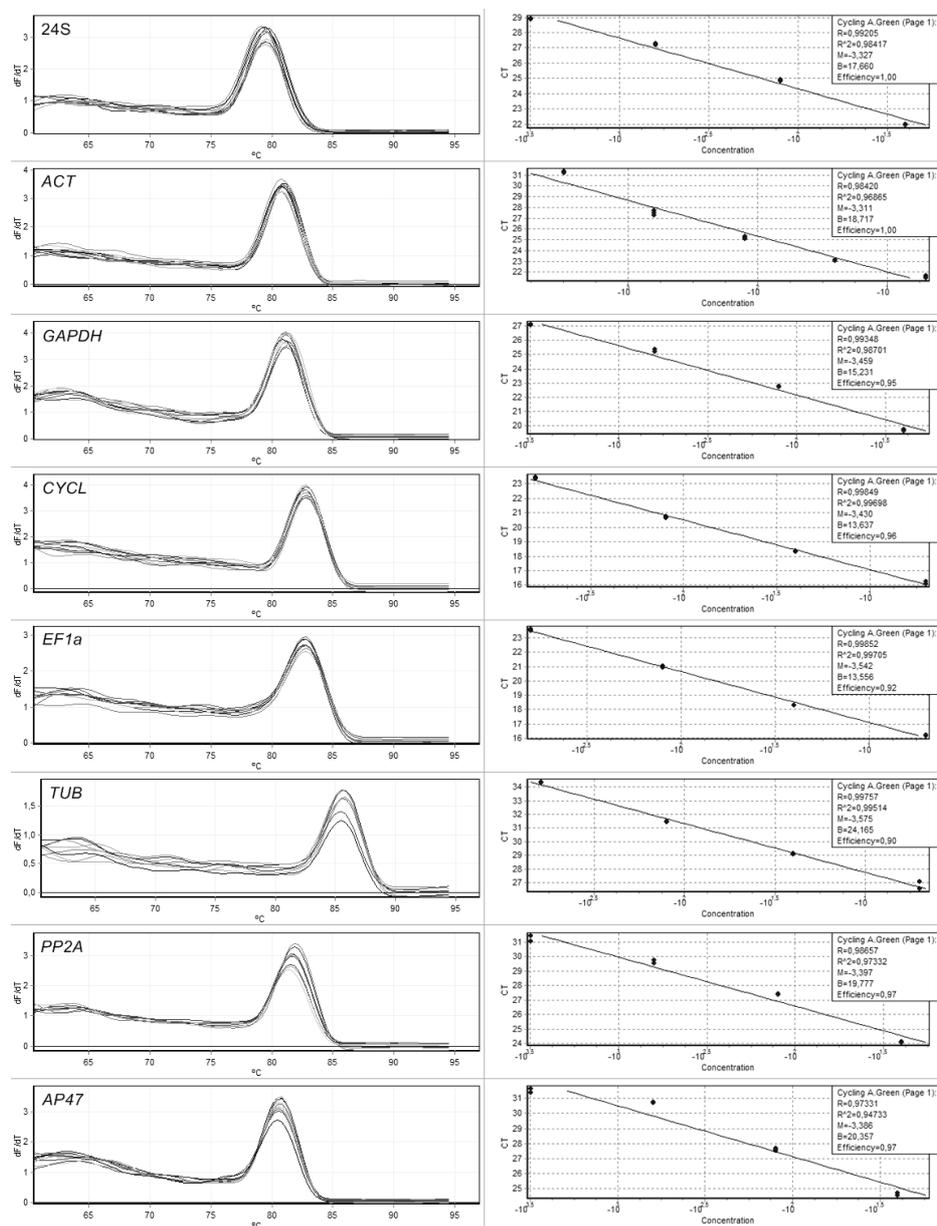
Tabela 7. *Ranking* dos candidatos a genes de referência de acordo com seu valor de estabilidade pelos algoritmos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct* em embrião nos estádios globular, codiforme/torpedo e cotiledonar de *Coffea arabica* L..

Gene	Valor de estabilidade M ( <i>geNorm</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>geNorm</i> )	Valor de estabilidade SV ( <i>NormFinder</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>NormFinder</i> )	Valor de estabilidade DP ( <i>BestKeeper</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>BestKeeper</i> )	Valor de estabilidade ( <i>Delta-Ct</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>Delta-Ct</i> )	Valor de estabilidade Geral	<i>Ranking</i> Geral
<i>24S</i>	0,238	3	0,192	3	0,547	3	0,503	3	3,000	3
<i>ACT</i>	0,540	10	0,584	9	1,063	11	0,698	8	9,434	10
<i>GAPDH</i>	0,361	6	0,392	6	0,927	10	0,593	6	6,817	9
<i>CYCL</i>	0,415	7	0,439	7	0,569	5	0,629	7	6,435	8
<i>EF1a</i>	0,315	5	0,257	4	0,567	4	0,535	4	4,229	4
<i>TUB</i>	0,587	11	0,763	12	1,258	12	0,838	11	11,49	12
<i>PP2A</i>	0,200	1	0,074	1	0,673	7	0,470	1	1,627	1
<i>AP47</i>	0,634	12	0,762	11	0,690	8	0,866	12	10,61	11
<i>RPL39</i>	0,200	1	0,099	2	0,666	6	0,475	2	2,213	2
<i>APRT</i>	0,503	9	0,629	10	0,421	1	0,747	10	5,477	6
<i>UBQ</i>	0,281	4	0,299	5	0,868	9	0,539	5	5,477	5
<i>14-3-3</i>	0,466	8	0,569	8	0,427	2	0,708	9	5,826	7

Tabela 8. *Ranking* dos candidatos a genes de referência de acordo com seu valor de estabilidade pelos algoritmos *geNorm*, *NormFinder*, *BestKeeper* e *Delta-Ct* em plântula de *Coffea arabica* L..

Gene	Valor de estabilidade M ( <i>geNorm</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>geNorm</i> )	Valor de estabilidade SV ( <i>NormFinder</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>NormFinder</i> )	Valor de estabilidade DP ( <i>BestKeeper</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>BestKeeper</i> )	Valor de estabilidade ( <i>Delta-Ct</i> )	<i>Ranking</i> ( <i>Delta-Ct</i> )	Valor de estabilidade Geral	<i>Ranking</i> Geral
<i>24S</i>	0,049	5	0,064	6	0,032	5	0,091	7	5,692	6
<i>ACT</i>	0,059	6	0,033	2	0,066	7	0,077	2	3,600	4
<i>GAPDH</i>	0,086	11	0,081	10	0,082	8	0,103	10	9,685	10
<i>CYCL</i>	0,082	10	0,098	11	0,110	12	0,110	11	10,97	12
<i>EF1a</i>	0,078	9	0,073	8	0,096	11	0,095	8	8,922	9
<i>TUB</i>	0,068	7	0,065	7	0,084	10	0,089	6	7,364	7
<i>PP2A</i>	0,024	1	0,048	3	0,014	1	0,078	3	1,732	1
<i>AP47</i>	0,035	3	0,017	1	0,029	4	0,069	1	1,661	2
<i>RPL39</i>	0,073	8	0,073	8	0,084	9	0,095	8	8,739	8
<i>APRT</i>	0,024	1	0,062	5	0,024	2	0,086	4	2,515	3
<i>UBQ</i>	0,041	4	0,059	4	0,026	3	0,086	4	3,936	5
<i>14-3-3</i>	0,091	12	0,108	12	0,063	6	0,118	12	10,09	11

## Figura Suplementar



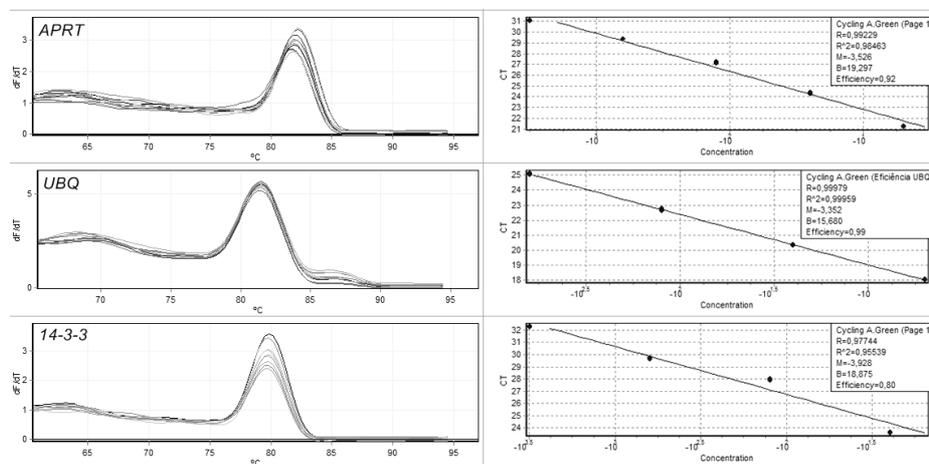


Figura Suplementar. Curva de dissociação e curva padrão dos doze candidatos a genes de referência.

Figura

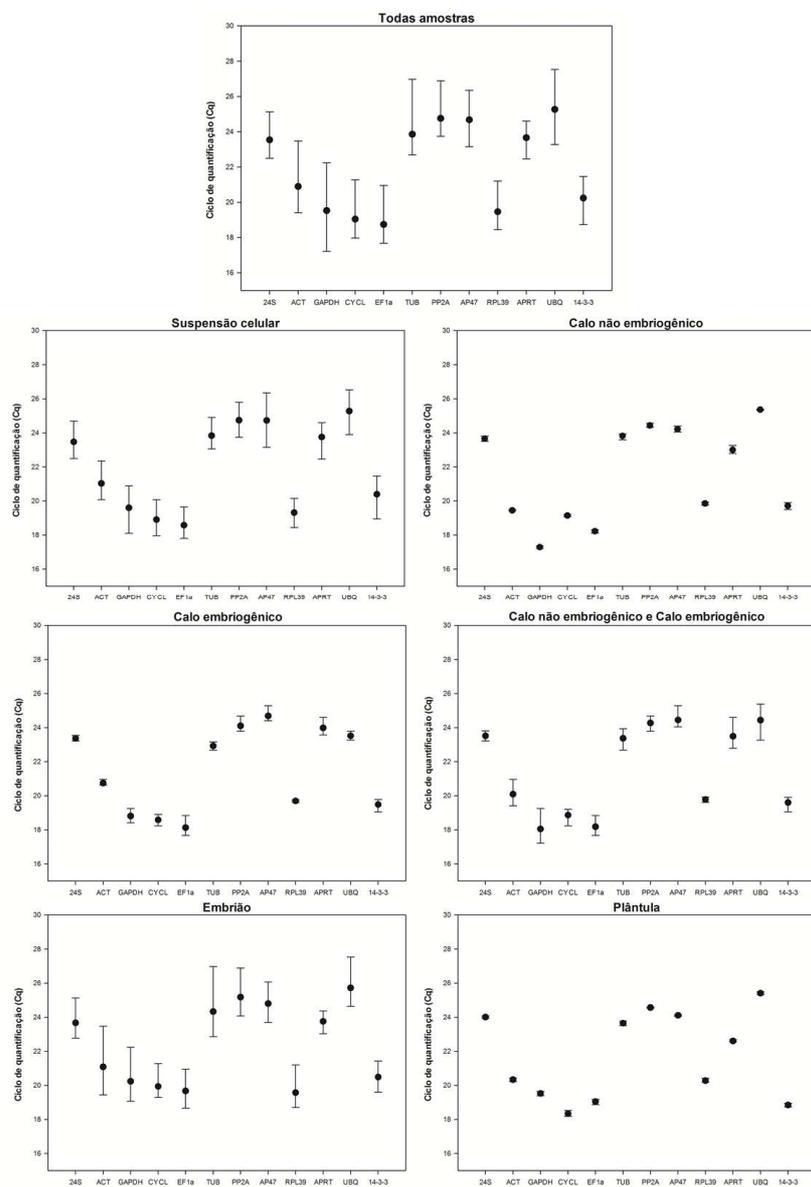


Figura 1. Perfis de expressão dos candidatos a genes de referência. Os níveis de expressão são apresentados com valores Cq para cada candidato a gene de referência a partir da análise dos seis conjuntos amostrais. Barras indicam os valores Cq máximo e mínimo. Círculos representam os valores médio Cq.

**ARTIGO 2** Análise *in silico* dos genes da família LAV e expressão quantitativa de VAL2 durante a embriogênese somática indireta de *Coffea arabica* L.

**ANÁLISE *IN SILICO* DOS GENES DA FAMÍLIA LAV E EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE *VAL2* DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA DE *Coffea arabica* L.**

**RESUMO**

A compreensão do processo de indução da embriogênese somática através da análise da expressão gênica é uma forma confiável para identificar o potencial embriogênico celular, possibilitando a otimização dos protocolos de regeneração de plantas. Objetivou-se nesse trabalho verificar se os genes da família LAV identificados *in silico* apresentam expressão diferencial durante a embriogênese somática de *Coffea arabica* L. A correlação da expressão dos genes com o potencial embriogênico foi realizada comparativamente com o auxílio de análises histológicas e regeneração de embriões somáticos em duas linhagens independentes de suspensões celulares. A busca das sequências homólogas foi realizada por meio de análises de bioinformática no banco de dados de ESTs (*Expression Sequences Tags*), gerado pelo Projeto Genoma Café Brasileiro. Dentre os genes da família LAV, apenas possíveis ortólogos (C15, SEA1 e SIC1) de *VAL2* foram identificados em *C. arabica*. Os perfis de expressão verificados *in vivo* diferiram dos obtidos *in silico*, os dados mostraram expressão quantitativa relativa variável do C15 e SIC1 em todas as amostras analisadas e ausência de expressão do gene SEA1 em todos tecidos. As linhagens de suspensões celulares apresentaram o mesmo padrão histológico e aumento da taxa de regeneração em função do tempo de cultivo (60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias). Não foi verificada relação dos níveis de expressão dos genes C15 e SIC1 com o potencial embriogênico. O bom desenvolvimento das plântulas obtidas a partir do protocolo utilizado pode ser reflexo da alta expressão de *VAL2* nos embriões cotiledonares. A expressão desse gene pode ser um possível parâmetro

para a melhoria do sistema de propagação, visando assegurar a conversão de embriões em plântulas normais. Este é o primeiro estudo a fornecer informações sobre a expressão de *VAL2* durante a embriogênese somática.

## INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é uma técnica com grande potencial a ser explorada no auxílio aos programas de melhoramento convencional, pois possibilita a propagação clonal de plantas-elite, em larga escala, e obtenção de novos materiais genéticos em tempo reduzido. Em café, eventos de transformação genética já foram obtidos com eficiência próxima a 100% através da regeneração de plantas via embriogênese somática indireta (RIBAS et al., 2011).

Estudos realizados para estabelecer protocolos de embriogênese somática em *C. arabica* demonstraram que suspensões celulares possuem maior eficiência na taxa regenerativa de embriões em comparação a calos embriogênicos. Enquanto calos originam cerca de 200 embriões por grama cultivado em meio semi-sólido (MACIEL et al., 2003), em cultura líquida, os agregados celulares podem produzir cerca de 12.300 embriões/grama de matéria fresca (SÖNDAHL; SHARP, 1977).

Contudo, a eficiência da regeneração de embriões somáticos pode ser extremamente reduzida devido à qualidade das células em suspensão, em que a competência embriogênica pode estar restrita a uma pequena fração dos aglomerados celulares (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Neste sentido, estudos para a identificação de suspensões com grande quantidade de células competentes a regenerar embriões são importantes para a otimização de protocolos.

A caracterização de células embriogênicas pode ser realizada por análises histológicas, porém a técnica é demorada e incapaz de inferir sobre a

taxa de regeneração de embriões somáticos. A formação de um organismo funcional a partir de uma célula somática requer a expressão diferencial de genes envolvidos no processo (CHUGH; KHURANA, 2002). Sendo assim, a análise da expressão de genes marcadores relacionados à indução da embriogênese somática é uma forma eficiente e confiável para identificar o potencial embriogênico celular (SILVA et al., 2014).

Estudos moleculares realizados com diversas espécies de plantas têm permitido à compreensão do processo de indução da embriogênese somática. Dentre os genes codificadores de proteínas que fazem parte da indução e desenvolvimento dos embriões estão os pertencentes à família LAV do domínio B3 (SUZUKI; McCARTY, 2008). Em *Arabidopsis* essa família é constituída pelos genes AFL (*ABI3*, *FUS3* e *LEC2*) e VAL (*VAL1*, *VAL2* e *VAL3*). Os níveis de expressão dos genes AFL foram correlacionados em vários trabalhos com a indução da resposta embriogênica em tecidos somáticos a nível de capacidade e/ou frequência de formação de embriões somáticos (GAJ et al., 2005; KIKUCHI et al., 2006; LEDWON; GAJ, 2009; STONE et al., 2001; ZHANG et al., 2014). A caracterização funcional dos genes VAL durante a embriogênese somática permanece inexplorada, contudo, sabe-se que na embriogênese zigótica estes genes em conjunto com outros fatores de transcrição são repressores dos genes AFL e a inibição é necessária durante a germinação para que o crescimento das plântulas ocorra normalmente (JIA; McCARTY; SUZUKI, 2013; SHARMA et al., 2013).

Visando a elucidação do processo de aquisição de competência embriogênica em café e o desenvolvimento de protocolos de regeneração mais eficientes, objetivou-se, neste trabalho, verificar se os genes da família LAV identificados *in silico* apresentavam expressão diferencial durante a embriogênese somática de *C. arabica* L. A correlação da expressão dos genes

com o potencial embriogênico foi realizada comparativamente com o auxílio de análises histológicas e regeneração de embriões somáticos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Indução de Calos e Estabelecimento das Suspensões Celulares**

Calos embriogênicos e não embriogênicos foram obtidos segundo o protocolo de Teixeira et al. (2004) a partir de plantas matrizes da cv. Catuaí Amarelo IAC 62 cultivadas em casa de vegetação. As suspensões celulares foram obtidas cultivando calos embriogênicos em frascos de Erlenmeyer com meio líquido de multiplicação T3 (VAN BOXTEL; BERTHOULY, 1996) com densidade inicial de biomassa de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de meio (ZAMARRIPA, 1991) e renovação total do meio a cada 15 dias de cultivo. Os frascos foram mantidos em ausência de luz em agitadores orbitais a 100 rpm a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Regeneração de Embriões Somáticos e Análise Estatística**

Os embriões foram regenerados a partir das suspensões celulares cultivadas em diferentes tempos de cultivo com densidade inicial de biomassa de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de meio RR (CARVALHO et al., 2013). Os frascos foram mantidos em ausência de luz em agitadores orbitais a 100 rpm e a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 75 dias. Após esse período, os embriões formados foram contabilizados com auxílio de microscópio estereoscópio. A maturação e germinação dos embriões somáticos foram realizadas seguindo procedimento anteriormente descrito por Teixeira et al. (2004).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com duas linhagens de suspensões celulares. Cada linhagem foi constituída por três repetições biológicas, sendo seis tempos de cultivo (60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias). Cada amostra foi composta por 40 mg de aglomerados celulares. Os dados foram submetidos à análise de variância,

utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team 2008), e à análise de regressão polinomial.

### **Análise Histológica**

Amostras de calo não embriogênico, calo embriogênico, suspensões celulares em diferentes tempos de cultivo e embriões nos estádios globular, cordiforme/torpedo e cotiledonar foram fixadas em solução FAA 70% (formaldeído, ácido acético e etanol a 70 %, na proporção de 1:1:18 v/v) (JOHANSEN, 1940) por 72 horas, seguido de desidratação em série etílica (60, 70, 80, 90 e 100%) expondo o material por uma hora em cada série. Posteriormente, as amostras foram infiltradas em resina epóxi (*Histo-resin® Leica*) de acordo com protocolo do fabricante. Cortes com espessura de 2 µm foram obtidos em micrótomo manual (*Easypath EP-31-20091*), corados com solução de azul de toluidina a 0,05% (O'BRIEN et al., 1965) e selados com *Entellan®*. As fotomicrografias foram obtidas a partir de câmera digital acoplada em microscópio óptico (*Zeiss, Axio Scope*) utilizando o sistema de captura de imagem digital *AxioVision 4.8*.

### **Análise *in silico***

Sequências candidatas aos genes *ABI3*, *FUS3*, *LEC2*, *VAL1*, *VAL2* e *VAL3* foram pesquisadas por meio de palavras-chave e do BLAST de sequências dos genes da superfamília B3 disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) tendo-se como fonte de dados o banco de *ESTs* gerado pelo Projeto Brasileiro do Genoma Café (CAFEST; VIEIRA et al., 2006). Através da interface *Gene Project* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) foi realizada a procura por *reads*, clusterização e análise dos prováveis genes.

A comparação das sequências de nucleotídeos de interesse com as sequências de proteínas de banco de dados públicos (NCBI) foi realizada

utilizando o algoritmo BLASTx. A parte funcional da proteína, bem como sua matriz de leitura, foram caracterizadas utilizando a ferramenta *ORF FINDER* (*Open Reading Frame Finder*). O alinhamento da sequência da proteína de interesse com as proteínas disponíveis no NCBI foi realizado através do algoritmo BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997).

### **Análise Filogenética**

O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) com os parâmetros padrões, utilizando-se as sequências de nucleotídeos traduzidas em aminoácidos. A árvore final foi feita utilizando-se o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007), com o modelo de comparação *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), método de distância *p* e supressão *pair-wise*. A validade da árvore quanto à distância filogenética dos *clusters* foi medida pelo teste probabilístico de *bootstraps*, originado de 10000 replicatas (SITNIKOVA; RZHETSKY; NEI, 1995). O programa *GeneDoc* versão 2.7 (<http://genedoc.software.informer.com/2.7/>) foi utilizado para descobrir *motifs* de agrupamento entre as sequências.

### **Northern Eletrônico**

Para a análise da expressão gênica *in silico*, foram calculadas as frequências de *reads* formadores de cada EST-*contig* nas bibliotecas em que apareceram expressos, com posterior normalização dos dados. O procedimento para a normalização consistiu em multiplicar cada *read* pela razão entre o número total de *reads* de todas as bibliotecas e o número de *reads* da biblioteca em que apareceram expressos. Os EST-*contigs* e as bibliotecas foram agrupados por *hierarchical clustering* utilizando-se os programas *Cluster* e *TreeView* (EISEN et al., 1998). Os resultados de expressão foram apresentados em uma escala cinza, onde a expressão zero ou negativa é representada por coloração

mais clara sendo aumentada gradativamente até atingir o preto, que representa o grau máximo de expressão positiva.

### **Análise da Expressão Gênica**

#### **Extração de RNA total e Síntese de cDNA**

Foram coletadas amostras de calo não embriogênico, calo embriogênico, suspensão celular em diferentes tempos de cultivo, embrião somático em diferentes estádios e plântula.

A extração de RNA a partir de calo embriogênico, suspensão celular e embrião globular foi realizada utilizando o *Kit NucleoSpin®* (Macherey Nagel) e calo não embriogênico, embrião cordiforme/torpedo, embrião cotiledonar e plântula foram extraídos com *Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen). Todas as amostras foram tratadas com o *Kit Turbo DNA-free* (Ambion) para a remoção total de DNA genômico. A quantidade e pureza do RNA foram mensuradas em *Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000*, enquanto que sua qualidade e integridade foram verificadas pelo *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies), assegurando valores de RIN igual e/ou superior a 7,0. O *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) foi utilizado para a síntese de cDNA a partir de 1000 ng de RNA.

#### **RT-qPCR**

A expressão dos genes candidatos identificados e selecionados *in silico* foi quantificada mediante RT-qPCR com *primers* desenhados no programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystem) (Tabela 1).

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems) em volume total de 10 µL contendo 200 ng de cDNA, 1X SYBR® Green master mix (Applied Biosystems) e 1,0 µM de cada *primer*. As amplificações ocorreram durante 2 minutos a 50 °C, 10

minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C. As curvas de dissociação (*Melting curve*) foram registradas após 40 ciclos para confirmar a especificidade dos *primers* por aquecimento de 60°C para 95°C. Todas as reações foram realizadas com triplicata técnica e biológica. Os dados de expressão foram quantificados relativamente pela fórmula de Pfaffl (2001), a normalização foi feita com a expressão dos genes de referência *24S* e *PP2A* e foi utilizada como amostra de referência (RQ=1) o calo não embriogênico (CNE).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Regeneração de Embriões Somáticos**

Calos embriogênicos (CE) e calos não embriogênicos (CNE) foram obtidos após cinco meses da inoculação dos explantes foliares (TEIXEIRA et al., 2004) (Figura 1A). As suspensões celulares foram iniciadas a partir do cultivo de CE em meio líquido (VAN BOXTEL; BERTHOULY, 1996) (Figura 1B). O processo de regeneração de embriões somáticos a partir de suspensões celulares foi obtido com êxito utilizando meios e condições experimentais já descritos na literatura (CARVALHO et al., 2013; TEIXEIRA et al. 2004; VAN BOXTEL; BERTHOULY, 1996; ZAMARRIPA et al., 1991). Após 75 dias de cultivo em meio RR os embriões formados com aspecto semelhante ao da Figura 1 (C-F) foram transferidos para o meio MGM (TEIXEIRA et al. 2004). Ao final de 60 dias, os embriões apresentaram início e/ou completa formação dos cotilédones (Figura 1G). Os embriões foram submetidos ao processo de germinação em meio MGM sob condição luminosa e após cerca de 30 dias os embriões cotiledonares apresentaram desenvolvimento da radícula evidenciando a conversão de embriões somáticos em plântulas (Figura 1H).

De acordo com a análise de variância (ANAVA), houve diferença significativa na regeneração de embriões somáticos apenas entre os tempos de cultivo ( $p = 0,000169$ ) (Tabela 2). Em ambas as linhagens celulares (L1 e L2)

foi verificado um aumento na regeneração de embriões dentro do período avaliado. Assim como em suspensões celulares, foi relatado na literatura que a capacidade regenerativa de calos embriogênicos pode não ser reduzida com a idade. Em alguns experimentos foi verificado correlação positiva entre o envelhecimento dos calos e sua capacidade de regeneração (TEIXEIRA et al., 2004). Além do aumento da taxa de regeneração, a idade do cultivo do calo embriogênico também influencia na obtenção de maiores eficiências de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Enquanto o cultivo de calos pelo período de 7 a 9 meses gera eficiência próxima a 100% de eventos transformados, o cultivo de 1 mês obtém eficiência cinco vezes menor (RIBAS et al., 2011).

As duas linhagens de suspensões celulares apresentaram ajuste ao modelo de regressão linear quanto à taxa de regeneração em embriões somáticos em função do tempo de cultivo. O comportamento da regeneração na L1 é representado por:  $y = 0,0192x + 3,025$ ;  $R^2 = 0,88$  e na L2 por:  $y = 0,0113x + 4,0696$ ;  $R^2 = 0,75$ . Aos 60 dias de cultivo L1 e L2 apresentaram taxa de regeneração equivalente a 3,8 e 4,8 embriões/mg de agregado celular, respectivamente. Já aos 210 dias, as taxas foram iguais a 6,6 embriões/mg nas duas linhagens (Figura 8). As taxas de regeneração de embriões somáticos obtidas no presente estudo foram satisfatórias, corroborando com dados obtidos em outros trabalhos realizados com café (CARVALHO et al., 2013; RIBEIRO, 2014).

### **Análise Histológica**

Os calos embriogênicos selecionados neste trabalho apresentavam como aspectos visuais coloração amarela intensa, textura granular e alta friabilidade, enquanto os calos não embriogênicos apresentaram alta compactação e coloração marrom (Figura 1A). Os calos foram caracterizados histologicamente

mostrando diferenças entre as células (Figura 2A e B). Nas secções anatómicas foram observadas que células de CE e CNE apresentam modificações características em nível do núcleo, citoplasma e parede celular, como já verificado em outros trabalhos (RIBAS et al., 2011; PÁDUA et al., 2014; SILVA et al., 2014). CNE apresentou células com 15 a 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro, altamente vacuoladas, com formatos irregulares e paredes celulares de 1,8  $\mu\text{m}$ . CE possui regiões meristemáticas com células pequenas (8 a 14  $\mu\text{m}$  de diâmetro), isodiamétricas, com citoplasma denso, paredes celulares de 0,4  $\mu\text{m}$ , núcleo grande com nucléolo evidente. Várias células embriogênicas apresentaram dois núcleos num mesmo citoplasma, evidenciando a citocinese ainda não concluída no processo de divisão celular (Figura 2C).

A análise histológica de embriões em diferentes fases de desenvolvimento permitiu a observação da diferenciação de tecidos, com a formação de protoderme, faixas procambiais, definição do meristema apical e ápice radicular. O embrião em estágio globular (Figura 2D) apresentou linearização celular com a formação da protoderme e no centro da estrutura o início da formação do procâmbio. No embrião cordiforme/torpedo, a organização do meristema apical se inicia e a região vascular com células alongadas corresponde ao procâmbio bem definido (Figura 2E). Constituindo a camada basal dos embriões, nota-se a formação do ápice radicular no estágio cotiledonar (Figura 2F).

As análises permitiram constatar que não há qualquer conexão vascular entre os embriões somáticos e o tecido de origem, confirmando a individualidade dos embriões somáticos (HACCIUS, 1978). Esta característica dos embriões somáticos aliados a sua bipolaridade torna este modelo morfogênético distinto dos processos de organogênese (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

As análises histológicas das duas linhagens de suspensão celular (L1 e L2) realizadas a cada 30 dias de cultivo mostraram que não houve grandes diferenças

entre as linhagens e nem entre os tempos de cultivo em relação à presença de regiões pró-embriogênicas e não embriogênicas (Figuras 3 e 4). De acordo com Mazarei et al. (2011) suspensões celulares podem apresentar dois tipos celulares distintos: células maiores altamente vacuoladas (células não embriogênicas) e células menores densamente citoplasmáticas (células com potencial embriogênico). No presente trabalho todas as secções anatômicas das suspensões celulares apresentaram regiões potencialmente embriogênicas e não embriogênicas. Acredita-se que esse tipo de heterogeneidade do material pode corresponder a uma redução da viabilidade das suspensões celulares, visto que células não embriogênicas apresentam taxas de divisão celular superior e, portanto, rápido crescimento (RIBAS et al., 2011). Porém, a heterogeneidade das suspensões celulares não influenciou na diminuição da taxa de regeneração de embriões somáticos.

#### **Análise *in silico* e Expressão Gênica**

A busca por possíveis homólogos dos genes da família LAV no banco de dados CAFEST gerou 155 *reads* com similaridade significativa ( $e\text{-value} > 10^{-4}$ ) ao domínio B3, a clusterização dos *reads* formou 32 EST-*contigs* e 45 *singlets*. Após a análise das sequências proteicas, da parte funcional e dos domínios conservados, foi possível observar uma baixa eficiência do método de seleção de *reads*, pois apenas 15 EST-*contigs* e 17 *singlets* apresentaram o domínio conservado B3.

Não foram identificadas sequências da subfamília LEC2/ABI3 pela análise filogenética entre as sequências selecionadas no CAFEST e as proteínas da família B3 obtidas no NCBI de outras espécies. Cinco sequências se agruparam às proteínas da subfamília VAL, no mesmo clado que o VAL2 (Figura 5). Essas sequências foram submetidas ao *Northen eletrônico* em bibliotecas de cafeeiro (VIEIRA et al., 2006) (Figura 6). As sequências que não

foram expressas nas bibliotecas de interesse (CNE, CE e suspensões celulares) foram descartados para as posteriores análises, restando o EST-*contig* 15 (C15) e os *singlets* CA00-XX-EA1-038-B07-EC.F (SEA1) e CA00-XX-IC1-029-H03-EC.F (SIC1). O C15 foi escolhido por apresentar expressão nula em calo não embriogênico (CA1, IC1, PC1 – Calo não embriogênico com e sem 2,4-D); e expressão nas bibliotecas de suspensão celular (CB1 – Células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil e brassinosteróides) e calo embriogênico (EA1, IA1, IA2); SEA1 e SIC1 mostraram expressão exclusiva nas bibliotecas de calo embriogênico e de calo não embriogênico, respectivamente.

O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos provenientes das sequências do C15, SIC1 e SEA1 com VAL2 de *Arabidopsis thaliana* apresentaram alta homologia com o domínio B3 (92%, 91% e 89%) e similaridade total de 51%, 85% e 85%, respectivamente (Figura 7). Em *Arabidopsis* as proteínas codificadas pelo gene VAL2 além de pertencerem à superfamília B3 apresentam também o domínio CW do tipo *zinc-finger*, devido a essas características estruturais implica-se que as proteínas VAL2 possuam funções relacionadas à remodelação da cromatina e de ligação ao DNA (SUZUKI; WANG; McCARTY, 2007). Ambos os domínios foram verificados em C15, porém em SEA1 e SIC1 o domínio CW não é presente. Provavelmente as proteínas codificadas por SIC1 e SEA1 apresentaram maior identidade à proteína de *Arabidopsis* e não conservaram o domínio CW devido ao tamanho reduzido da sequência de aminoácidos (131 e 114 aa, respectivamente).

Com base na análise *in silico* foram desenhados *primers* para as sequências C15, SEA1 e SIC1 para quantificar *in vitro* a expressão dos mesmos em CNE, CE, suspensão celular em diferentes tempos de cultivo, embrião nos diferentes estádios e plântula de *C. arabica*. Os dados mostram expressão quantitativa relativa variável de C15 e SIC1 em todas as amostras analisadas (Figura 8) e expressão nula do SEA1 em todos tecidos. Devido ao *northen*

*eletrônico* esperava-se que C15 apresentasse expressão em todas as amostras, exceto em CNE; SIC1 apenas em CNE e SEA1 apenas em CE. Uma possível explicação para a discrepância da expressão *in silico* e *in vivo* é a técnica de sequenciamento de Sanger utilizada para gerar a base de dados de ESTs no CAFEST. Neste método, os fragmentos de cDNA previamente clonados são de tamanho aleatório e para que o sequenciamento dos cDNAs de tamanho maior seja feito é necessário fazer técnicas de exclusão dos fragmentos menores. Devido a essa exclusão, a expressão *in silico* de ESTs inferidas em cada biblioteca do cafeeiro pode ter sido comprometida.

Até o momento, os relatos bibliográficos que caracterizaram funcionalmente *VAL2* não abrangeram sua relação na embriogênese somática. Em nosso estudo, os níveis de expressão verificados em SIC1 foram superiores ao de C15. No entanto, ambos apresentaram expressões mais elevadas em CE e suspensões celulares quando comparadas ao CNE. Outra semelhança foi que o pico de maior expressão dentre todas as amostras analisadas foi obtido em embrião cotiledonar. Neste estágio foi possível identificar expressão oito vezes maior para o gene C15 e quinze vezes maior para o gene SIC1 em comparação com a amostra normalizadora. O bom desenvolvimento das plântulas obtidas a partir do protocolo utilizado pode ser reflexo da alta expressão de *VAL2* nos embriões cotiledonares. Durante a embriogênese zigótica esse gene desempenha um papel repressor das vias de sinais durante a germinação para que o crescimento de plântulas ocorra normalmente (JIA; McCARTY; SUZUKI, 2013; SHARMA et al., 2013). Mutantes duplos *VAL1/VAL2* de *Arabidopsis* apresentam desenvolvimento irregular da radícula e dos cotilédones (TSUKAGOSHI; MORIKAMI; NAKAMURA, 2007). O conhecimento da expressão de *VAL2* abre perspectiva para a melhoria do sistema de propagação via embriogênese somática, visando assegurar o bom desenvolvimento de plântulas.

A fim de avaliar a correlação entre a expressão dos genes alvo e regeneração das suspensões celulares, os gráficos de RT-qPCR e da taxa de regeneração foram plotados em conjunto (Figura 8). Durante os diferentes tempos de cultivo (60 a 210 dias) as suspensões celulares L1 e L2 apresentaram níveis de expressão com oscilações, sem padrão definido. Já a taxa de regeneração de ambas as linhagens de suspensão celular apresentou maiores valores em função do decorrer do tempo, demonstrando que não houve relação entre a expressão dos genes alvo e a regeneração de embriões somáticos. Contudo, observações importantes podem ser feitas a partir das análises de expressão desses genes nas condições avaliadas.

A expressão gênica das suspensões celulares L1 e L2 para ambas as sequências analisadas refletiram perfis de expressão diferentes. Esperava-se que os perfis fossem semelhantes, uma vez que os calos de origem foram obtidos simultaneamente e as suspensões foram conduzidas nas mesmas condições experimentais. Tal diferença pode ser explicada devido à heterogeneidade do material vegetal. Tudo indica que as quantidades de células embriogênicas e não embriogênicas foram oscilantes nas amostras coletadas, como verificado nas análises histológicas (Figura 3 e 4). De acordo com Ribas et al. (2011) um material embriogênico mais uniforme é obtido a partir do subcultivo de 7 a 9 meses dos calos embriogênicos. Sendo assim, o subcultivo dos calos antes do início das suspensões celulares pode ser uma alternativa para eliminar o fator de heterogeneidade amostral nas análises de expressão gênica.

### **Conclusão**

As linhagens de suspensões celulares apresentaram aumento da taxa de regeneração em função do tempo de cultivo. Dentre os genes da família LAV, apenas três prováveis ortólogos de *VAL2* foram identificados em *C. arabica*. O potencial embriogênico não possui relação com os níveis de expressão de C15 e

SIC1, mas sugere-se que a expressão de *VAL2* em embriões cotiledonares seja um possível parâmetro para avaliar o bom desenvolvimento de plântulas em protocolos.

## REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n.17, p. 3389-3402, Sept. 1997.
- CARVALHO, C. H. S. et al. Custo de Produção de Mudanças Clonais de Café Arábica Produzidas por Embriogênese Somática. **Embrapa Circular Técnica** 3, 2013.
- CHUGH, A., KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis-recent advances. **Current Science.**, v. 83, p. 715-730, 2002.
- EISEN, M. B. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 25, p. 14863-14868, Nov. 1998.
- GAJ, M. D. et al. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of Arabidopsis. **Planta**, v. 222, p. 977-988, 2005.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568, 1999.
- HACCIUS, B. Questions of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v. 28, p. 74-81, 1978.
- JIA, H.; McCARTY, D.R.; SUZUKI, M. Distinct Roles of LAFL Network Genes in Promoting the Embryonic Seedling Fate in the Absence of VAL Repression. **Plant Physiology**, v. 163, p. 1293-1305, 2013.

JOHANSEN, D. Plant micro techniques. **McGraw Hill Publication**, New York. 1940.

KIKUCHI, A. et al. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. **Planta**, v. 223, n. 4, p. 637–45, mar. 2006.

LEDWON, A.; GAJ M. D. LEAFY COTYLEDON2 gene expression and auxin treatment in relation to embryogenic capacity of *Arabidopsis* somatic cells. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 1677–1688, 2009.

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

MAZAREI, M. et al. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cell suspension cultures: Establishment, characterization, and application. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 181, n. 6, p. 712–5, dez. 2011.

O'BRIEN, T. P. et al. Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, Leipzig, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1965.

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

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

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 1; 29(9): e45, 2001.

R Development Core Team. 2008. **Version 2.6.2: R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

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

RIBEIRO, L. O. **Caracterização de suspensões celulares e obtenção de sementes sintéticas de *Coffea arabica* cv. Catiguá**. 2014. 87 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SILVA, A. T. et al. Characterization of a putative serk-like ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 176-184, 2014.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 12, p. 319-333, 1995.

SHARMA, N. et al. High-level expression of sugar inducible gene2 (HSI2) is a negative regulator of drought stress tolerance in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 170, jan. 2013.

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

STONE, S. L. et al. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 98 p. 11806–11811, 2001.

SUZUKI, M.; WANG, H. H.; McCARTY, D. R. Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. **Plant Physiology**, v.143, p. 902-911, 2007.

SUZUKI, M.; MCCARTY, D. R. Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 548-553, 2008.

TAMURA, K. et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis: software: version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Aug. 2007.

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

THOMPSON, J.D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

TSUKAGOSHI, H.; MORIKAMI A.; NAKAMURA K. Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in arabidopsis seedlings. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 104, p. 2543–2547, 2007.

VAN BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.44, p.4-17, 1996.

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

ZAMARRIPA, A. et al. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. **Café Cacao Thé**, v. 35, n. 4, p. 233-244, 1991.

ZHANG, Y. et al. The Theobroma cacao B3 domain transcription factor TcLEC2 plays a dual role in control of embryo development and maturation. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 106, jan. 2014.

## Tabelas

Tabela 1. *Primers* utilizados na análise de RT-qPCR.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Amplicon (pb)	Eficiência (%)
VAL2 SEA1	F: TTCACCAGAATAGACCCAGAAG R: GGCAAAGGAAGTATCATTACCA	93	91,8
VAL2 C15	F: GAGAGTCTTCTGAAAATGAGCA R: CACTTGATCACCACGAACAG	133	95,2
VAL2 SIC1	F: GCAGAATAGAGCCAGAAGGAAAAG R: CATCCCCGTTGAAGAATATC	116	100,0
24S	F: GACCAATCGTCTTCTTTCCAGAAA R: TCAACTCAGCCTTGAAACATTAG	83	91,0
PP2A	F: ACCTATGGGTGAAATGAAGATGGA R: AGGCGGCGAGATGAATCTTT	80	99,7

Tabela 2. Resumo da ANOVA para a taxa de regeneração de embriões somáticos em duas linhagens de suspensões celulares cultivadas em diferentes tempos de cultivo (60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias).

FV	GL	QM	Pr>Pc
TEMPO	5	4,713	0,000169*
LINHAGEM	1	0,002	0,928555
SUSPENSÃO	2	0,300	0,394311
TEMPO X LINHAGEM	5	0,885	0,064728
LINHAGEM X SUSPENSÃO	2	0,588	0,185424
TEMPO X SUSPENSÃO	10	0,802	0,064216
Erro	10	0,293	
CV(%)	13,24		

\* diferença significativa ao nível de 0,1% de probabilidade.

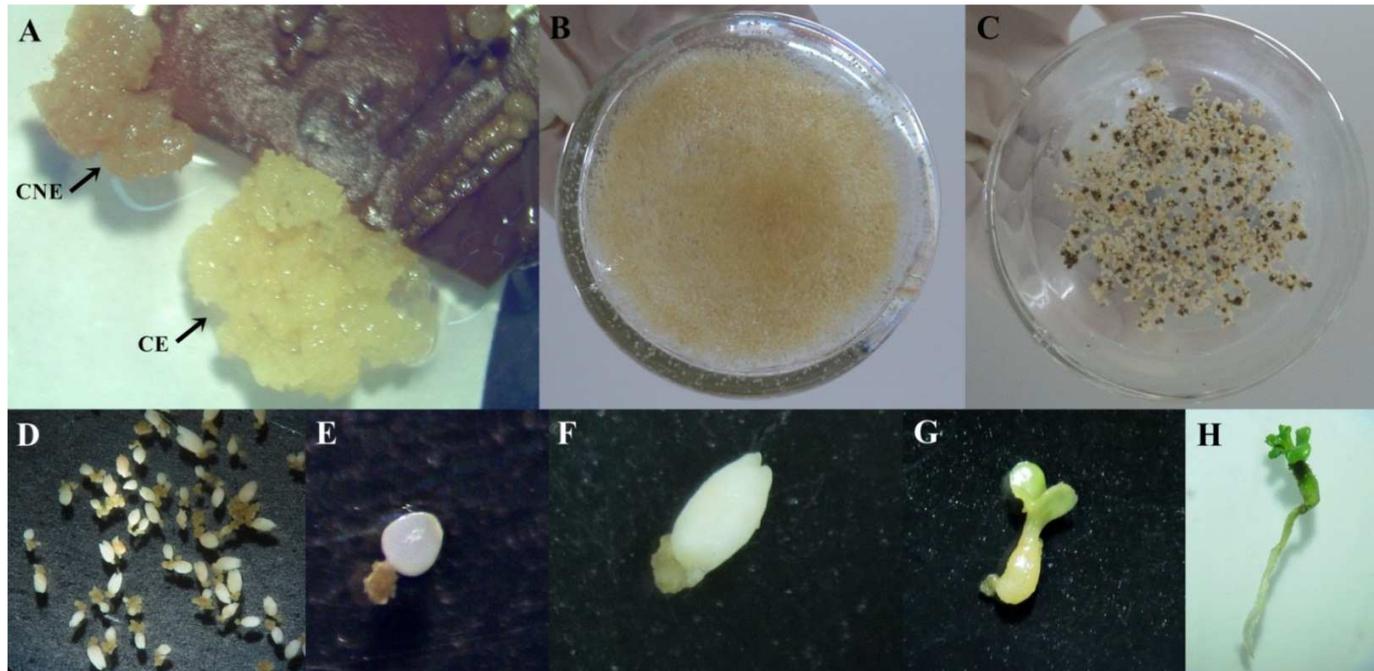
**Figuras**

Figura 1. Indução de calos, estabelecimento das suspensões celulares e regeneração de embriões somáticos durante a embriogênese indireta de *Coffea arabica*. A) CNE e CE; B) suspensão celular: multiplicação de calo embriogênico em meio líquido; C) e D) embriões somáticos regenerados após 75 dias em meio RR; E) embrião globular; F) embrião codiforme/torpedo; G) embrião cotiledonar; H) plântula.

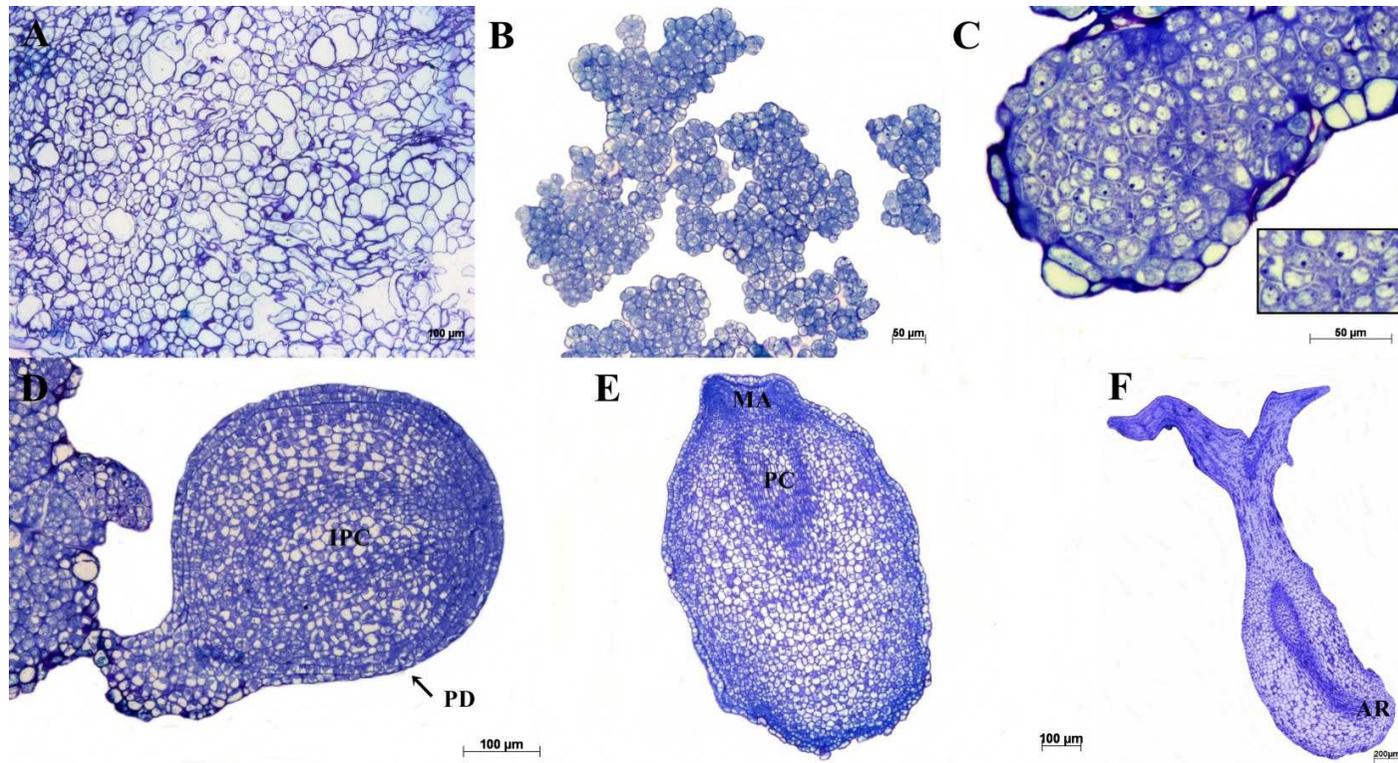


Figura 2. Caracterização histológica de CNE, CE, suspensão celular e embriões de *Coffea arabica*. A) CNE; B) CE; C) suspensão celular; D) embrião globular; E) embrião cordiforme/torpedo; F) embrião cotiledonar. PD = Protoderme; IPC = Início da formação do procâmbio; PC = Procâmbio; MA = Meristema apical; AR = Ápice radicular.

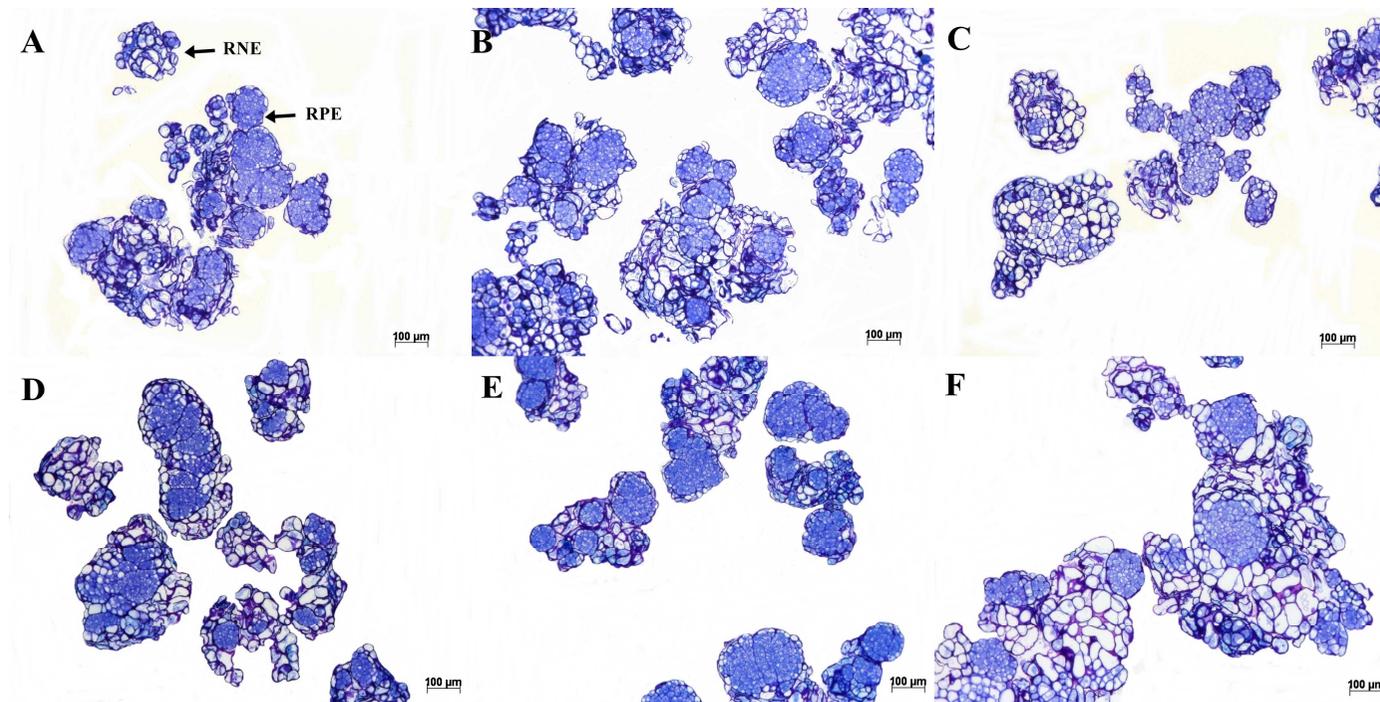


Figura 3. Caracterização histológica das suspensões celulares L1 de *Coffea arabica*. A) 60 dias; B) 90 dias; C) 120 dias; D) 150 dias; E) 180 dias; F) 210 dias. RPE = Região pró-embriogênica; RNE = Região não embriogênica.

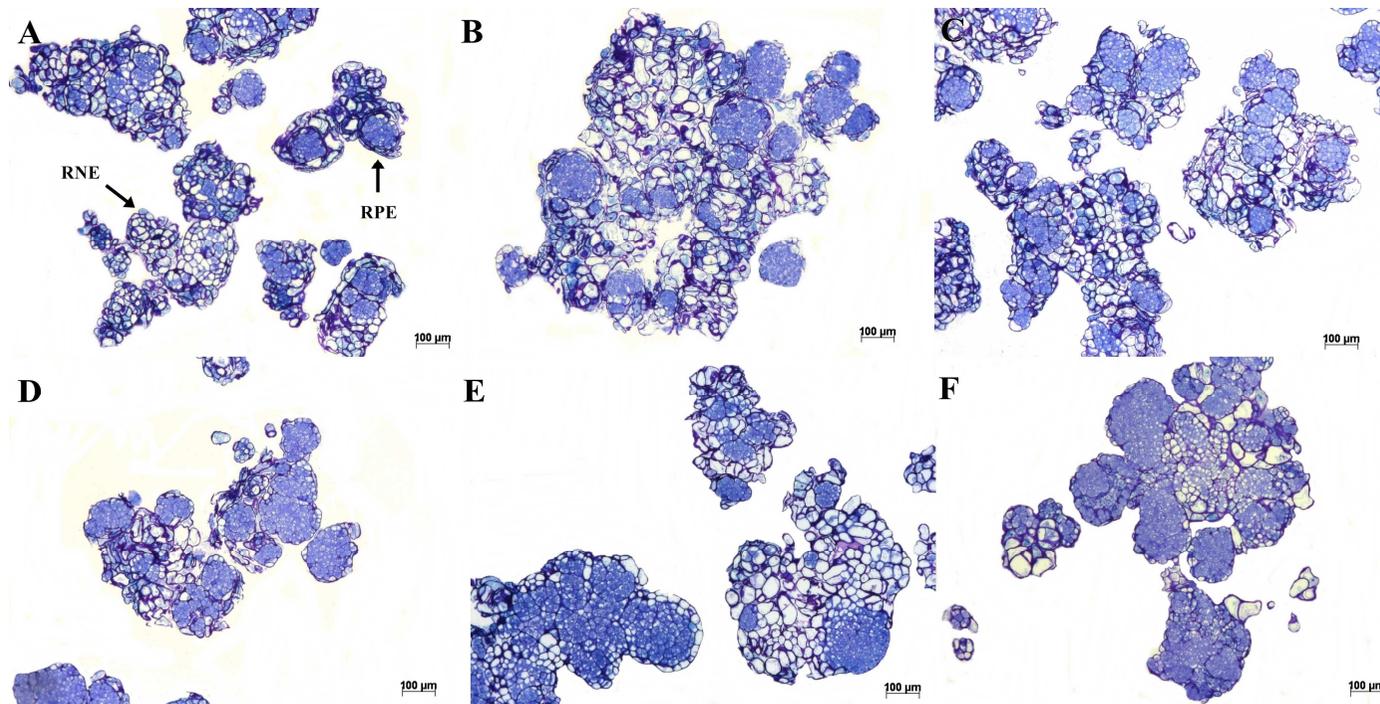


Figura 4. Caracterização histológica das suspensões celulares L2 de *Coffea arabica*. A) 60 dias; B) 90 dias; C) 120 dias; D) 150 dias; E) 180 dias; F) 210 dias. RPE = Região pró-embriogênica; RNE = Região não embriogênica.



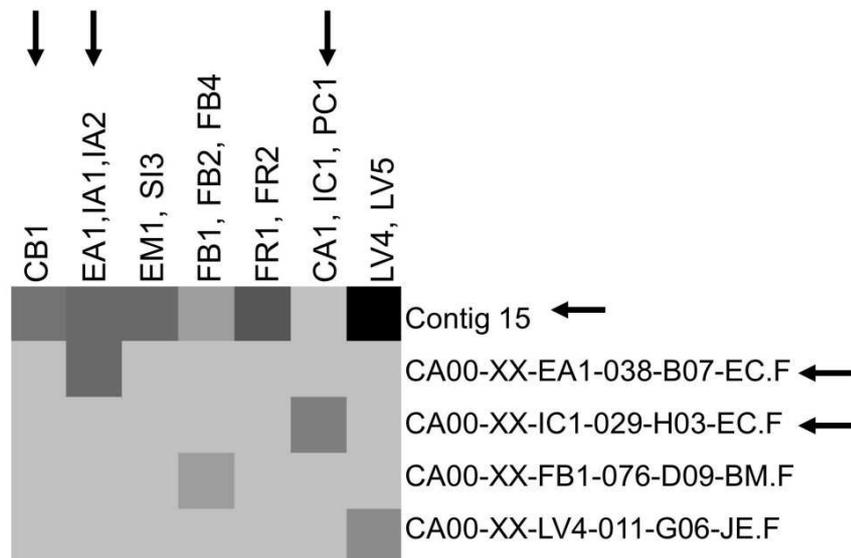


Figura 6. *Northern* eletrônico representando níveis de expressão dos EST-*contigs* e *singlets* nas bibliotecas de café. Quanto mais escuros os tons de cinza, maior a expressão. CB1 – Células em suspensão tratadas com acilbenzolar-*S*-metil e brassinosteróides; EA1, IA1, IA2 – Calo Embriogênico; EM1, SI3 – Sementes germinando (sementes inteiras e embriões zigóticos); FB1, FB2, FB4 – Botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento; FR1, FR2 – Botões florais + frutos chumbinho no 1º estágio + frutos em diferentes estádios; CA1, IC1, PC1 – Calo não embriogênico com e sem 2,4-D; LV4, LV5 – Folhas jovens de galhos ortotrópicos.

```

C15 : ----- : -
SIC1 : ----- : -
SEA1 : ----- : -
AtVAL2 : MESIKVCMNALCGAASTSGEWRKGFMRSGDLASLCKCGCAYEQSIFCEVFKAKESGWRECNCDKRLHCGCIASRFMMELLENGGVTCISCAKRSGLISMNVSHESNGKDFPFSFASA : 119

C15 : -----MAAGLEANVSLTC : 14
SIC1 : ----- : -
SEA1 : ----- : -
AtVAL2 : EHVGSVLERITNLKHLHFQRIDPTHSSSLQMKQESLLPSSLDALRHKFKERKELSAQPNLSISIGPTLMTSPFHDAVDDRSKTNISIFQLAPRSRQLLPKANSAPLAAGMEPSGSLVSC : 238

                                Dominio B3
C15 : LRVARPPVEGRIRKQLLPYWRITDQELRQISGD---ENSTVVELEFELVLSASDAGRIGRIVLPRRCAEAYFPPISSPEGLPLRQDVLGKREWFQFRFPWNNNSRMVLEGVTPCI : 129
SIC1 : -----MLASDAGRIGRIVLPRRCAEAYFPPISSPEGLPLRQDVLGKREWFQFRFPWNNNSRMVLEGVTPCI : 69
SEA1 : -----MLASDAGRIGRIVLPRRCAEAYFPPISSPEGLPLRQDVLGKREWFQFRFPWNNNSRMVLEGVTPCI : 69
AtVAL2 : LRVARPPVEGRIRKQLLPYWRITDQELRQISGD---ENSTVVELEFELVLSASDAGRIGRIVLPRRCAEAYFPPISSPEGLPLRQDVLGKREWFQFRFPWNNNSRMVLEGVTPCI : 357

C15 : QSMQLCAGIIVTFSTRHPECNVMGCRHAAASIM---TCSDFPS-CDKHLSEIPKQSFSSPEFFLPGANLHANSQSALLDSVKGSGVFPFLSALSKHFSAVEFCWHIAEMNGEKILIG : 244
SIC1 : QSMQLCAGIIVTFSTRHPECNVMGCRHAAASIM---SCAPSDCCN-----EEMAGXGYSS-----TCEX : 122
SEA1 : QSMQLCAGIIVTFSTRHPECNVMGCRHAAASIM---SCAPSDCCN-----EEMAGXGYSS-----TCEX : 114
AtVAL2 : QSMQLCAGIIVTFSTRHPECNVMGCRHAAASIM---SCAPSDCCN-----EEMAGXGYSS-----TCEX : 432

                                Dominio Zf-CW
C15 : ITPSPMIVPERKRSRNIGSKSKRLLIDSQDAFELKLSWEELQDMLCPKPCVKTVAIEDHEFEEDQPPVFGKKSIFIMRQSGEQCQACCSCLKWRRLFPVNVLLPPKWTQCEHTWA : 363
SIC1 : APKSIVLVK----- : 131
SEA1 : ----- : -
AtVAL2 : ITPSPMIVPERKRSRNIGSKSKRLLIDSQDAFELKLSWEELQDMLCPKPCVKTVAIEDHEFEEDQPPVFGKKSIFIMRQSGEQCQACCSCLKWRRLFPVNVLLPPKWTQCEHTWA : 551

C15 : LSRPSCSQEDLSEHELESLIKMSKELRKKKIASG-LKSAHEHESDDPGLGNKAVRGDTSGTSAASIAATTKHPRHRAGCSCLVCSQPPSGRGRKRPCTCTNVQMVVRRFKTLMMR : 481
SIC1 : ----- : -
SEA1 : ----- : -
AtVAL2 : LSRPSCSQEDLSEHELESLIKMSKELRKKKIASG-LKSAHEHESDDPGLGNKAVRGDTSGTSAASIAATTKHPRHRAGCSCLVCSQPPSGRGRKRPCTCTNVQMVVRRFKTLMMR : 668

C15 : KKKRQSEREAFLA-QRNKFDWVSKFAEVESYQQIVLEHDSLENHKLKRGSESEFLSQSNKQSEKLEEIGKEQLDENCHEDRENLCQSSSRVSMVSLLPQESLPLQTI----- : 587
SIC1 : ----- : -
SEA1 : ----- : -
AtVAL2 : KRNK---GKAGCQSSQCAQSCQSECRDETEVES---LFAVEIAAG-----ENIDNSDEG-----ASRVSMNRLQAFAFEEAYLKQKAIKNTAGE : 747

C15 : ----- : -
SIC1 : ----- : -
SEA1 : ----- : -
AtVAL2 : QQSSDMVSTEHGSSAAQTEKDTTNGAHDVFN : 780

```

Figura 7. Comparação das seqüências putativas de aminoácidos do *Contig 15*, *Singlet IC1* e *Singlet EA1* com o *VAL2* de *Arabidopsis thaliana*. O alinhamento foi gerado pelo programa Clustal W e exibido pelo GeneDoc. Resíduos de aminoácidos sombreados em preto indicam 100% de similaridade. Os traços inseridos nas seqüências indicam espaços inseridos para a otimização do alinhamento, e a barra preta indica a posição do domínio B3 e a barra pontilhada indica o domínio CW do tipo *zinc-finger*.

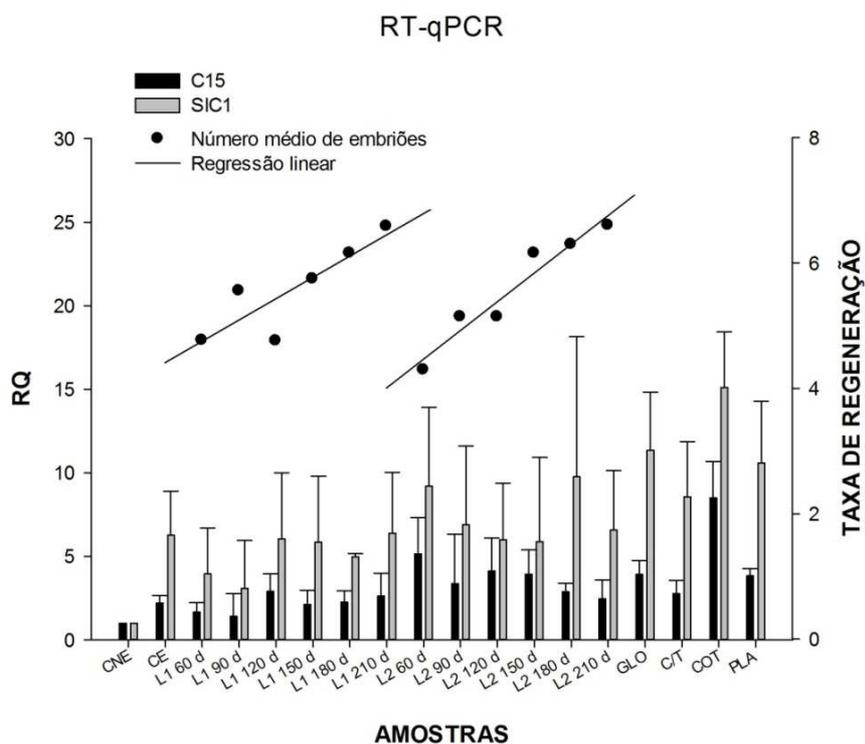


Figura 8. Perfil da expressão quantitativa relativa (RQ), obtido por RT-qPCR, do EST-*contig* C15 e *singlet* CA00-XX-IC1-029-H03-EC.F identificados em bibliotecas de cafeeiro (CAFEST, VIEIRA et al., 2006). As colunas representam a expressão de transcritos gênicos em calo não-embriogênico (CNE), calo embriogênico (CE), linhagens de suspensões celulares (L1 e L2) cultivadas entre 60 e 210 dias, embrião globular (GLO), embrião cordiforme/torpedo (C/T), embrião cotiledonar (COT), plântula (PLA). [Valores de RQ = média de réplicas biológicas e técnicas; controles endógenos = *24S* e *PP2A*; calo não embriogênico (CNE) = amostra de referência (RQ = 1)]; Taxa de regeneração de embriões somáticos obtidos pela diferenciação de suspensões celulares (L1 e L2) cultivadas entre 60 e 210 dias, os valores correspondem ao número de embriões/mg de agregado celular.