



TAMIRES LUANA SILVA

**ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE
Coffea canephora A PARTIR DE SUSPENSÃO DE CÉLULAS
EMBRIOGÊNICAS**

**LAVRAS-MG
2020**

TAMIRES LUANA SILVA

**ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *Coffea canephora* A
PARTIR DE SUSPENSÃO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS**

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

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho
Coorientador

**LAVRAS-MG
2020**

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

Silva, Tamires Luana.

Isolamento e regeneração de protoplastos de *Coffea canephora* a partir de suspensão de células embriogênicas / Tamires Luana Silva. - 2020.

60 p.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Coorientador: Francisco de Assis Alves Mourão Filho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Isolamento de protoplastos de *Coffea canephora*. 2. Embriogênese Somática. 3. CRISPR-Cas9. I. Paiva, Luciano Vilela. II. Mourão Filho, Francisco de Assis Alves. III. Título.

TAMIRES LUANA SILVA

**ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *Coffea canephora* A
PARTIR DE SUSPENSÃO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS**

**ISOLATION AND REGENERATION OF PROTOPLASTS FROM EMBRYOGENIC
CELLS SUSPENSION OF *Coffea canephora***

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

APROVADA em 7 de julho de 2020.

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA-MG

Dr. Breno Régis Santos UNIFAL-MG

Dr. Rodrigo Rocha Latado Instituto Agronômico de Campinas (IAC)- SP

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho
Coorientador

**LAVRAS-MG
2020**

À Deus por iluminar minha vida e colocar em meu caminho pessoas solidárias
Ofereço

Aos meus pais, Carlos e Andréia, pela motivação, companheirismo e carinho
À minha irmã, Mirela
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química pela oportunidade.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de mestrado. À CAPES e ao CNPq.

À ESALQ-USP pelo treinamento teórico-prático que possibilitou a realização desse projeto.

Ao meu ex-orientador, Professor Breno Régis Santos pela solidariedade no momento em que me vi sem rumo e por me apresentar essa universidade e meu atual orientador.

Ao meu atual orientador, Professor Luciano Vilela Paiva, pelo acolhimento, paciência, ensinamentos e pelo desafio de desenvolver esse projeto.

Ao meu coorientador, Professor Francisco de Assis Alves Mourão Filho e ao Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, pela empatia, amparo, ensinamento, colaboração com insumos, por me mostrar qualidades que eu nem imaginava ter e principalmente, por tornar possível a concretização desse trabalho.

Aos amigos Michael, Marcela, Marcelo, Matheus, Laécio, Rafaelli, Wesley, Tatiane, Renan, Camila, Nathaly pela ajuda, receptividade e companheirismo.

À EMBRAPA, em especial Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, pela assistência e disponibilização de material biológico.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), principalmente ao pesquisador Rodrigo Rocha Latado, pela assistência e a colaboração com insumo.

À Professora Sônia Maria de Stefano Piedade, pela colaboração e assistência com análise estatística.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular, em especial aos funcionários, Ricardo, Fabrício, Heliete, Rossilvânia e Bruno pela colaboração e amizade.

À todos os membros dos laboratórios que conheci durante essa caminhada e àqueles que me ajudaram direta ou indiretamente através da amizade e ensinamentos.

À Deus por colocar essas pessoas na minha vida, aos meus pais Carlos e Andréia e minha irmã Mirela, sem o apoio de vocês, nada disso seria possível.

MINHA ETERNA GRATIDÃO!

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir!
Augusto Cury

RESUMO

O fruto do cafeeiro é um produto de alto valor agregado do qual é extraída uma das bebidas mais consumidas mundialmente. Seu alto custo de produção, longo ciclo de cultura e a alta demanda de mercado, atrai investimentos de empresas do setor para o melhoramento genético na busca do desenvolvimento de novos cultivares com características agronômicas desejáveis. Recentemente, a ferramenta de edição gênica CRISPR-Cas9, tem auxiliado melhoristas na geração de genótipos de interesse agronômico através da possibilidade de modificação genética sem inserção de transgenes no DNA hospedeiro, favorecendo a comercialização do cultivar obtido. Contudo, a parede celular vegetal oferece resistência mecânica para o acesso dos componentes do sistema CRISPR ao meio intracelular, sendo necessária a sua retirada das células receptoras (que passam a ser denominadas protoplastos), e posterior desestabilização da membrana plasmática. Além da aplicação da tecnologia CRISPR-Cas 9, os protoplastos também viabilizam estudos de expressão heteróloga e hibridização somática, porém a melhor maneira de explorar o potencial dos protoplastos em pesquisas, é associando-os a um protocolo eficiente de regeneração em plantas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a elaboração de um protocolo eficaz e reprodutível, específico para obtenção e regeneração de protoplastos de café do genótipo diploide ($2n=2x=22$) clone 14 de *Coffea canephora*, visando aplicação de tecnologia molecular de precisão para melhoramento vegetal. Para isso, suspensões de calos embriogênicos de *C. canephora* clone 14 foram selecionadas como material biológico, devido a sua alta capacidade de regeneração em plantas que é o principal fator limitante da técnica. A digestão enzimática da parede celular foi realizada empregando as soluções enzimáticas: 1% celulase, 0,5% driselase e 0,5% pectinase; e 0,5% celulase, 0,5% Macerozima e 0,2% pectinase, as quais apresentaram valores de rendimento e viabilidade, estatisticamente equivalentes. O valor de pH da solução enzimática também foi avaliado neste trabalho, sendo constatado que o pH 5,6 proporcionou maior eficiência enzimática e viabilidade celular simultaneamente. Em seguida, foram realizados testes para otimização da regeneração dos protoplastos, e as células plaqueadas foram submetidas à redução gradativa de pressão osmótica ao longo do cultivo celular. Após 50 dias de plaqueamento, os aglomerados celulares foram transferidos para erlenmeyers onde iniciaram-se os testes em suspensão celular empregando agitação e diferentes meios de cultivo. Também foi observado que as condições de cultivo adotadas não afetaram os aspectos físicos embriogênicos das células, propiciaram a multiplicação dos aglomerados celulares e manteve o potencial embriogênico da cultura. Finalmente, pode-se concluir que o propósito deste estudo foi alcançado com sucesso, porém é preciso que haja continuidade da pesquisa voltada a regeneração de plantas à partir da suspensão celular obtida para que seja estabelecido um protocolo de regeneração completa dos protoplastos de *C. canephora* em plantas, capaz de auxiliar a geração de novos genótipos-elite.

Palavras-chave: CRISPR, melhoramento genético, protoplastos, solução enzimática, pH, regeneração, suspensão celular

ABSTRACT

The coffee fruit is a product of high aggregate value from which one of the most consumed drinks all over the world is extracted. Its high production cost, long crop cycle and high market demand attract strong investment in the sector for crop genetic improvement that aims to develop new cultivars with desirable agronomic characteristics. Recently, the CRISPR-Cas9 gene editing tool has been helped breeders in the generation of genotypes of agronomic interest through the possibility of genetic modification without the insertion of transgenes in the host DNA, simplifying the commercialization of these specimens. Besides to the application of CRISPR-Cas 9 technology, protoplasts also enable studies of heterologous expression and somatic hybridization, but the best way to explore the potential of protoplasts in researches is to associate them with an efficient plant regeneration protocol. Thus, the current work aimed to elaborate an efficient and reproducible method specific for coffee protoplast obtention in the diploid ($2n=2x=22$) genotype clone 14 *Coffea canephora* targeting the application of precision molecular technology for plant breeding. For this, suspensions of embryogenic calluses of *C. canephora* clone 14 were selected as biological material, due to its high capacity of regeneration in plants, which is the principal limiting factor of the technique. Enzymatic digestion of the cell wall was performed using two different enzyme solutions: 1% cellulase, 0.5% driselase and 0.5% pectinase; and 0.5% cellulase, 0.5% Macerozyme and 0.2% pectinase, that showed similar values of performance and viability. The pH value of the enzymatic solution was also evaluated in this work, and it was found that pH 5,6 provided greater enzymatic efficiency and cell viability simultaneously. After, tests were carried out to optimize the regeneration of the protoplasts, and the plated cells were subjected to a gradual reduction in osmotic pressure throughout cell culture. After 50 days of plating, the cell pellets were transferred to erlenmeyers where the tests in cell suspension started using shaking and different means of culture. It was also observed that the cultivation conditions adopted did not affect the physical embryogenic appearance and embryogenic potential, besides favouring cell cluster multiplication. Finally, it can be concluded that the purpose of this study was successfully achieved, but it is necessary to continue research aimed at plant regeneration from the cell suspension obtained in order to establish a complete regeneration protocol for *C. canephora* protoplasts in plants, capable of assisting the generation of new elite genotypes.

Keywords: CRISPR, genetic improvement, protoplasts, enzymatic solution, pH, regeneration, cell suspension

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	ASPECTOS E RELEVÂNCIA DA CULTURA DO CAFÉ	12
2.2	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	14
2.3	POTENCIAL E REQUISITOS DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DOS PROTOPLASTOS	18
2.4	TECNOLOGIA CRISPR: ORIGEM, MECANISMO E APLICAÇÃO.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
3.2	ISOLAMENTO DOS PROTOPLASTOS	31
3.2.1	DIGESTÃO DA PAREDE CELULAR	31
3.2.2	PURIFICAÇÃO DOS PROTOPLASTOS	32
3.2.3	ANÁLISE DE RENDIMENTO E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CÉLULAS VIÁVEIS	34
3.2.4	PLAQUEAMENTO.....	35
3.3	REDUÇÃO DA PRESSÃO OSMÓTICA DO MEIO E TESTES COM DEFERENTES MEIOS DE CULTIVO PARA REGENERAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR	35
3.4	ANÁLISE HISTOQUÍMICA	36
3.5	ANÁLISE CITOQUÍMICA POR MÉTODOS DE DUPLA COLORAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS POTENCIALMENTE EMBRIOGÊNICAS	37
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	45
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	46
8	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE	56

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos mais importantes do setor agrícola brasileiro e consiste na matéria-prima de uma das bebidas mais consumidas mundialmente. O Brasil ocupa posição relevante como maior produtor e exportador mundial, e tem sua produção baseada em duas espécies: *Coffea arabica*, do qual é extraída uma bebida de melhor qualidade, por isso mais valorizada, concentrando cerca de 62% da exportação mundial; e *Coffea canephora*, também conhecida como *conillon* ou robusta, menos suscetível a pragas e doenças, representada por 38% da parcela excedente (EMBRAPA, 2020).

Devido ao alto valor agregado do café no mercado nacional e internacional, há um grande número de investimentos financeiros direcionados a empresas, instituições e consórcios do setor de melhoramento vegetal, como o Consórcio Pesquisa Café coordenado pela Embrapa Café, o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café) coordenado pela UFLA e Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) que buscam o desenvolvimento de novas cultivares cafeeiras com resistência a pragas e doenças, além da melhora na qualidade da bebida extraída (EMBRAPA, 2020, INCT-Café; 2020, INCAPER, 2020).

Considerando o importante papel que diferentes áreas do conhecimento podem trazer ao melhoramento vegetal do café, a biotecnologia vegetal aparece como uma opção viável repleta de ferramentas capazes de auxiliar no êxito da manipulação genética e obtenção de plantas de forma eficiente com características desejáveis, diminuindo a quantidade defensivos agrícolas necessários para o cultivo e propiciando uma produção mais sustentável, uma vez que o desenvolvimento de novas cultivares de interesse agrônomo via melhoramento genético convencional de espécies do gênero *Coffea*, demandam um longo período até chegar a fase de comercialização. Um exemplo disso, é a geração de cultivares de *C. arabica* que leva cerca de 30 anos até a concessão da liberação comercial (CARVALHO *et. al.*, 2013).

Uma maneira recente de realizar a manipulação de características genéticas de interesse é através da utilização de tecnologias moleculares de precisão para transformação de plantas, como a técnica CRISPR-Cas9.

Atualmente, a técnica mais adotada para modificação genética de plantas é a transformação via *Agrobacterium sp.* que também pode ser associada a tecnologias de edição gênica como CRISPR-Cas9, porém em caso de sucesso, tem como desvantagem a formação de uma planta transgênica gerando entraves burocráticos e longo período de análise do organismo

formado, até que seja aprovada a comercialização do produto final (BORTESI, FISCHER, 2015).

A tecnologia de edição genética denominada *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR-Cas9), refere-se a um sistema de repetições palindrômicas curtas, agrupadas e regularmente interespaçadas, associadas a endonuclease Cas9 guiada por RNA. Esse instrumento de edição genética pode induzir mutações em locais programáveis e específicos do genoma, por meio de quebras no DNA e apresenta um grande potencial de aplicação para alteração genética em sequências de DNA alvo, sem a inserção de material genético exógeno em qualquer parte dos cromossomos da célula vegetal. No entanto, apesar de ser considerada uma ferramenta precisa, e o RNA guia ser engenheirado com base em uma ampla variedade de *softwares* de bioinformática capazes de reduzir modificações indesejadas, essa tecnologia também pode provocar mutações genéticas fora da região alvo (*off-targets*). Devido a essa probabilidade de falha, sua atuação deve ser avaliada empiricamente (MALNOY *et al.*, 2016).

Para que o longo período de espera da liberação comercial de uma cultivar melhorada geneticamente seja minimizado, o uso do sistema CRISPR pode ser aplicado em forma de entrega direta do plasmídeo no interior da célula vegetal, modo que requer otimização da sequência promotora para cada organismo a ser alterado, resultando algumas vezes na indução de inserção indesejada de fragmentos de DNA nos locais alvo das células hospedeiras (KIM *et al.*, 2014).

Outra possibilidade para método de entrega direta seria a utilização de ribonucleoproteínas (RNP) que consiste na introdução da proteína Cas9 associada ao RNA guia (sgRNA) no citoplasma celular, que não deixa marcas de DNA exógeno no genoma hospedeiro e tem capacidade de realizar edição genética em menor tempo, quando comparado ao sistema de entrega direta do plasmídeo. Contudo, a parede celular das células vegetais oferece resistência mecânica para o acesso ao interior da célula, sendo necessária a sua retirada das células receptoras (momento em que passam a ser denominadas protoplastos) a fim de proporcionar a entrada dos componentes moleculares preparados para alterar as regiões alvo do genoma celular, através da desestabilização da membrana plasmática (WOO *et al.*, 2015 ; LUO *et al.*, 2015, PARK *et al.*, 2019).

A remoção da parede celular pode ocorrer por meio da digestão enzimática que requer adaptação de numerosas condições de acordo com a espécie e o tecido utilizado, como

combinação e concentração enzimática ideal, luminosidade, temperatura, pressão osmótica, pH, agitação, entre outros fatores (CARNEIRO *et al.*, 1998).

Além da tecnologia CRISPR, os protoplastos podem servir como ferramentas em estudos sobre metabolismo celular, expressão heteróloga, expressão transiente e a produção de plantas com diferentes características de interesse passíveis de comercialização em intervalo de tempo muito inferior ao atual (YOO, CHO, SHEEN, 2007; ZHANG *et al.*, 2011).

O principal obstáculo a ser transposto ao se trabalhar com este tipo de célula, é a regeneração dos protoplastos em plantas, processo dependente de um protocolo genótipo-específico (MATSUMOTO, 2010). Uma forma de aumentar a probabilidade de regeneração de plantas a partir de protoplastos, é através da utilização de material biológico totipotente com alto potencial embriogênico, de modo simultâneo a realização de testes de regeneração empregando alguns dos vários protocolos de embriogênese somática disponíveis na literatura como estratégia para obtenção de plantas regeneradas (OLIVEIRA e PAIS, 1991).

Tendo em vista a disponibilidade de suspensão de calos embriogênicos de *Coffea canephora* no Laboratório Central de Biologia Molecular (UFLA-MG) e a maior facilidade de manipulação genética desta espécie (diploide: $2n=2x=22$) em relação a *Coffea arabica* (tetraploide: $2n=4x=44$, cujo genoma é composto por duas bases genéticas diferentes), este trabalho realizado em colaboração do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (ESALQ-USP), teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo eficiente de isolamento e regeneração de protoplastos a partir de suspensão de calo embriogênico de *Coffea canephora*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS E RELEVÂNCIA DA CULTURA CAFEEIRA

Matéria-prima da bebida apreciada mundialmente, o grão de café compõe grande parte do mercado agrícola brasileiro, uma vez que o Brasil é destaque como maior produtor e exportador mundial do produto. Além do setor primário, o mercado cafeeiro também exerce influência nos setores secundário (processamento do grão) e terciário (exemplo: transporte e comercialização). Assim, o café proporciona condições para crescimento e desenvolvimento socioeconômico através da geração de numerosas oportunidades de emprego, demonstrando desta forma, o motivo de sua importância (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2020; DE OLIVEIRA *et al.*; 2019).

A cafeicultura nacional é baseada em duas espécies: *C. arabica*, concentrando cerca a maior parte da comercialização mundial devido à elevada qualidade da bebida extraída; e *C.*

canephora que complementa a fração remanescente, sendo muito utilizado na forma de *blends* por contribuir para obtenção de uma bebida com densidade mais encorpada, em decorrência a sua maior solubilidade em água (EMBRAPA, 2020; RIBEIRO *et.al*, 2013). Além das espécies *C. arabica* e *C. canephora*, apenas a espécie *Coffea liberica* é explorada comercialmente, apesar do gênero *Coffea* compreender mais de 130 espécies, e mesmo assim sua atuação no mercado é pouco significativa (VILLALTA-VILLALOBOS, GATICA-ATIA; 2019).

As duas principais espécies comerciais de café diferem em sistemas de reprodução e propagação, número de cromossomos (*C. arabica* $2n=4x=44$ e *C. canephora* $2n=2x=22$), base genética (*C. arabica* é um híbrido espontâneo entre *Coffea canephora* Pierre e *Coffea eugenioides* L.), origem, ciclo, porte da planta, tipo e tamanho das cerejas e dos grãos, exigência nutricional, tolerância à seca, pragas, doenças e nematóides, constituição bioquímica dos grãos, qualidade da bebida, entre outros; por isso a cultura dessas espécies requer diferentes cuidados além de apresentarem um custo de produção elevado (FERRÃO *et al.*, 2007; LASHERMES *et al.*, 1999).

As variedades de *C. canephora* tem como características a alogamia, autoincompatibilidade gametofítica e floração sincronizada, favorecendo naturalmente a polinização cruzada, aumentando fluxo gênico, a frequência de heterozigose e altas taxas de polimorfismos. No Brasil distribuem-se principalmente nos estados do Espírito Santo, Rondônia e Bahia (FERRÃO *et al.*, 2007; PARTELLI *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013). Integrando a espécie *C. canephora* estão duas variedades botânicas caracteristicamente distintas e comercialmente cultivadas (BATISTA-SANTOS *et al.*, 2011; DAVIS *et al.*, 2006): a variedade botânica Robusta, que possui crescimento ereto, maior tamanho de folhas, maturação tardia, menor tolerância ao déficit hídrico e maior resistência a doenças e pragas, e a variedade Conilon, apresentando maturação precoce dos frutos, folhas alongadas, maior tolerância à seca e maior suscetibilidade à pragas e doenças (MONTAGNON *et al.*, 2012; FERRÃO *et al.*, 2007; PARTELLI *et al.*, 2011).

Analisando a ampla variedade de características agronomicamente desejáveis, é possível constatar que o genoma da espécie *C. canephora* configura uma fonte rica de informações genéticas a serem exploradas, atraindo investimentos financeiros na área de melhoramento genético para obtenção de novas cultivares produtivas e resistentes. Além disso, a espécie também apresenta como fator favorável ao sucesso de alteração genética em práticas moleculares relacionado a diferença e menor complexidade de sua base genética em

comparação a espécie *C. arabica* que foram demonstradas por Cenci; Combes; Lashermes (2011).

Outra razão para a busca de cultivares melhoradas geneticamente, está no alto custo da produção de café relacionado, entre outros aspectos, a ocorrência de estresses bióticos e abióticos, custos operacionais da colheita manual ou mecânica, longo ciclo da cultura e a necessidade de vários anos de produção para avaliar condições adversas a produtividade, logo, o melhoramento genético torna-se uma via altamente vantajosa desejáveis pois possibilita manipulações genéticas programáveis em menor tempo quando comparado ao melhoramento convencional (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido associadas à criação de novas cultivares de café não só pela capacidade de auxiliar na manutenção e avaliação de germoplasma, como na multiplicação de genótipos elites de cafeeiros (BERTRAND *et al.*, 2011; ABDIN *et al.*, 2017).

Entre as técnicas de cultura de tecidos utilizadas para análises genômicas, está o isolamento e regeneração de protoplastos que, apesar de ser aplicada há mais de 30 anos, como mostra Pietrzak *et al.* (1986), durante muitos anos foi pouco empregado em decorrência da sua complexidade relacionada principalmente a necessidade de protocolos genótipo-específicos e a dificuldade de regeneração em plantas, que pode ser minimizada pela associação á embriogênese somática. Recentemente, o isolamento de protoplastos vegetais tem sido utilizado com maior frequência, como ferramenta versátil para análise de expressão transiente envolvendo tecnologia CRISPR-Cas9, que se refere a um sistema de mutação genética de precisão em que a endonuclease Cas9 guiada por RNA causa quebras nas fitas de DNA em locais programáveis e específicos do genoma alvo (OLIVEIRA E PAIS, 1991; YOO, CHO, SHEEN, 2007).

2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como uma técnica de cultivo asséptico de células vegetais, tecidos, órgãos, embriões, protoplastos ou sementes em meio nutritivo (composto por macro e microelementos, vitaminas, ácidos orgânicos e inorgânicos) sob condições ambientais controladas (temperatura, umidade, fotoperíodo, luz, nutrientes) afim de fornecer um ambiente ideal para o crescimento vegetal (BRIDGEN; VAN HOUTVEN; EECKHAUT, 2018).

Apesar de ser considerada simples, esta técnica requer treinamento e educação para compreensão e planejamento a respeito do que pode ser realizado para alcançar os resultados desejados. A cultura de tecidos é um método especialmente vantajoso para melhoramento de plantas e também pode ser aplicada para obtenção e propagação de clones (micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro*); eliminação de doenças; cultura de anteras/pólen para a produção de plantas haplóides; isolamento de protoplastos; produção de metabólitos secundários de interesse comercial; seleção e mutação celular; estudos em anatomia fundamental da planta, desenvolvimento e nutrição; biotecnologia vegetal; embriogênese somática; produção de sementes sintéticas; cultura de calos; e cultura de flores (BRIDGEN; VAN HOUTVEN; EECKHAUT, 2018; BEDNAREK; ORŁOWSKA, 2019; LOYOLA-VARGAS, OCHOA-ALEJO, 2018).

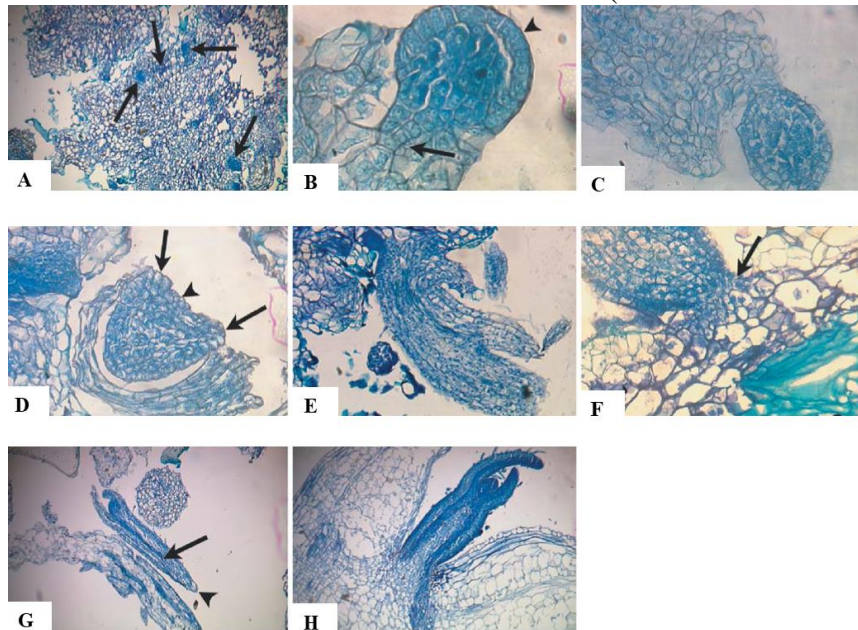
O fundamento central da cultura de tecidos vegetais é a totipotencialidade celular, que em outros termos, implica na capacidade de qualquer célula da planta originar um novo indivíduo, uma vez que a célula contém toda a informação genética necessária à regeneração completa de outra planta (PEREIRA *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Genericamente, as células mantidas em condições de cultivo *in vitro* podem expressar sua totipotência através de duas maneiras que são: organogênese, pela indução de meristemas caulinares e/ou radiculares, diferenciando-se em caules e raízes, respectivamente; e embriogênese somática, que estimula a formação de embriões somáticos, seguindo as fases do embrião zigótico, sem que haja fecundação (SEGURA, 1993; GUEDES, 2008). É importante destacar que existem diferenças nas respostas morfogênicas *in vitro* entre gêneros e espécies de uma mesma família. Além disso, dentro da mesma espécie, também são encontradas divergências significativas entre as respostas obtidas de subespécies e cultivares, de forma que uma única formulação do meio de cultura para o crescimento da planta seja frequentemente ineficiente para gerar morfogênese em todas as variedades vegetais (LITZ, 1993 apud GUEDES, 2008).

A embriogênese somática no café pode ser realizada mediante dois processos de desenvolvimento: a embriogênese somática direta, na qual os embriões são formados diretamente das células somáticas dos tecidos matrizes, sem passarem pela transição de estágios intermediários do calo; e indireta, onde os embriões somáticos originam-se de calos, uma massa celular com crescimento desorganizado que neste caso, podem apresentar células em diferentes estádios de diferenciação. A opção da embriogênese somática indireta é a mais promissora para o café (DE OLIVEIRA, 2019; PEREIRA *et al.*, 2007).

Em ambas vias, o embrião somático segue o mesmo padrão de desenvolvimento do zigótico, passando pelos estágios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA *et al.*, 1999). Tais estágios podem ser observados através de análises histológicas como mostrado na Figura 1.

Figura 1: Análise histológica mostrando as características dos diferentes estágios do desenvolvimento de embrião somático de batata (*Solanum tuberosum* L.)



Legenda: A- Corte de explante (segmento nodal) em processo de embriogênese somática com zonas meristemáticas aparentes (setas) caracterizadas por células de citoplasma denso e núcleos intensamente corados. B- Embrião globular com protoderme visível (ponta de seta) e estrutura de um suspensor (seta). C- Embrião somático de forma globular tardia. D- Embrião somático cordiforme contendo primórdios de cotilédone (setas) e região meristema apical em diferenciação (ponta de seta). E- Um embrião somático em estágio torpedo. F- Tecido vascular do explante e um embrião somático em desenvolvimento isolado (seta). G- Um embrião somático com extremidade basal fechada (ponta de seta) contendo sistema vascular (seta). H- Seção transversal de broto axilar, mostrando uma conexão vascular bem desenvolvida com o explante de origem.

Fonte: SHARMA, MILAM (2004).

Segundo Vieira & Kobayashi (2000), reguladores de crescimento (fitorreguladores) são compostos chaves para indução da formação dos diferentes aspectos entre esses dois padrões de desenvolvimento embriogênico. Os fitorreguladores são compostos sintéticos que exercem efeitos próximos a hormônios (substâncias naturais) em vegetais, auxiliando na adaptação e diferenciação dos tecidos durante o cultivo *in vitro* (PINHAL *et al.*, 2011). Entre as categorias de reguladores frequentemente utilizados estão as giberelinas, auxinas e citocininas, ácido abscísico e seus análogos. Porém, seus inibidores também podem contribuir positivamente, em determinados casos (BRIDGEN; VAN HOUTVEN; EECKHAUT, 2018).

Em *Coffea arabica*, a embriogênese somática direta é alcançada pelo cultivo dos explantes (folhas) em apenas um meio de cultura, com adição somente de citocininas, enquanto a indireta necessita de alta relação auxina/citocinina para a formação de calos não diferenciados em um meio de cultura inicial e baixa relação, para a indução de calos embriogênicos durante culturas consecutivas. Através deste exemplo, fica demonstrado o papel fundamental das auxinas e citocininas na embriogênese somática de *C. arabica* juntamente com a necessidade de variação da concentração desses estimulantes sintéticos de acordo com o objetivo a ser atingido (PEREIRA *et al.*, 2007).

Para espécie *C. canephora*, Hatanaka *et al.* (1991), analisaram diferentes categorias de reguladores de crescimento isoladamente durante cultivo discos foliares e constatou que a presença de citocininas (2 i-P, BAP, cinetina) em meio Yasuda (1985) na concentração de 5µM, proporcionou a formação de grande número embriões, sendo essa considerada como a melhor classe de fitorreguladores, entre as avaliadas.

No processo de embriogênese somática indireta, os calos embriogênicos podem ser cultivados em meio sólido ou líquido, quando recebem a denominação de suspensões celulares embriogênicas. Para algumas espécies, suspensões celulares têm sido frequentemente relacionadas a probabilidade de instabilidade genética levando á variação somaclonal. Essa alteração genética pode resultar em modificações fenotípicas ocasionadas por rearranjos genômicos, gerando plantas diferentes da matriz. Logo, apesar da ocorrência da variação somaclonal ter sido demonstrada em baixas taxas para espécies *Coffea arabica*, a possibilidade de sua eventual existência deve ser analisada durante a propagação de plantas, uma vez que pode levar à perda de fidelidade genética (BEDNAREK; ORŁOWSKA, 2019).

A variação somaclonal ocorre principalmente como resposta a estresses (como ausência de luz, exposição prolongada a reguladores de crescimento ou outros) impostos às células durante cultura, na forma de metilação do DNA, rearranjo cromossômico e mutações pontuais. Portanto, a avaliação da qualidade em termos de similaridade genética da progênie faz-se relevante para produção de plantas obtidas por meio de cultivo *in vitro* (BEDNAREK; ORŁOWSKA, 2019).

Um fator relevante durante a embriogênese somática é a fonte de carbono utilizada durante a cultura celular que tem objetivo de suprir as necessidades metabólicas, atuando na geração de energia ou nos diversos processos biossintéticos requeridos para a diferenciação e crescimento celular (LEIFERT *et al.*, 1995). Os carboidratos também tem participação importante na manutenção da osmolaridade adequada do meio de cultura e promoção do

crescimento embrionário (HU; FERREIRA, 1998). A concentração de açúcares no meio de cultura também influencia na absorção de nutrientes, no efeito de reguladores de crescimento e produção de metabólicos secundários, importantes para os processos metabólicos e composição da parede celular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

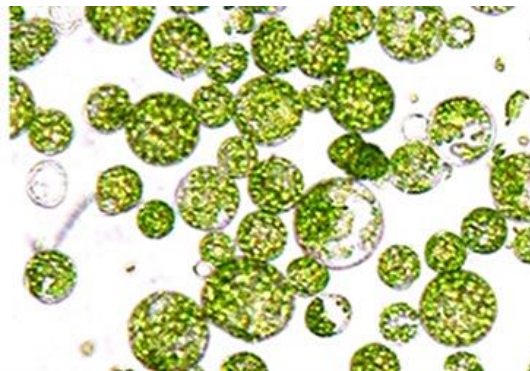
Fuentes *et al.* (2000) relataram que durante a embriogênese somática direta, fontes de carboidratos como frutose, maltose e glicose podem influenciar significativamente na produção de embriões somáticos de *C. canephora* e apresentar rendimento superior a sacarose (comumente utilizada em meio de cultivo) de acordo com o genótipo adotado.

Em conhecimento das informações apresentadas, este trabalho buscou empregar técnicas de cultura de tecidos associadas a protoplastos e embriogênese somática indireta afim de estabelecer um protocolo eficiente para isolamento e regeneração de protoplastos explorando diferentes fontes de carboidratos como estímulo de indução de embriões, com o objetivo de futuramente, utilizá-lo como ferramenta para estudos moleculares relacionados a biotecnologia vegetal por meio de transformação genética de plantas e análise de expressão transiente.

2.3 POTENCIAL E REQUISITOS DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS

Os protoplastos vegetais são células vegetais desprovidas de parede celular (FIGURA 2) e constituem uma ferramenta versátil para execução de experiências envolvendo análises moleculares *in vivo* de construções gênicas (expressão transiente), e metabolismo celular, auxiliando, desta forma, a realização de estudos tais como aqueles relacionados à expressão gênica, metabolismo celular, reprogramação celular e melhoramento genético (por hibridização somática) (DAVEY, 2005; YOO; CHO; SHEEN, 2007; PASTERNAK *et al.*, 2020).

Figura 2: Protoplastos isolados a partir do mesofilo de *Arabidopsis*.



Fonte: WU *et al.* (2009).

Devido à grande dificuldade de regeneração destas células e à necessidade de elaboração de protocolos específicos para cada genótipo, o isolamento de protoplastos foi pouco adotado durante anos por pesquisadores da área de melhoramento genético. No entanto, em decorrência do surgimento da tecnologia CRISPR-Cas9, a aplicação desta técnica foi retomada para ensaios de eficiência de construções gênicas engenheiradas através de *softwares* para estudos envolvendo bioinformática. Desta forma, os protoplastos tornaram-se instrumentos para realização de análises rápidas *in vivo* de expressão transiente, detecção de alteração genética em regiões indesejadas do DNA alvo (*off-targets*), análise funcional de genes, além da transformação genética buscando características de interesse agrônomo e comercial (YOO; CHO; SHEEN, 2007).

O sistema CRISPR associado ao estudo de protoplastos também pode ser empregado com o objetivo de gerar um organismo modificado geneticamente e livre de DNA exógeno, por meio da introdução de plasmídeo ou ribonucleoproteínas (RNPs), no qual utiliza-se uma solução contendo polietilenoglicol (PEG) que desestabiliza a membrana celular e favorece a passagem destas macromoléculas para o interior da célula vegetal possibilitando a edição gênica do material genético alvo (BERNARD *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2016). Ao método de inserção de plasmídeo ou RNPs em protoplastos é dado o nome de transfecção de protoplastos, e tem como atrativo a capacidade de viabilizar a obtenção de organismos indistinguíveis dos gerados via melhoramento convencional ou mutagênese classificados como não-GM (geneticamente modificados), tal qual previsto no regulamento emitido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança através da normativa número 16, de 15 de janeiro de 2018 (HARTUNG E SCHIEMANN, 2014; RAN, LIANG, GAO, 2017; CTNBio, 2018).

Este tipo de manipulação genética resultante em organismos não-GM, é uma opção altamente vantajosa e configura um grande avanço para os melhoristas vegetais, uma vez que a técnica de modificação genética de plantas mais amplamente utilizada na atualidade é transformação via *Agrobacterium sp.* que, em casos de êxito, sempre acarreta na origem de organismos transgênicos, e portanto, necessitam passar por processos burocráticos lentos, com baixa aceitação pelo consumidor final (MALNOY *et al.*, 2016).

A tecnologia de transformação de protoplastos também oferece outras vantagens quando comparada a técnicas comumente empregadas para transformação de genoma nuclear, a exemplo da maior probabilidade de obtenção de plantas transformantes. Além da edição genética, a transfecção de protoplastos também pode proporcionar a introdução de moléculas capazes de integrar fragmentos de DNA exógeno no genoma celular via recombinação

homóloga, dessa forma, esta técnica torna-se importante e de grande valia para melhoristas vegetais devido a possibilidade de viabilizar a inserção do fragmento genético de interesse em locais específicos do DNA celular (KOOP *et al.*, 1996).

O isolamento de protoplastos é influenciado por numerosos fatores, tais como genótipo, estado fisiológico das células, tipo, concentração e tempo de digestão de enzimas, estabilizadores osmóticos, densidade da suspensão, composição do meio de cultivo, pH, agitação, luminosidade e temperatura (CARNEIRO *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2002). Logo, para o desenvolvimento e otimização de um protocolo de isolamento de protoplastos, é preciso considerar todos esses fatores e ajustá-los conforme a necessidade do material biológico de interesse, de modo a estabelecer condições para a otimização do melhor rendimento possível de células ao final do processo.

O estado fisiológico, por exemplo, é um fator extremamente importante quando pretende-se regenerar os protoplastos obtidos, uma vez que o material utilizado para isolamento das células é fundamental para que este objetivo seja alcançado, e aspectos como idade, temperatura, intensidade luminosa ou fotoperíodo afetam o perfil metabólico celular (MAHESHWARI *et al.*, 1986).

Oliveira e Pais (1991) indicam que calos ou suspensões celulares embriogênicas constituem sistemas adequados para a obtenção de protoplastos, em consequência da maior capacidade de regeneração de plantas por embriogênese somática, além disso podem reduzir de 4 a 6 meses o processo de formação de embriões. É relevante ressaltar que células em suspensão celular podem perder o potencial embriogênico ao longo do tempo, portanto é ideal que o material biológico embriogênico esteja em pleno vigor. VAN BOXTEL, BERTHOULY (1996) demonstraram que suspensões celulares embriogênicas de algumas variedades de *Coffea canephora* ainda apresentavam alta frequência de regeneração, mesmo decorridos dois anos a partir do início do cultivo (idade aproximada do material utilizado neste trabalho para isolamento dos protoplastos), contudo a ocorrência de variação somaclonal não foi avaliada.

Análises feitas em plantas regeneradas de protoplastos derivados de folhas de citrus, mostraram que a ausência de potencial embriogênico celular pode estar associado ao seu DNA mitocondrial. Esta hipótese foi levantada com base em estudos moleculares após a regeneração de células de folhas não sofrer morfogênese nas condições-padrão de cultivo. No entanto, posteriormente a uma hibridização somática interespecífica com células embriogênicas, algumas plantas regeneradas apresentaram genoma nuclear do genitor não-embriogênico e o

mtDNA do genitor embriogênico (CARVALHO,SENA, 2007, MOREIRA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2004).

Outra condição que exerce influência na viabilidade de protoplastos isolados é o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), liberadas durante a degradação da parede celular. Para mitigar os efeitos nocivos em espécies vegetais com alta concentração de substâncias oxidantes; enzimas como superóxido dismutase, catalase e outros antioxidantes (polivinilpirrolidona-PVP) podem ser incluídos junto a solução enzimática (RATANASANOBOON; SEATON, 2013).

Para execução da primeira etapa do isolamento de protoplastos é necessário que a parede celular seja removida. O processo de remoção da parede celular pode ocorrer através de digestão enzimática que pode utilizar diferentes combinações de enzimas catalíticas capazes de hidrolisar os componentes da parede celulósica; ou por métodos mecânicos, como ultrassom, mas com menor intensidade devido à baixa eficiência (MATSUMOTO, 2010).

A digestão enzimática da parede celular é a primeira etapa do isolamento de protoplastos e deve ser realizada em meio líquido com pH que favoreça a ação enzimática sem prejudicar a viabilidade celular. Para manter a estabilidade do pH do meio são utilizados tampões de ácido 2-N- morfolinoetanossulfônico (MES) que garantem a viabilidade celular durante a atividade enzimática. O principal cuidado nesta etapa reside na pressão osmótica capaz de manter a integridade dos protoplastos liberados, uma vez que sem a resistência mecânica proporcionada pela parede celular, as células podem ter a membrana plasmática rompida em casos de alta pressão de turgor (TORRES *et al.*, 1998, CASTRO, 2002, AUGUSTO, 2015).

A condição osmótica é ajustada com uso de estabilizadores osmóticos que podem ser metabolicamente inertes, como o manitol e sorbitol, ou metabolicamente ativos à exemplo da glicose e sacarose. Estas últimas substâncias fornecem condições favoráveis para regeneração dos protoplastos pois diminuem gradualmente a força osmótica do meio extracelular ao serem metabolizadas pelas células ao longo do processo (EVANS e BRAVO, 1983). A concentração do estabilizador osmótico é determinada empiricamente para que os protoplastos sejam mantidos na condição esférica ideal adotada quando submetidos a um meio hipertônico (SMITH, 1977). Molaridades inferiores podem resultar na lise celular, enquanto a alta concentração desses estabilizadores pode levar à redução do tamanho dos protoplastos por plasmólise; inibindo a regeneração da parede celular (BENGOCHEA e DODDS, 1986;

AUGUSTO, 2015). Geralmente, a concentração do estabilizador osmótico utilizada é próxima a 13% (p/v), ou seja, em torno de 0,6 a 0,7M (SMITH, 1977, AUGUSTO, 2015).

Em alguns casos, previamente a digestão celular, os explantes são submetidos a um tratamento inicial denominado pré-plasmólise, que consiste na imersão do material de interesse numa solução de potencial osmótico reduzido. Assim, ocorre uma diminuição da pressão de turgor das células e uma separação entre a membrana plasmática e a parede celular (FERRANDO e SPIESS, 2001). Esta exposição tem como finalidade evitar choque osmótico durante o processo de isolamento.

O tipo e concentração de enzimas presentes nas soluções enzimáticas também são determinantes para isolamento de protoplastos, pois apesar da parede celular dos vegetais apresentarem os mesmos constituintes básicos, a sua composição é amplamente variável entre espécies, idade e tecidos vegetais (CARNEIRO *et al.*, 1998).

Um protocolo eficiente para o isolamento destas células deve conter uma solução composta por enzimas como celulase, pectinase, macerozima, hemicelulase ou driselase para que haja digestão total da parede celular, a qual consiste numa complexa mistura de celulose, hemicelulose, pectinas e menores quantidades de minerais, proteínas, lipídeos, fenóis e enzimas (DAVEY *et al.*, 2005; CARNEIRO *et al.*, 1998).

Em uma abordagem mais aprofundada sobre os componentes da parede celular, é possível notar que as pectinas representam uma família de polissacarídeos altamente complexa, rica em ácido galacturônico, incluindo homogalacturonanos, ramnogalacturonanos I e galacturonanos. Estes compostos são altamente hidratados e os primeiros a serem sintetizados durante a formação da parede celular primária. Outro componente importante da parede celular é a hemicelulose. Estas moléculas atuam como ligantes de polissacarídeos que agregam a celulose, formando uma forte e resiliente estrutura. Outro polímero presente em grande quantidade na parede vegetal é a celulose que é composta por glicose e sintetizada por grandes complexos de membrana que secretam microfibrila na superfície da célula, semelhante a um fio de aranha. Para proteção das células vegetais, todos os componentes da parede celular são integrados por interações físicas e reações de *crosslinking* (COSGROVE, 2005).

Através do conhecimento da constituição da parede a ser digerida, é possível estabelecer quais enzimas serão mais apropriadas para uma digestão total, além de orientar a composição de meio nutritivo para regeneração da parede celular.

Dentre as enzimas anteriormente citadas empregadas na retirada da parede vegetal, as pectinases possuem atividade poligalacturonásica e são responsáveis pela decomposição da

lamela média, além da matriz da parede primária. Já as celulases, compostas por hemicelulase, β -1,4-glucanase, quitinase, lipase e nuclease; catalisam a reação de degradação das hemiceluloses. Outra proteína catalítica interessante é a driselase, a qual desempenha simultaneamente atividade celulásica e pectinásica, sendo aplicada com sucesso no isolamento de protoplastos vegetais (CHAWLA, 2010 apud AUGUSTO, 2015).

Uma importante observação é que enzimas comerciais apresentam impurezas em sua composição, como nucleases, proteases, lipases, fenóis e sais, que podem ser inativadas por meio da incubação enzimática em banho-maria, além de melhorar a solubilidade e eficiência das enzimas presentes na solução (YOO *et al.*, 2007). Em contrapartida, alguns dos contaminantes citados podem beneficiar o processo de isolamento de protoplastos. Sendo assim, o efeito favorável ou prejudicial das impurezas sobre o rendimento de células isoladas deve ser avaliado empiricamente (CANHOTO, 2010).

Estudos também relataram que a presença de cálcio e fósforo na solução enzimática confere estabilidade a membrana dos protoplastos recém-isolados (CARNEIRO, 1998). Devido a isso, sais de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) ou dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) tem sido adicionados a solução de isolamento de protoplastos.

A digestão enzimática e o cultivo inicial dos protoplastos ocorrem no escuro afim de manter a viabilidade celular evitando assim, uma possível degeneração na presença de luz. Esta ausência de luz é mantida até a formação de calos (CARVALHO, SENA; 2007).

O período de incubação enzimática durante o isolamento é uma outra condição que varia de acordo com o tecido e o genótipo testado, como demonstrado por Augusto (2015), e deve ser testado empiricamente.

Schöpke *et al.* (1987), descrevem o sucesso do isolamento de protoplastos de *Coffea canephora* à partir de embriões, quando utilizaram uma solução enzimática composta por 2% de celulase, 1% de driselase e 1% de pectinase.

Outro cuidado a ser tomado durante o isolamento de protoplastos é a baixa velocidade de rotação para homogeneização da solução enzimática, uma vez que sem a parede celular, as células não possuem uma proteção física contra choques mecânicos, e podem ter a membrana plasmática facilmente rompida (MATSUMOTO, 2010).

Mesmo depois da adequação das condições necessárias a digestão da parede celular, eventualmente ocorre a formação de resíduos durante a digestão enzimática da parede celular e rompimento de algumas células, nestes casos pode ser necessária a realização de uma purificação afim de remover as enzimas e os *debris* presentes na solução garantindo a

viabilidade das células (TORRES *et al.*, 1998). Sendo assim, após o período de incubação enzimática, a solução resultante é filtrada, depois submetida a centrifugação em baixa rotação com duas soluções formando um gradiente de densidade para que as células fiquem concentradas na interface das duas soluções (TORRES *et al.*;1998; AUGUSTO, 2015). Posteriormente, a banda interfásica contendo os protoplastos é retirada cuidadosamente com auxílio de pipeta e inoculada em meio de cultura sólido, líquido ou semi-sólido, onde inicia-se o processo regenerativo.

Após a etapa de purificação, é necessário verificar viabilidade das células isoladas, bem como checar se houve a digestão total da parede celular. Para isso, são realizados alguns testes de viabilidade como adição do corante Azul de Evans e Fenolosafranina, seguido de observação em microscópio óptico. Protoplastos intactos excluem os corantes, enquanto protoplastos não íntegros são permeáveis a ele. Porém, a maior prova de viabilidade das células está na regeneração da parede celular e nas consecutivas divisões celulares. A contagem do número de células é feita em câmara de Neubauer. (KANAI e EDWARDS, 1973; KARUNARATNE e SCOTT, 1981).

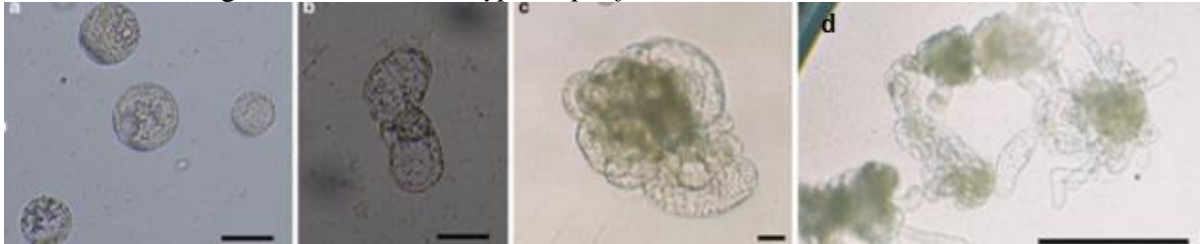
Geralmente, os protoplastos iniciam a síntese da parede celular imediatamente ao plaqueamento, no entanto, ainda necessitam de proteção osmótica até que as estruturas primárias da parede celular sejam formadas, o que neutraliza a pressão de turgor exercida pelo citoplasma, desfavorecendo a divisão celular. A pressão de turgor tem função de alongar a parede celular, aumentar sua porosidade e fornecer um gradiente de energia para conduzir a distribuição de polímeros durante a formação da parede celular e deve ser reduzida gradativamente, conforme a regeneração da parede celular (CASTRO, 2009; COSGROVE, 2005).

A regeneração da parede celular acontece sob condições propícias ao crescimento das células, que necessitam de densidade adequada para que haja divisão celular. Isso ocorre devido a fatores de crescimento, incluindo aminoácidos no meio ao seu redor (DAVEY *et al.*, 2005). Cada espécie apresenta uma densidade mínima de plaqueamento e em altas densidades, a absorção de nutrientes e excreção liberada pelas células tem capacidade de modificar significativamente o meio de cultura afetando o desenvolvimento celular. Em grande parte das espécies a densidade ótima situa-se entre $10^5 - 10^6$ cél/ ml (CARNEIRO *et al.*, 1998, EVANS e BRAVO, 1983, DAVEY *et al.*, 2005, TORRES *et al.*, 1998).

A embriogênese somática é um método viável para regeneração de plantas (FIGURA 3) e segue um padrão de desenvolvimento quando plaqueados em meio de cultivo sob

condições nutritivas adequadas, passando pela fase de regeneração da parede celular, formação de *clusters* celulares (colônias), formação de calos (no caso de cultivo em meio sólido), indução de embriões e por último, regeneração de plantas (HOSOI, MARUYAMA, 2016). Nesta etapa a composição do meio de regeneração difere entre os genótipos e é determinada empiricamente (DAVEY *et al.*, 2005).

Figura 3: Etapas do processo de regeneração de protoplastos isolados a partir de tecidos embriogênicos de *Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.



Legenda: a- protoplastos isolados; b- células em divisão; c- formação de colônias; d- início de alongação de células do suspensor (a,b,c = barras 50 μ m; d= 1 mm).

Fonte: HOSOI, MARUYAMA (2016).

2.4 TECNOLOGIA CRISPR: ORIGEM, MECANISMO E APLICAÇÕES

Desenvolvida através da observação e estudo do sistema imunológico de procariontos, a tecnologia CRISPR é uma ferramenta recente de manipulação genética que possibilita a modificação do genoma de forma direcionada e eficiente (WOLTER; SCHINDELE; PUCHTA, 2019).

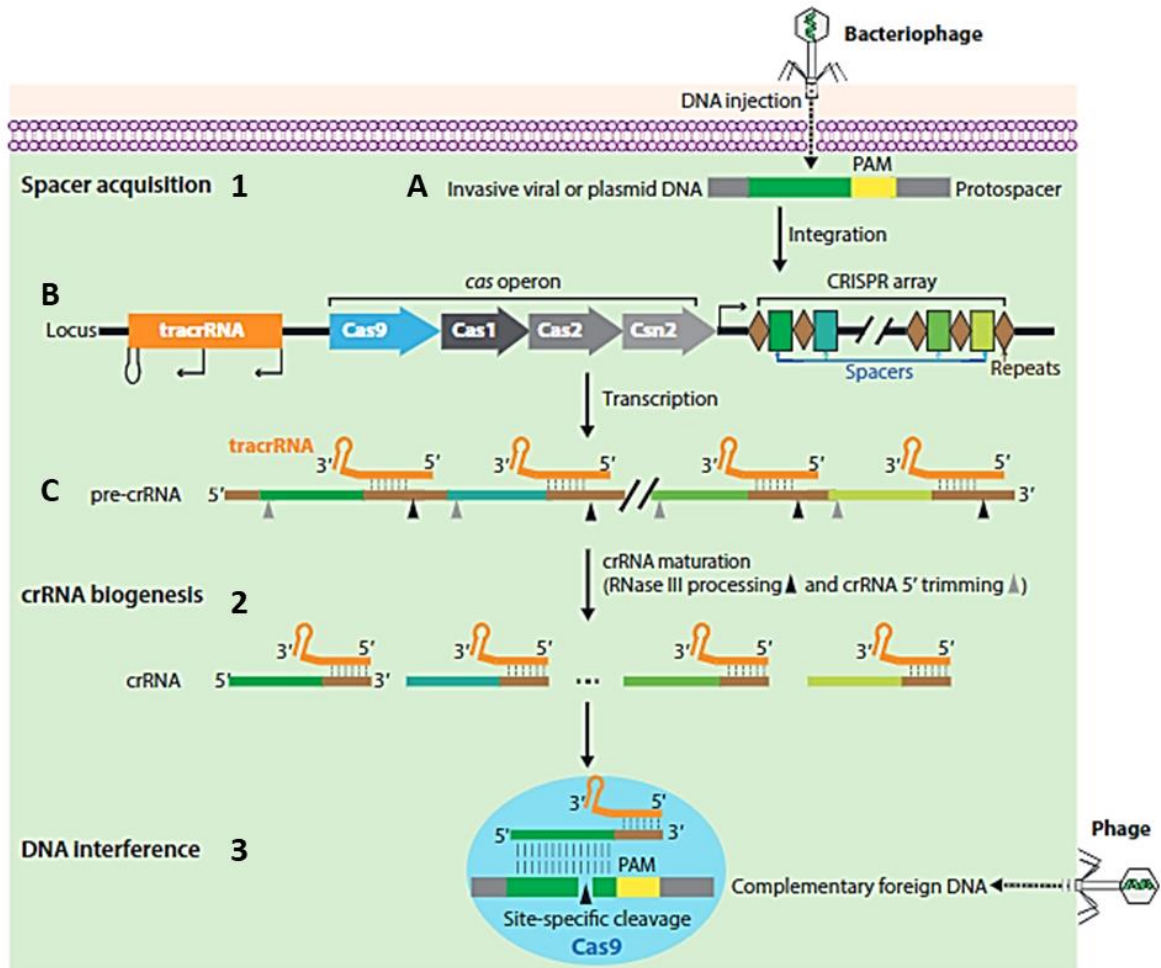
Este mecanismo foi elucidado e classificado em diferentes tipos à partir da observação do genoma de *Streptococcus pyogenes*. Nesse material genético, foram identificadas pequenas repetições palindrômicas agrupadas e regularmente interespaçadas, as quais originaram o nome da técnica, CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Na reação imunológica natural do procarionto estudado, foi demonstrado que elementos genéticos exógenos de bacteriófagos ou plasmídeos, quando em contato com bactérias, desencadeavam um processo de síntese de diferentes enzimas denominadas Cas. Estas proteínas tem a capacidade de clivar o DNA invasor e inserir parte dele (chamado espaçador), no *locus* CRISPR, do genoma procariótico entre repetições palindrômicas diretas (JINEK *et al.*, 2012). Desta forma, o sistema CRISPR permite o reconhecimento de vias distintas exclusivas para cada tipo de invasor, através de um RNA não codificante (crRNA), que apresenta região complementar ao DNA exógeno (DELTCHEVA *et al.*, 2011; JINEK *et al.*, 2012).

No complexo CRISPR tipo II, este RNA é transcrito a partir da matriz CRISPR na forma de um RNA único (pré-crRNA). Este transcrito é processado pela enzima RNase III, responsável pela maturação dos crRNAs que são frequentemente constituídos por uma

sequência de 20 nucleotídeos, e tem a função de direcionar o sítio de clivagem da enzima. Antes do processamento, os ribonucleotídeos anelam-se com a sequência *trans-activating* RNA (tracrRNA) e pós maturação, ligam-se à endonuclease Cas9 (DELTCHEVA *et al.*, 2011; JINEK *et al.*, 2012).

Após a ligação com o complexo de RNA, a enzima Cas9, opta pela conformação ativa e sofre rearranjos em seus dois lóbulos para a formação de um canal central. Desta forma, a endonuclease envolve a dupla fita de DNA em busca da sequência *proto-adjacent motif* PAM (NGG). Consecutivamente, há a hibridização RNA guia-DNA. Com a identificação da região PAM pelo domínio proteico PI, os quatro nucleotídeos sequenciais *upstream* a esta região, interagem com a cadeia complementar para criar um *loop* de bloqueio fosfato e desestabilizar o material genético a ser clivado. O grupo fosfato conecta-se com o *loop* de bloqueio orientando o DNA ao pareamento de bases com a região semente (8–12 pb) de um sgRNA (nome dado ao guia produzido sinteticamente- *single guide*). Assim, a fusão do DNA local à frente (1-2 pb) da PAM é ativada formando o híbrido RNA-DNA. Na etapa final do mecanismo de clivagem do material genético de interesse, os domínios HNH e RuvC da nuclease Cas9, rompem as cadeias de DNA complementares e não complementares, respectivamente, à partir do terceiro nucleotídeo da região PAM, como mostrado na Figura 4 (BELHAJ *et al.*, 2013; HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

Figura 4: Mecanismo de funcionamento do sistema CRISPR em procarioto



Legenda: 1- A- Aquisição de sequência espaçadora pela injeção de DNA exógeno (viral invasivo ou plasmidial), B- integração da sequência espaçadora na região crispr, C- transcrição de todo o *locus* crispr dando origem ao pré-crRNA (RNA crispr) e anelamento dos tracrRNAs (*trans-activating*) no RNA transcrito; 2- Biogênese dos crRNAs e maturação dos crRNAs através do processamento da RNase III e corte dos crRNAs no sentido 5'; 3- Clivagem do material genético exógeno após nova infecção: a proteína Cas9 reconhece a sequência alvo pela complementariedade desta com o RNAGuia e cliva o material genético exógeno a partir do quarto nucleotídeo *upstream* a região PAM.

Fonte:JIANG, DOUGNA (2017).

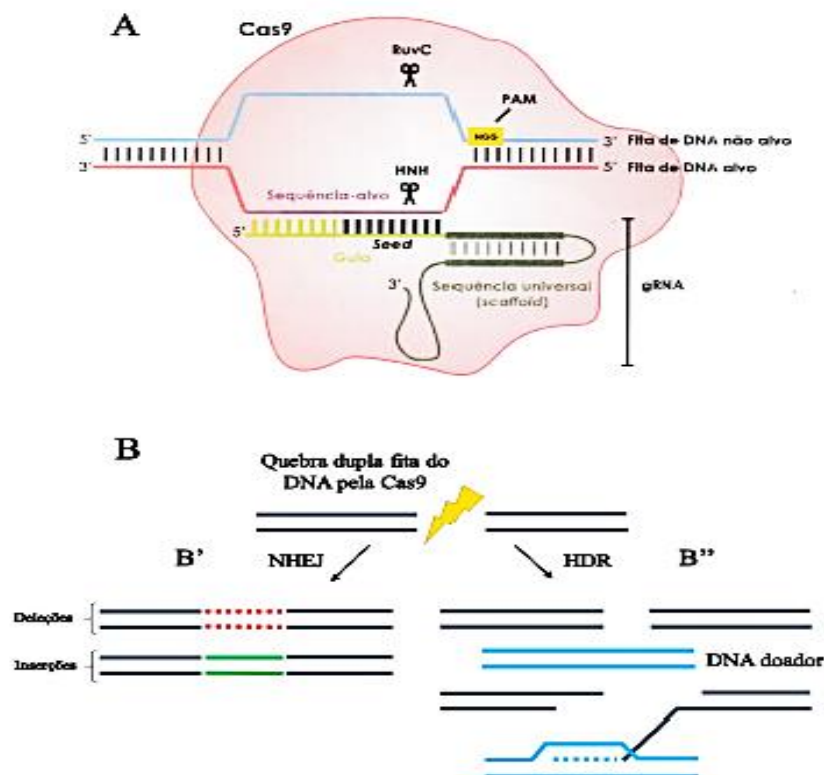
Com a compreensão do funcionamento do sistema CRISPR-Cas 9 e realização de estudos empíricos, foi possível estabelecer a necessidade de três elementos essenciais para reprodução deste mecanismo imunológico procarioto, em células eucariontes. São eles: a enzima Cas9, RNA guia e o tracrRNA (BERNARD *et al.*, 2019).

Sabendo que este viés de mutação tem capacidade de alteração de múltiplos alvos simultaneamente de modo eficiente e direcionado, o aparato de defesa bacteriana tornou-se uma ferramenta de integração, edição e deleção genética altamente vantajosa (BERNARD *et al.*, 2019). Apesar do elevado grau de eficiência, esta técnica não está isenta de falhas, e

ocasionalmente, pode editar regiões genômicas indesejadas (*off-targets*) quando estas são complementares ao RNA guia. A mutação de tais regiões fora do alvo pode ser minimizada empregando algoritmos de bioinformática para a identificação de RNA guias únicos (TSAI *et al.*, 2015).

Para aplicação desta tecnologia em células vegetais, são utilizados plasmídeos contendo sequência codificante dos componentes CRISPR (RAN, LIANG, GAO, 2017); que ao romperem as regiões sementes, desencadeiam dois tipos de mecanismos comuns de reparo de DNA celular. Um deles é reparo por homologia direcionada (*Homology Direct Repair-HDR*), em que ocorre o reparo preciso no local da quebra da dupla-fita de DNA na presença da fita complementar a região clivada (endógena ou exógena) sem perda de informação genética; e o outro é a união das extremidades não homólogas (*Non-homologous End Joining-NHEJ*), propensa a erros podendo causar inserção, exclusão ou troca de nucleotídeos, levando à modificação do gene nos locais alvo e perda da informação genética original (VIEIRA, 2019). O processo de reconhecimento, clivagem e reparo da região alvo submetida ao aparato CRISPR pode ser observado na Figura 5.

Figura 5: Esquematisação da clivagem de DNA pela enzima Cas9 e sistemas de reparo do material genético



Fonte: VIEIRA (2019).

Em espécies arbóreas, mais especificamente com o cafeeiro, os registros de experiências de manipulação genômica ainda são muito limitados, porém, recentemente Breitler *et al.* (2018), Freitas (2019) e Casarin (2020) demonstraram que o método CRISPR / Cas9 pode ser utilizado para a edição gênica em cafeeiro e que também é preciso considerar a via regeneração das células modificadas, afim de não inviabilizar o desenvolvimento e obtenção do vegetal modificado.

A tecnologia de edição gênica no café pode proporcionar a introdução de características de interesse agrônômico em genótipos de café elite de forma rápida e direcionada, além do desenvolvimento de novas cultivares portadoras de resistência a pragas e doenças, tolerância à seca, frio e boa qualidade da bebida. Estas características nem sempre são incorporadas com sucesso por técnicas tradicionais de reprodução (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2015).

Um protocolo eficiente de utilização da tecnologia CRISPR/Cas9 no café, tem capacidade de acelerar a pesquisa e criação de novas variedades. Encurtar o tempo necessário para introduzir características de interesse é particularmente atraente para a melhora de espécies lenhosas uma vez que possuem longo ciclo de vida, conseqüentemente, um longo período para gerar uma nova cultivar melhorada e lançá-la comercialmente (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016; OSAKABE *et al.*, 2016, BREITLER *et al.*, 2018).

Uma outra via de transformação genética rotineiramente adotada, é *Agrobacterium*. O emprego deste método insere T-DNA do plasmídeo procarioto nos vegetais, resultando sempre em organismos transgênicos. Alguns vetores foram desenvolvidos para fornecer o sistema CRISPR / Cas9 aos genomas de plantas através desta técnica (XING *et al.*, 2014).

Para acelerar a aplicação deste sistema a uma variedade de espécies de plantas sob condições normais (introgressão de características) ou complexas (mutação direcionada de genes pela inserção de T-DNA), um dos meios empregados é o sistema de entrega direta de macromoléculas como RNPs ou indireta, no caso de utilização de plasmídeos, em protoplastos. Esta alternativa vem sendo aplicada em algumas espécies, como por exemplo, em videira e *Solanum tuberosus* (MALNOY *et al.*, 2016; ANDERSSON *et al.*, 2018).

Contudo, para que esta entrega seja viável, é necessário que exista um protocolo eficiente e reprodutível de isolamento e regeneração dos protoplastos em plantas, maior desafio deste trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Como fonte de células para isolamento dos protoplastos foram utilizadas suspensões celulares que já estavam disponíveis no Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA-MG (LCBM), e foram obtidas a partir de folhas jovens do clone 14 de *Coffea canephora* mantido em casa de vegetação. As folhas foram desinfestadas segundo Freitas (2019), em álcool 12% durante 1 minuto e, posteriormente, solução de hipoclorito de cálcio a 2,4%, com adição de 5 gotas de tween 20 durante 10 minutos, e por fim, três lavagens em água destilada autoclavada por 10 minutos cada. Os explantes permaneceram na água da última lavagem até o momento da excisão dos explantes. Com o auxílio de bisturi, foram cortados fragmentos foliares de aproximadamente 1 cm² de modo a incluir a nervura central. O material foi então, inoculado em meio Yasuda (1985) com adição de 3 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 50 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de ágar, cultivadas à temperatura 27°C sob ausência de luz. Os explantes foram transferidos para novos meios de cultivo na mesma composição a cada 30 dias. Quando os calos embriogênicos atingiram um tamanho equivalente a 3 mm (cerca de 8 meses depois), foram transferidos para cultivo em 50 ml de meio Yasuda líquido (1985) contendo 50 g L⁻¹ de sacarose e 3 mg L⁻¹ de BAP, na concentração de 10 g L⁻¹ de massa celular e mantidos na ausência de luz, a 27°C, com agitação orbital de 110 rpm. A renovação de 100% do meio de cultivo passou a ser realizada a cada três semanas. A idade da suspensão celular embriogênica utilizada era de aproximadamente dois anos (FIGURA 6). A suspensão celular formada à partir de calos embriogênicos de *Coffea canephora* clone 14, utilizada neste trabalho já estava disponível em laboratório antes dos experimentos iniciarem, logo a indução dos calos embriogênicos à partir de folhas, não foi feita pela autora.

Figura 6: Suspensão celular embriogênica estabelecida a partir de calos embriogênicos de *C. canephora* clone 14



Fonte: Autora (2020).

3.2 ISOLAMENTO DOS PROTOPLASTOS

3.2.1 DIGESTÃO ENZIMÁTICA DA PAREDE CELULAR

Para o isolamento de protoplastos, a referência adotada foi o protocolo de Mourão Filho (1995), com modificações. Foram utilizadas placas de Petri estéreis não tratadas (Corning®-430589) nas dimensões 60 x15 mm contendo 2 ml de meio de cultura BH3 filtro esterelizado acrescido de 0,7 M dos estabilizadores osmóticos (sacarose e manitol), pH 5,6. Adicionou-se, aproximadamente, 500 mg de massa de células drenadas obtidas a partir de suspensão celular de calo embriogênico de *Coffea canephora*. A molaridade do meio de cultura de 0,7 M foi selecionada devido aos resultados satisfatórios. Em seguida, com auxílio de pipeta de Pasteur (vidro) autoclavável de aproximadamente 2 ml contendo algodão na extremidade superior (afim de evitar contaminação da solução em caso de contato com a tetina) foram acrescidos, gota a gota, em cada placa de Petri, um volume final de 2 ml de solução enzimática das combinações 1 ou 2 (TABELA 1).

Tabela 1: Combinações e concentrações enzimáticas utilizadas para avaliação de isolamento de protoplastos de *Coffea canephora*.

Combinações enzimáticas	1	2
Celulase - Yakult	1%	0,5%
Driselase- Duchefa	0,5%	-
Macerozima R-10- Yakult	-	0,5%
Pectinase E.C.1.15	0,5%	0,2%
de <i>Aspergillus niger</i> - Sigma		
Referência	SCHÖPKE <i>et al.</i> (1987)	MOURÃO FILHO (1995)

Fonte: Autora (2020).

As soluções enzimáticas foram preparadas conforme as combinações representadas na Tabela 1, porém com o dobro da concentração enzimática descrita acima, em volume de 20 ml de solução composta por 0,7 M manitol, 24,5 mM CaCl₂, 0,92 mM NaH₂PO₄ e 6,15 mM MES, com pH 5,6. Em seguida, tais soluções foram filtro esterelizadas e armazenadas em recipiente estéril, e mantidas a 4°C.

Durante a digestão enzimática da parede celular, o pH é um dos fatores que interfere na viabilidade dos protoplastos obtidos, além de afetar a eficiência da solução enzimática. Portanto, é necessário que pH da solução de digestão forneça condições adequadas a atividade das enzimas, de modo a proporcionar o isolamento do maior número possível de células sem causar prejuízos a viabilidade dessas (TORRES *et al.*, 1998, CASTRO, 2002, AUGUSTO, 2015). Sendo assim, neste trabalho também foram feitos testes, afim de avaliar qual valor de

pH oferecia condições de melhor eficiência e viabilidade simultaneamente. Para isso, foram feitos três experimentos avaliando o pH da solução enzimática em valores de 5,6; 6,0 e 6,5, simultaneamente.

Durante as etapas seguintes, na manipulação dos protoplastos, a extremidade da pipeta que entra em contato com as soluções deve sempre ser checada; pois, caso esteja quebrada ou lascada, há risco de rompimento da membrana plasmática dos mesmos. Para cada uma das combinações citadas na Tabela 1, realizaram-se 3 experimentos com duas repetições cada.

Posteriormente, as placas contendo as soluções foram vedadas com *parafilm* e armazenadas por 16 horas em ausência de luz à 27°C com agitação orbital de 50 rpm. Após este período, as placas de Petri foram observadas em microscópio invertido para verificação da digestão da parede celular e nível de turgescência do protoplastos isolados.

3.2.2 PURIFICAÇÃO DOS PROTOPLASTOS

A purificação dos protoplastos também foi conduzida seguindo protocolo descrito por Mourão Filho (1995).

No processo de purificação dos protoplastos é necessário muito cuidado para não realizar movimentos bruscos durante a manipulação da placa contendo as soluções enzimáticas, uma vez que sem a parede celular as células ficam desprovidas de proteção mecânica. Em ambiente estéril em câmara de fluxo, as placas de Petri possuindo os protoplastos foram vagarosamente agitadas utilizando uma superfície de apoio, e o conteúdo de 2 placas (~ 1g de material biológico) foi vertido em malha de nylon 45 µm utilizando como suporte uma placa de Petri de vidro grande autoclavada, para que o material sólido não digerido fosse separado da solução enzimática onde os protoplastos e meio de cultivo estavam inclusos (FIGURA 7A).

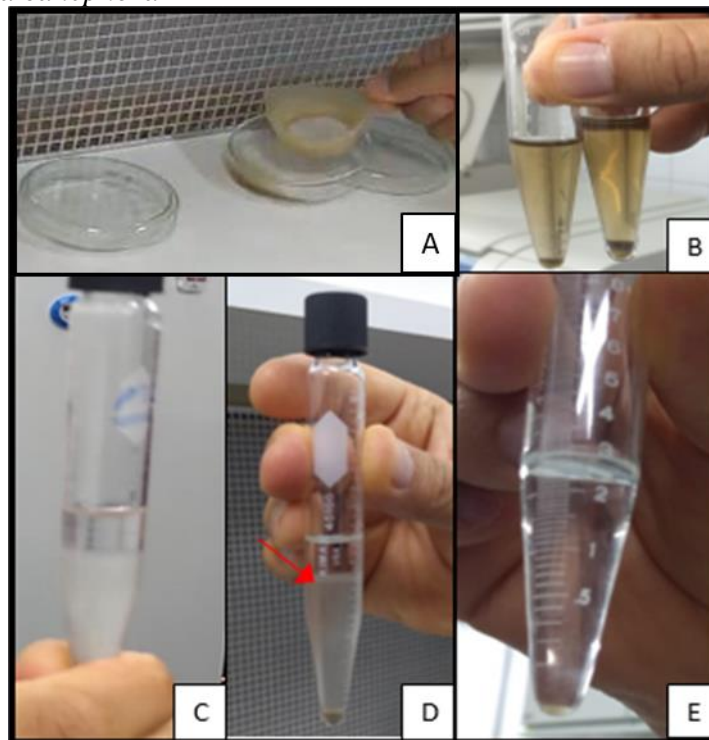
O filtrado foi transferido com auxílio de pipeta de Pasteur estéril para um tubo de vidro autoclavável de 15 ml e submetido a centrifugação em centrífuga contendo rotor basculante com sistema de desaceleração desligado (marca Becton Dickinson, Clay Adams Brand Dynac II Centrifuge, modelo 420103), a 100g por 6 minutos (FIGURA 7B). O período de centrifugação é variável de acordo com o volume utilizado; sendo, em média, um minuto por mililitro com adição de dois minutos ao tempo de centrifugação.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e, vagarosamente, 5 ml de meio CPW (FREASON *et al.*, 1973), contendo 25% (p/v) sacarose foi adicionado utilizando a parede interna do tubo como apoio para escoamento do meio líquido. A solução foi homogeneizada cuidadosamente para ressuspensão do *pellet*, e logo em seguida acrescentou-se lentamente 2 ml

de CPW 13% manitol para que não houvesse mistura entre as duas soluções formando assim, um gradiente de concentração e densidade (FIGURA 7C). O tubo foi fechado e, novamente, submetido à centrifugação a 100g por 9 minutos à 27°C.

Finalizada a centrifugação, foi observada a formação de uma banda interfásica levemente esbranquiçada, entre duas soluções, onde estavam concentrados os protoplastos (FIGURA 7D). Em ambiente estéril, a banda foi coletada com auxílio de pipeta de Pasteur e transferida para outro tubo. Posteriormente, em torno de 3 a 4 ml de meio de cultura BH3 0,7M foram misturados ao volume contendo a banda coletada, e o novo tubo foi levado pela última vez a centrífuga na mesma configuração anterior por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido (FIGURA 7E) ressuspenso devagar, em 0,5 a 1 ml de meio BH3 0,7M, de modo que a quantidade de precipitado formado fosse diluída numa proporção entre 1:10.

Figura 7: Etapas de purificação dos protoplastos isolados a partir de suspensão embriogênica de *Coffea canephora*



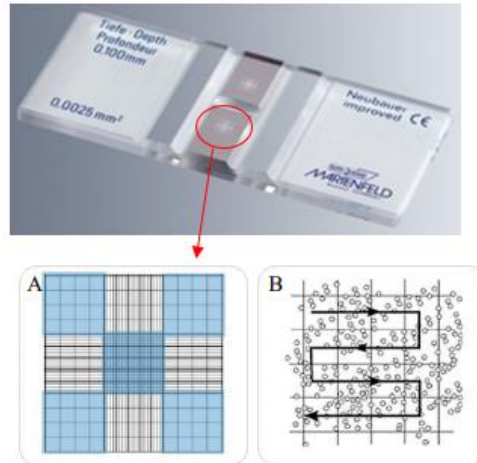
Legenda: A-Primeira etapa da purificação de protoplastos: filtração da solução enzimática em malha de nylon estéril 45µm, contendo protoplastos isolados de *Coffea canephora*; B- *Pellet* de protoplastos e resíduos obtidos após a primeira centrifugação do filtrado coletado em ‘A’; C- *Pellet* formado em ‘B’ ressuspenso, após descarte do sobrenadante, em 5 ml de solução CPW 25% sacarose (levemente branco), com posterior, adição de 2 ml de solução CPW 13% manitol (translúcido); D- Seta indicando a banda interfásica formada após centrifugação (100g por 9 minutos), contendo protoplastos purificados; E- *Pellet* de protoplastos purificados, obtido à partir da coleta da banda interfásica mostrada em ‘D’ com adição de 3 ml de meio de cultura BH3 0,7M. Após descarte do sobrenadante formado, o material biológico (*pellet*) está pronto para ressusensão em meio de cultivo apropriado e para o plaqueamento das células na proporção de diluição de 1:10 (p :v).

Fonte: Autora (2020).

3.2.3 ANÁLISE DE RENDIMENTO E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CÉLULAS VIÁVEIS

Após a ressuspensão dos protoplastos isolados e purificados é necessário retirar uma alíquota das amostras (neste caso, 0,1 ml) para verificação da concentração de células obtidas ao final do processo (cél/ml), bem como o rendimento (R) de células obtidas por massa celular inicial, que vai permitir avaliar a eficiência do tratamento testado. Simultaneamente, também deve ser analisado a viabilidade celular que pode ser observada através da adição de corante azul de Evans (0,1%) (1:1) alíquota da amostra/corante. A avaliação do resultado é simples: células coradas indicam rompimento da membrana plasmática celular, logo, a célula corada é considerada inviável; células sem formato definido também são consideradas inviáveis; enquanto células viáveis (C.V.) não são coradas e apresentam formato esférico bem definido (AUGUSTO, 2015). A determinação da concentração celular é feita após a contagem das células em câmara de Neubauer através do preenchimento do espaço entre a câmara de contagem e a lamínula utilizada para observação das células em microscópio. A metodologia de contagem em câmara de Neubauer é demonstrada na Figura 8.

Figura 8: Câmara de Neubauer e malha interna visualizada em microscópio



Legenda: **A**-Representação da malha da câmara de Neubauer; **B**- orientação para contagem de células (quadrado azul ampliado).

Fonte: AUGUSTO (2015).

A concentração de células por mililitros de solução foi determinada através do seguinte cálculo:

$$\text{Cél/ml} = \frac{\text{total de protoplastos contados nos quadrados azuis} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{\text{número de quadrantes}}$$

Determinação do rendimento do isolamento celular:

$$R = \frac{\text{número de protoplastos isolados}}{\text{massa inicial de material vegetal}}$$

Determinação do percentual de células viáveis:

$$\% \text{ C.V.} = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número total de células}} \times 100$$

3.2.4 PLAQUEAMENTO

O plaqueamento das células foi realizado segundo protocolo de Mourão Filho (1995).

A qualidade do processo de purificação foi observada através da análise de 2 gotas do material ressuspensionado colocado no centro de uma placa de Petri 60 x 15 mm estéril não tratada. Logo após, as placas foram vedadas e levadas para observação em microscópio invertido, sendo possível verificar a eficiência do processo de purificação dos protoplastos devido à baixa quantidade de resíduos celulares. Em seguida, para cada placa contendo 2 gotas de material ressuspensionado, em ambiente estéril, foram adicionados 2 ml de meio de cultura BH3 0,7M, gota a gota, pelas laterais do círculo formado pelas células na região central da placa de Petri.

Além do meio BH3 0,7M, foram testados mais dois meios de cultivo para avaliar a regeneração da parede celular dos protoplastos isolados. Neste caso, o meio de cultivo BH3 0,7M foi substituído por ½ MS (Murashige & Skoog, 1962) (metade da concentração de nutrientes) 0,7M ou ½ MS 0,7M modificado pela adição de solução *sugar alcohol* utilizada em meio BH3 cuja composição é descrita no apêndice.

Em seguida, para garantir umidade dentro das placas, gotas dos respectivos meios foram adicionadas de forma isolada na borda periférica da placa. As placas foram, então, vedadas e armazenadas em pote plástico na B.O.D sob ausência de luz, a 27°C.

3.3 REDUÇÃO DA PRESSÃO OSMÓTICA DO MEIO E TESTES COM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO PARA REGENERAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR

O processo de redução da pressão osmótica foi baseado no protocolo descrito por Latado *et al.* (1999) e iniciou sete dias após o plaqueamento das células. Foram adicionadas 2 gotas de meio de cultivo EME 0,146M (descrito no apêndice) a cada 7 dias durante 14 dias. Posteriormente, houve nova adição de meio EME, porém no volume de 4 gotas a cada 7 dias. Após 50 dias de cultivo, a massa total de células foi transferida para erlenmeyers de 25 ml juntamente com meio em que estavam sendo mantidas e o volume de meio de cultivo foi completado para 10 ml utilizando três meios líquidos diferentes. Foram testados os meios EME

0,146M, meio líquido Yasuda contendo 3mgL^{-1} e 50gL^{-1} de maltose ou sacarose e meio de maturação *C.canephora* (DÉCHAMP *et al.*, 2006), com adição de 500mgL^{-1} de extrato de malte na presença de 30gL^{-1} de maltose ou sacarose. As soluções foram mantidas sob agitação de 80 rpm em ausência de luz a temperatura de 27°C . A partir de então, a renovação do meio ocorreu a cada 30 dias.

3.4 ANÁLISE HISTOQUÍMICA

As células em regeneração mantidas em suspensão durante 1, 2 e 3 meses foram coletadas em câmara de fluxo laminar e fixadas em solução de FAA 70% (JOHANSEN, 1940) por 24 horas. Em seguida, as amostras foram armazenadas em álcool 70% e a preparação das amostras para o emblocamento foi iniciada. Primeiramente foi realizada a desidratação seriada, seguida por pré-infiltração, infiltração, imersão em historesina, montagem do bloco, seccionamento em micrótomo e coloração da lâmina. Para a desidratação seriada, as células foram submetidas a imersão em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%), permanecendo 60 minutos em cada etapa sendo que a última etapa foi repetida por duas vezes. No decorrer do processo de pré-infiltração, a historesina (Leica©) e álcool etílico 100% foram utilizados na proporção de 1:1 por 24h. Após esse procedimento, as amostras foram submetidas a infiltração, no qual utilizou-se a historesina e pó ativador. O material biológico permaneceu imerso por 24 horas em historesina combinada com ativador até passarem para a etapa de emblocamento. Durante o emblocamento, foi adicionado $372\mu\text{l}$ de historesina e ativador junto a $28\mu\text{l}$ da solução de Hardener (endurecedor) para cada amostra. Afim de modelar os blocos, cápsulas de remédio transparentes tamanho 00 foram empregadas como reservatório para inserção das amostras e da solução preparada, de modo que o material a ser analisado permanecesse o mais próximo possível da base da cápsula. Para secagem dos blocos, utilizou-se estufa com temperatura à 35°C por 48 horas. Os blocos formados foram cortados em micrótomo manual (*Easypath EP-31-20091*), na espessura de $5\mu\text{m}$ e sobrepostos em lâmina de vidro contendo gotas de água destilada. A lâmina foi então, levada a chapa de aquecimento para evaporação da água e conseqüente fixação do corte sobre a superfície. Em seguida, o material obtido foi corado pela solução de azul de toluidina a 0,05% (O'BRIEN *et al.*; 1965), sutilmente lavado com água destilada e novamente aquecido para evaporação da água de lavagem. Na etapa final, os cortes foram selados com *Entellan*® fixado com lamínula durante 30 minutos. As fotomicrografias foram obtidas a partir de câmera digital acoplada em microscópio óptico (*Zeiss, Axio Scope*).

3.5 ANÁLISE CITOQUÍMICA POR MÉTODO DE DUPLA COLORAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS POTENCIALMENTE EMBRIOGÊNICAS

A técnica de dupla coloração empregando os corantes carmim-acético e azul de Evans permite a identificação de massas pró-embriogênicas através da pigmentação com a cor vermelha das células potencialmente viáveis ao desenvolvimento do potencial embriogênico pelo corante carmim acético, enquanto células inviáveis são pigmentadas pelo corante azul de Evans. A coloração azul das células inviáveis indica a presença de rupturas na membrana plasmática ocasionada pelo processo de morte celular. Neste processo, células vacuoladas também são coradas pelo corante azul de Evans, uma vez que a vacuolização é o primeiro sinal de morte celular (SILVA, 2009).

O procedimento de dupla coloração foi dividido em duas etapas: a primeira foi a adição de corante carmim acético (2%) nas amostras coletadas e a segunda foi coloração com o corante azul de Evans (0,1%).

Durante a realização da primeira etapa, as células coletadas colocadas sobre a lâmina de vidro foram submersas em algumas gotas de carmim-acético (2%) por 1 minuto, as células foram lavadas com água destilada e todo o líquido foi removido. As amostras coradas com carmim-acético expostas ao contato com 2 a 3 gotas de corante azul de Evans (0,1%) por 30 segundos e submetidas a lavagem suave com água destilada. Por último, foram adicionadas 2 a 3 gotas de glicerol afim de evitar o ressecamento do material que foi imobilizado com a utilização de lamínula (REIS, 2010).

As células foram observadas em microscópio comum e as imagens registradas a partir de câmera digital acoplada em microscópio óptico (*Zeiss, Axio Scope*).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram avaliados alguns dos parâmetros necessários para elaboração de um protocolo eficiente de isolamento de protoplastos de suspensão de calo embriogênico de *C. canephora* e início do estudo de regeneração celular.

A alta eficiência no isolamento de protoplastos é o resultado da somatória de condições ideais como a composição da solução enzimática, período de exposição à solução de digestão da parede celular, tempo de digestão enzimática, pH da solução, agitação, molaridade, meio de cultura, entre outros (CARNEIRO *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2002). Tais fatores só podem ser definidos empiricamente, e têm capacidade de influenciar diretamente a viabilidade celular (que

pode ser identificada neste caso, através da integridade da membrana plasmática, turgidez e vitalidade da célula isolada), e o rendimento total de células (número de células obtidas ao final do processo em relação a massa inicial de suspensão de calo vegetal utilizada).

Neste trabalho optou-se por avaliar o efeito da composição da solução enzimática, pH e meio de cultura. Não houve necessidade de variar a molaridade e tempo de digestão enzimática, uma vez que ambos os fatores ofereceram condições para obtenção de alto rendimento de protoplastos isolados e viáveis. A avaliação de cada fator foi realizada através da variação de apenas uma variável por vez, enquanto as outras variáveis permaneceram fixas (TORRES *et al.*;1998; AUGUSTO, 2015). Cada experimento foi realizado três vezes com a finalidade de garantir maior confiabilidade dos resultados obtidos. Durante a realização das análises estatísticas, foi observado que os dados coletados não apresentavam distribuição normal, nem homogeneidade. Devido a esta razão, a análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e distribuição de Wilcoxon admitindo intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Ao avaliar os testes das diferentes soluções enzimáticas, foi observado que as duas combinações enzimáticas 1 e 2 (TABELA 1), tiveram capacidade de digerir completamente a parede celular, e grande parte dos protoplastos obtidos estavam íntegros (sem rompimento da membrana plasmática). Também pôde-se notar que algumas células estavam fundindo-se espontaneamente e duas possíveis razões são a ocorrência natural desse evento durante a digestão enzimática que havia terminado há pouco tempo anteriormente ao registro da imagem e a outra razão, seria a presença de cloreto de cálcio diidratado que pode induzir a desestabilização da membrana plasmática e, conseqüentemente, a fusão dos protoplastos (FIGURA 9) (AUGUSTO, 2015).

Figura 9: Protoplastos isolados à partir de suspensão embriogênica de *Coffea canephora* clone 14 ; seta indicando autofusão dos protoplastos – microscópio invertido aumento 400x.



Fonte: Autora (2020)

As análises envolvendo a correlação da eficiência das diferentes concentrações e combinações enzimáticas no isolamento de protoplastos de *Coffea canephora*, foram realizadas por meio de três experimentos representados na Tabela 2.

Tabela 2: Avaliação do percentual de viabilidade e rendimento de células isoladas em função da massa inicial de calo embriogênico de *Coffea canephora* em suspensão, obtidos após a digestão enzimática da parede celular utilizando diferentes misturas de enzimas representadas pela combinação 1 (1% celulase; 0,5% driselase; 0,5% pectinase) e combinação 2 (0,5% celulase; 0,5% macerozima; 0,2% pectinase).

Combinação	Repetição**	Massa inicial (g)	% Células viáveis ¹		Rendimento (células/g de calo) ²	
			Médias dos cálculos realizados após 3 contagens de células para cada repetição ± erro padrão			
1	A	1,5111 ± 0,1526	88,37 ± 2,21	a	45,36 x10 ⁵ ± 2,05 x10 ⁵	A
1	B	1,8162 ± 0,1526	91,49 ± 2,21	a	49,43 x10 ⁵ ± 2,05 x 10 ⁵	A
1	C	1,2439 ± 0,0266	36,78 ± 7,38	a	64,53 x10 ⁵ ± 2,26 x 10 ⁵	A
1	D	1,2063 ± 0,0266	51,53 ± 7,38	a	69,05 x 10 ⁵ ± 2,26 x 10 ⁵	A
1	E	0,9447 ± 0,1567	43,88 ± 0,59	a	14,36 x10 ⁵ ± 0,69 x10 ⁵	A
1	F	1,2582 ± 0,1567	45,05 ± 0,59	a	12,98 x10 ⁵ ± 0,69 x10 ⁵	A
2	A	1,1763 ± 0,0464	91,58 ± 4,67	a	18,73 x10 ⁵ ± 2,43 x10 ⁵	A
2	B	1,2016 ± 0,0464	94,42 ± 4,67	a	26,44 x10 ⁵ ± 2,43 x10 ⁵	A
2	C	1,2663 ± 0,0464	79,22 ± 4,67	a	19,64 x10 ⁵ ± 2,43 x10 ⁵	A
2	D	1,3245 ± 0,0247	15,13 ± 4,35	a	58,66 x10 ⁵ ± 23,96 x 10 ⁵	A
2	E	1,2896 ± 0,0247	23,83 ± 4,35	a	106,57 x10 ⁵ ± 23,96 x 10 ⁵	A
2	F	1,1384 ± 0,000	44,27 ± 10,18	a	8,52 x10 ⁵ ± 17,62 x10 ⁵	A

**Cada repetição representa a média obtida a partir de cálculos realizados com a média aritmética dos números de células isolados coletados após 3 contagens de células em câmara de Neubauer para cada replicata. O erro padrão foi calculado para cada experimento em que os dados foram coletados .

Fonte: Autora (2020).

As letras ‘a’ e ‘A’ estão representadas diferentemente por se tratarem de diferentes análises estatísticas, e representam equivalências estatísticas entre os tratamentos e parâmetros analisados.

Após análise estatística dos dados obtidos, é possível concluir que o percentual de células viáveis não difere significativamente entre as combinações enzimáticas 1 e 2. Quanto à variável rendimento, os tratamentos testados também não apresentam desigualdades estatísticas (indicado pela letra ‘a’), logo, através da execução deste experimento ficou demonstrado que as duas soluções enzimáticas avaliadas são igualmente eficazes para digestão da parede celular de células de suspensão celular de calos embriogênico de *Coffea canephora*.

O sucesso na digestão completa da parede celular corrobora com os resultados obtidos por Mourão Filho (1995) durante o isolamento de protoplastos à partir de calos embriogênicos de citros. Variações entre viabilidade e rendimento são comuns entre espécies, gêneros e genótipos diferentes, por isso não é esperado valores semelhantes entre esses parâmetros. Também pode-se afirmar que apesar da concentração enzimática final ser reduzida pela metade, a proposta de SCHÖPKE *et al.* (1987) para isolamento de protoplastos á partir de embriões somáticos de *C.canephora*, utilizada neste trabalho para preparo da concentração da solução estoque enzimática foi eficiente na digestão total da parede celular. Uma provável razão para esse resultado é a discrepância entre a rigidez dos tecidos nos quais os protoplastos foram isolados, uma vez que as células isoladas aqui mostradas foram obtidas a partir de suspensão celular embriogênica de *C.canephora* invés de embriões somáticos.

É importante ressaltar que o o êxito na digestão completa da parede celular e obtenção de células viáveis ao final do processo de purificação, já consagra um resultado altamente satisfatório e próspero para formulação de um protocolo eficiente para isolamento de protoplastos de suspensão de células obtidas a partir de calo embriogênico de *C.canephora*.

O valor de pH mais adequado foi determinado mediante a avaliação de eficiência enzimática simultaneamente a análise de viabilidade de protoplastos obtidos em pH 5,6; 6,0 e 6,5.

Os resultados obtidos estão apresentados a seguir nas Tabela 3.

Tabela 3: Influência do pH da solução enzimática no percentual de viabilidade e concentração final média de protoplastos isolados a partir de calos embriogênicos de *Coffea canephora* em suspensão (continua).

Tratamento	Repetição ¹	Contagem	Células viáveis		Concentração (células/ml) x 10 ⁶
			contadas em hemocítometro	% Células viáveis	
Valor de contagem/calculado ± erro padrão					
pH 5,6	A1	1	245 ± 37 a	85,66 ± 35,83 A	5,72 ± 0,72 a
pH 5,6	A1	2	148 ± 37 a	83,15 ± 35,83 A	3,56 ± 0,72 a
pH 5,6	A1	3	125 ± 37 a	69,83 ± 35,83 A	3,58 ± 0,72 a
pH 5,6	A2	1	100 ± 4 a	52,63 ± 3,48 A	3,80 ± 0,26 a
pH 5,6	A2	2	95 ± 4 a	47,03 ± 3,48 A	4,04 ± 0,26 a
pH 5,6	A2	3	88 ± 4 a	55,35 ± 3,48 A	3,18 ± 0,26 a
pH 5,6	A3	1	27 ± 4 a	27,55 ± 4,41 A	1,96 ± 0,50 a
pH 5,6	A3	2	32 ± 4 a	42,67 ± 4,41 A	1,50 ± 0,50 a
pH 5,6	A3	3	17 ± 4 a	22,67 ± 4,41 A	1,50 ± 0,50 a
pH 5,6	A4	1	16 ± 3 a	27,59 ± 3,76 A	1,16 ± 0,75 a
pH 5,6	A4	2	10 ± 3 a	15,63 ± 3,76 A	1,28 ± 0,75 a
pH 5,6	A4	3	7 ± 3 a	9,86 ± 3,76 A	1,42 ± 0,75 a
pH 6,0	B1	1	6 ± 2 c	26,09 ± 1,48 B	0,46 ± 0,12 c
pH 6,0	B1	2	13 ± 2 c	30,23 ± 1,48 B	0,86 ± 0,12 c
pH 6,0	B1	3	8 ± 2 c	30,77 ± 1,48 B	0,52 ± 0,12 c
pH 6,0	B2	1	6 ± 1 c	20,69 ± 2,66 B	0,58 ± 0,37 c
pH 6,0	B2	2	4 ± 1 c	14,29 ± 2,66 B	0,56 ± 0,37 c
pH 6,0	B2	3	4 ± 1 c	11,76 ± 2,66 B	0,68 ± 0,37 c
pH 6,0	B3	1	13 ± 2 c	17,57 ± 2,44 B	1,48 ± 0,13 c
pH 6,0	B3	2	5 ± 2 c	9,43 ± 2,44 B	1,06 ± 0,13 c
pH 6,0	B3	3	12 ± 2 c	15,79 ± 2,44 B	1,52 ± 0,13 c
pH 6,0	B3	4	4 ± 2 c	21,05 ± 2,44 B	0,38 ± 0,13 c
pH 6,0	B4	1	14 ± 2 c	17,95 ± 2,39 B	1,56 ± 0,95 c
pH 6,0	B4	2	6 ± 2 c	9,68 ± 2,39 B	1,24 ± 0,95 c
pH 6,0	B4	3	9 ± 2 c	13,43 ± 2,39 B	1,34 ± 0,95 c
pH 6,5	C1	1	12 ± 3	12,90 ± 2,90 C	1,86 ± 0,08 b
pH 6,5	C1	2	4 ± 3 b	5,06 ± 2,90 C	1,58 ± 0,08 b
pH 6,5	C1	3	3 ± 3 b	3,53 ± 2,90 C	1,70 ± 0,08 b
pH 6,5	C2	1	22 ± 4 b	14,77 ± 1,54 C	2,98 ± 0,31 b
pH 6,5	C2	2	6 ± 4 b	8,33 ± 1,54 C	1,44 ± 0,31 b
pH 6,5	C2	3	10 ± 4 b	8,77 ± 1,54 C	2,28 ± 0,31 b
pH 6,5	C2	4	7 ± 4 b	6,60 ± 1,54 C	2,12 ± 0,31 b
pH 6,5	C3	3	13 ± 0 b	23,08 ± 4,26 C	0,26 ± 0,67 b
pH 6,5	C3	1	13 ± 0 b	7,69 ± 4,26 C	0,26 ± 0,67 b
pH 6,5	C3	1	14 ± 0 b	7,14 ± 4,26 C	0,28 ± 0,67 b

¹ Cada repetição consiste em uma replicata técnica. ² A contagem representa o número de vezes que a quantidade de células isoladas de cada alíquota coletada de uma repetição foi contada em hemocitômetro (neste caso, para cada replicata, foram feitas 3 contagens, exceto amostra 'A' que foram feitas 4 contagens devido a discrepância dos valores obtidos). Os conjuntos de letras '(a, b, c), (A, B, C), (a, b, c)', representam análises estatísticas de diferentes parâmetros, e as diferenças estatísticas entre resultados obtidos. A ordem alfabética das letras acompanha o decréscimo dos valores estatísticos. O erro padrão foi calculado para cada experimento em que os dados foram coletados. **Observação:** repetição C4 teste pH 6,5 não formou pellet de células ao final do processo de purificação (conclusão).

Fonte: Autora (2020).

Através da análise dos dados apresentados nas Tabelas 3 é possível notar que o pH da solução de digestão enzimática exerce influência significativa na viabilidade dos protoplastos isolados e na concentração de células obtidas ao final do processo de isolamento celular. Entre os tratamentos testados, nota-se que o pH 5,6 ofereceu as melhores condições para todos os parâmetros analisados, viabilidade e concentração celular. Resultados parecidos foram relatados por Uchimiya e Murishage (1974) ao analisarem a eficiência da solução enzimática composta por 1% celulase Onozuka e 0,2% Macerozima em faixa de pH variando entre 3.7 a 7.2 durante o isolamento de protoplastos de suspensão celular de calos de *Nicotiana tabacum*. Os autores constataram dois valores de pH com máximo isolamento celular, sendo eles 4.7 e 5.7, desta forma, ambos optaram pela padronização do pH em 5.7, uma vez que este valor já é comumente utilizado para meios de cultivo de plantas. Recentemente, Yao *et al.* (2016) também demonstraram durante experimentos com isolamento de protoplastos de suspensão celular de cereja doce (*Prunus avium* L.), que a solução enzimática composta por 1% celulase R-10 e 0,5% Pectolyase Y-23 submetida a ajustes de pH variando entre 5.2 e 6.2, apresentou melhor rendimento e viabilidade dos protoplastos isolados, quando o valor do pH da solução foi de 5.8 enquanto o pH 5,6 aparece logo em seguida.

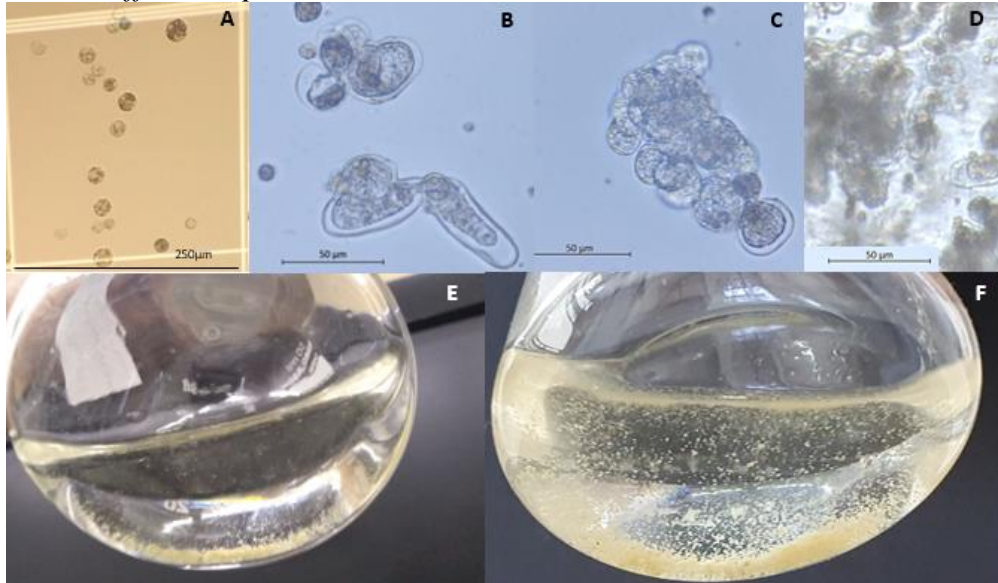
Ainda observando a Tabela 3, pode-se concluir que para suspensão celular de calo embriogênico de *C. canephora* o pH 6,5 foi mais favorável a ação enzimática em relação ao pH 6,0, fato evidenciado ao observarmos o valor absoluto de células viáveis contadas em hemocitômetro e a concentração celular; no entanto, este tratamento apresentou menor percentual de células viáveis quando comparado aos demais. Sendo assim, fica estabelecido que, entre os tratamentos avaliados, o pH 5,6 é o que oferece as condições mais adequadas para a obtenção de protoplastos viáveis e proporciona melhor atividade da combinação enzimática testada.

Em relação ao meios $\frac{1}{2}$ MS 0,7M e $\frac{1}{2}$ MS com adição de solução *sugar alcohol* 0,7M, não foi possível observar proliferação celular após o décimo quinto dia de cultivo, sendo assim,

optou-se pela adição de meio BH3 0,7M a cultura para que as células em cultivo não perdessem a viabilidade.

O processo de regeneração de protoplastos segue um determinado padrão de características que podem ser observadas microscopicamente e posteriormente a olho nu, as fases de regeneração observadas até o momento estão ilustradas na Figura 10.

Figura 10: Regeneração dos protoplastos isolados a partir de suspensão de calos embriogênicos de *Coffea canephora* clone14



Legenda: A- Protoplastos em câmara de Neubauer isolados a partir de suspensão celular embriogênica de *C.canephora* clone 14; B- Células em processo de divisão celular; Colônia celular; D- Aglomerados celulares e células em divisão celular. As imagens de 'A' a 'D' foram registradas em microscópio invertido com aumento de 200x após 38 dias de cultivo em meio BH3 0,7M e adição de 2 gotas de meio de cultivo EME 0,146M a cada 7 dias durante 14 dias e posterior aumento de volume do volume adicionado para 4 gotas a cada 7 dias. As placas de Petri nas quais as células eram mantidas, foram armazenadas em B.O.D no escuro. E- Microcalos formados 38 dias de inoculação em meio EME 0,146M mantidas em agitação de 80 rpm e ausência de luz provenientes do cultivo 52 dias de cultivo dos protoplastos isolados sob as mesmas condições descritas das células mostradas de 'A' a 'D'; F- Células mostradas em 'E' após 3 meses de cultivo em suspensão com renovação de meio de cultura a cada 30 dias. Todas as culturas foram mantidas à temperatura de 27°C .

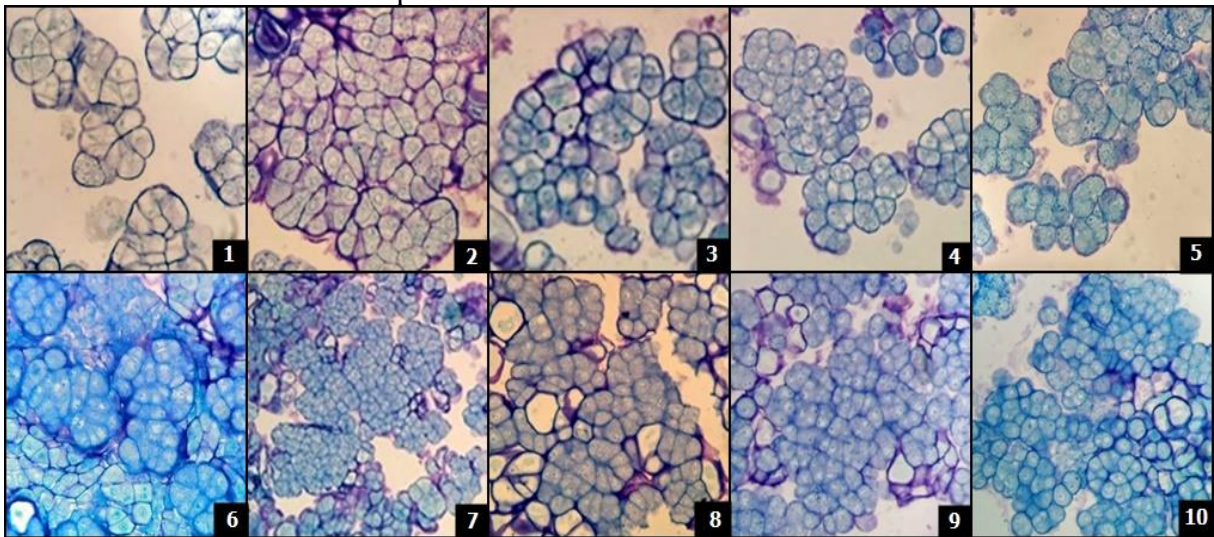
Fonte: Da autora (2020).

Através da Figura 10 é possível constatar que tanto os protoplastos isolados à partir de suspensão embriogênica de *C.canephora* podem fundir-se espontaneamente (fato possivelmente relacionado a ausência da parede celular), como também, permaneceram viáveis e estão seguindo padrão de regeneração de protoplastos comumente observado (divisão celular, formação de colônias, aglomerados celulares e posteriormente, a formação de microcalos). No entanto, a regeneração dos embriões a partir das células obtidas dependerá exclusivamente de dois fatores: a competência celular para formação de embrião (principalmente) e estímulos

adequados específicos para regeneração das células embriogênicas de *C.canephora* tais como meio de cultura e exposição a luz.

Mediante a possibilidade da perda de potencial embriogênico das células avaliadas devido ao longo período de cultivo antecedente ao isolamento dos protoplastos, foram realizadas análises histológicas para verificação dos aspectos físicos da massa celular formada com a finalidade de averiguar se os microcalos formados ainda mantiveram características pró embriogênicas. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 11.

Figura 11: Análise histológica das células de *Coffea canephora* clone 14 com diferentes meios de cultura e períodos de cultivo



Legenda: **1-** Microcalo obtido a partir de protoplastos isolados de suspensão embriogênica de *C.canephora* após 20 dias de cultivo em suspensão meio EME 0,146M (aumento 500x); **2-** Microcalo obtido a partir de protoplastos isolados de suspensão embriogênica de *C.canephora* após 30 dias de cultivo em suspensão meio EME 0,146M (aumento 400x); **3-** Microcalos cultivados durante 45 dias em meio de maturação com adição de 30 g. L⁻¹ de maltose e 500 mgL⁻¹ de extrato de malte- aumento 400x; **4-** Microcalos cultivados durante 45 dias em meio de maturação com adição de 30 g. L⁻¹ de sacarose e 500 mgL⁻¹ de extrato de malte- aumento 200x; **5-** Microcalos cultivados durante 45 dias em meio de maturação com adição de 50 g. L⁻¹ de maltose e 500 mgL⁻¹ de extrato de malte- aumento 200x; **6-** Microcalos cultivados durante 45 dias em meio Yasuda (1985) com adição de 50 g. L⁻¹ de maltose; **7-** Microcalos cultivados durante 45 dias em meio Yasuda (1985) com adição de 50 g. L⁻¹ de sacarose- aumento 200x; **8-** Microcalos cultivados durante 45 dias em meio EME 0,146M sacarose -aumento 200x; **9-** Microcalos cultivados durante 70 dias em meio EME 0,146M- aumento 400x; **10-** Microcalos cultivados durante 70 dias em meio Yasuda (1985) – aumento 200x. Todas as suspensões foram armazenadas em ausência de luz e mantidas a 27°C sob agitação de 80 rpm.

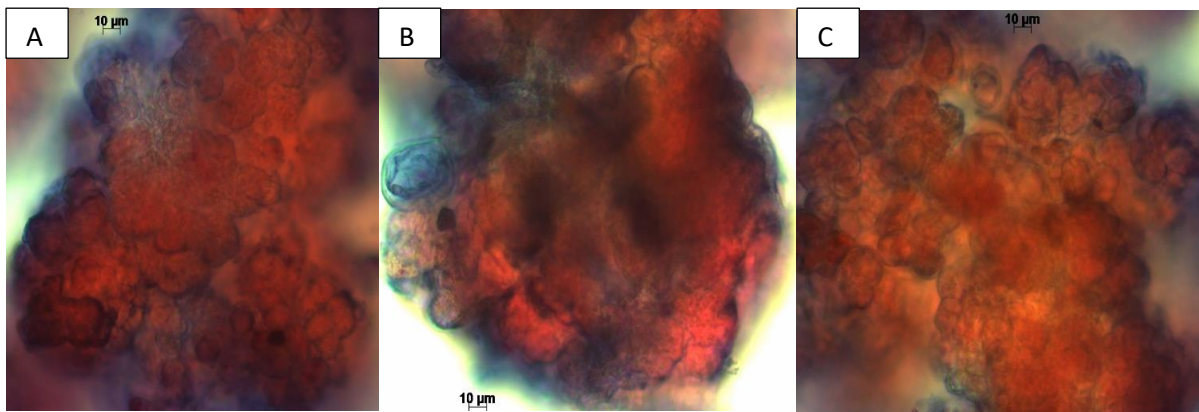
Fonte: Autora (2020).

Analisando a Figura 11, é possível concluir que as amostras submetidas a análise histológica ainda mantiveram aspectos físicos além do padrão de divisão celular de células embriogênicas (citoplasma denso, núcleo proeminente), apesar de haver células grandes vacuoladas (cor branca), mostradas na amostra 8. Também é notável a formação de zonas

meristemáticas (IMAGEM 7), indicando que as células cultivadas podem estar iniciando processo de regeneração de embrião.

Outro método que auxilia a detecção de características celulares pró-embriogênicas é a técnica de dupla coloração, que viabiliza a identificação de células potencialmente viáveis a diferenciação embriogênica por meio da pigmentação destas com a cor vermelha (REIS,2010). A análise de viabilidade pode ser observada na Figura 12.

Figura 12: Avaliação citoquímica realizada através da técnica de dupla-coloração



Legenda: A- Microcalo de *C.canephora* em regenerado á partir de protoplastos, cultivado durante 70 dias em meio EME 0,146M sob agitação de 80 rpm em ausência de luz a 27°C ; após redução da pressão osmótica (aumento 500x); B- Microcalo de *C.canephora* em regenerado á partir de protoplastos, cultivado durante 70 dias em meio Yasuda (1985) sob agitação de 80 rpm em ausência de luz a 27°C após redução da pressão osmótica (aumento 500x); C- Microcalos *C.canephora* regenerado á partir de protoplastos, cultivado por 45 dias em meio de maturação com adição de 50 g. L⁻¹ de maltose e 500 mgL⁻¹ de extrato de malte sob agitação de 80 rpm em ausência de luz a 27°C , após redução da pressão osmótica (aumento 500x).

Fonte: Autora (2020).

Pela observação da Figura 12, constata-se que independente do meio de cultivo as células cultivadas permaneceram potencialmente embriogênicas, logo o material cultivado poderá futuramente, diferenciar-se em embriões somáticos.

6 CONCLUSÃO

- As duas soluções enzimáticas são equivalentemente eficientes em relação a rendimento e viabilidade dos protoplastos isolados de suspensão embriogênica de *Coffea canephora*.
- Em pH 5,6 a solução enzimática oferece melhores condições para rendimento e viabilidade celular simultaneamente.

- Os aglomerados celulares aumentaram sua capacidade de divisão celular e mantiveram características e pró-embriogênicas podendo estar iniciando processo de diferenciação celular em embrião.
- A regeneração dos protoplastos isolados até a fase da suspensão celular embriogênica configura um sucesso do protocolo estabelecido.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- O processo de regeneração das massas celulares de *C.canephora* obtidas deve permanecer em monitoramento.
- Para regeneração de plantas em caso de êxito na formação de embriões, podem ser empregados protocolos de regeneração de suspensão celular embriogênica disponíveis na literatura.
- Em caso de sucesso na regeneração de plantas será necessário a realização de análise de fidelidade genética em decorrência de possível variação somaclonal, além disso, este protocolo tornar-se-á uma alternativa viável para transformação de plantas empregando tecnologia CRISPR-Cas9.

8 REFERÊNCIAS

- ABDIN, Malik Zainul (ed.). **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Singapura: Springer, 2017. 405 p. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-981-10-2961-5>. Acesso em: 18 jun. 2020.
- ANDERSSON, Mariette *et al.* **Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery**. *Physiologia plantarum*, v. 164, n. 4, p. 378-384, mar. 2018. <https://doi.org/10.1111/ppl.12731>
- AUGUSTO, Diana Henriques - Otimização dos processos de isolamento e cultura de protoplastos de tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.). Coimbra, 2015. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal.
- BAJAJ, Y.P.S-. **Biotechnology in Agriculture and Forestry 22: Plant and protoplasts and genetic engineering III**. Berlim Heidelberg: Springer-verlag, p. 349 ,1993 Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-78006-6.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2020.
- BATISTA-SANTOS, P. *et al.*, The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp.-- photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. *Jounal Plant Physiology*, v.168, n.8, p.792-806. 15 maio 2011. doi: 10.1016/j.jplph.2010.11.013.
- BEDNAREK, Piotr Tomasz; ORłOWSKA, Renata. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, v. 140, n. 2, p. 245-257, 29 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-019-01724-1>.
- BELHAJ, K. *et al.* Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 39, 11 out. 2013. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-39>
- BENGOCHEA, Teresa; DODDS, John H. fusão de protoplastos. In: **Protoplastos vegetais**. Springer, Dordrecht, p. 44-58, 1986. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-4095-6_4
- BERNARD, G. *et al.* Efficient Genome Editing Using CRISPR/Cas9 Technology in Chicory. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1155, mar. 2019. DOI: 10.3390 / ijms20051155
- BERTINI, Edoardo; TORNIELLI, Giovanni Battista; PEZZOTTI, Mario; ZENONI, Sara. Regeneration of plants from embryogenic callus-derived protoplasts of Garganega and Sangiovese grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (pctoc)**, [s.l.], v. 138, n. 2, p. 239-246, 10 maio de 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-019-01619-1>
- BERTRAND, B. *et al.* Performance of *Coffea arabica* F1 hybrids in agroforestry and full-sun cropping systems in comparison with American pure line cultivars. *Euphytica*, v. 181, n. 2, p. 147-158, 16 fev. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-011-0372-7>
- BORTESI, Luisa; FISCHER, Rainer. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 41-52, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>. Acesso em: 15 maio 2020
- BRASIL. CTNBIO. **Resolução Normativa N° 16, de 15 de janeiro de 2018**. 2018. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/inicio>.

- BREITLER, J. C. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 3, p. 383–394, maio.2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1429-2>
- BRIDGEN, Mark P.; VAN HOUTVEN, Wouter; EECKHAUT, Tom. Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. **Handbook Of Plant Breeding**, n. 11, p. 127-144, 2018. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-90698-0_6
- CANHOTO, Jorge M. Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. 2010. <http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0404-6>
- CARNEIRO, V.T. de C.; CONROI, T.; BARROS, L.M.G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, SPI, CNPH, v.1, p.413-458, 1998.
- CARVALHO, Carlos H. S. de; *et al.* Comportamento agrônômico de clones de café arábica produzidos por embriogênese somática. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 8., 2013, DF-Brasília. Salvador-BA: Embrapa, p.1-3, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/94864/1/Comportamento-agronomico-de-clones.pdf>.
- CARVALHO, Julita M. F. C., SENA, Daniela V. A. Híbridação Somática: Documento 181. **Embrapa**, Campina Grande-PB, p. 1-27, dez. 2007. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/20840/1/DOC181.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2020.
- CASARIN, Tatiane. **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E VALIDA O DO SISTEMA CRISPR/CAS9 EM Coffea canephora**. 2020. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2020.
- CASTRO, L via Mendes DE. **Isolamento, cultura de protoplastos e regenera o de plantas de laranja doce (Citrus sinensis L. Osbeck)**.Disserta o (Mestrado) Biblioteca Digital de Teses e Disserta es da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 8 fev.2010.
- CENCI, Alberto; COMBES, Marie-Christine; LASHERMES, Philippe. Genome evolution in diploid and tetraploid *Coffea* species as revealed by comparative analysis of orthologous genome segments. **Plant Molecular Biology**, v. 78, n. 1-2, p. 135-145, 16 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-011-9852-3>.
- Consórcio Pesquisa Café. **Receita cambial com a venda ao exterior dos Cafés do Brasil atinge US\$ 1,80 bilhão no primeiro quadrimestre de 2020**. 2020. Relatório Mensal. abr. 2020- Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (Cecaf ). Disponível em: <http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/impressao/noticias/988-2020-05-18-18-07-22>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- COSGROVE, Daniel J.; Growth of the plant cell wall. *Natures Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 11, p. 850, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- COSTA, MARIA ANGÉLICA PEREIRA DE CARVALHO *et al.* Isolamento e eficiência de protoplastos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 472-476, 2002.
- DAVEY, Michael R. *et al.* Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 2, p. 131-171, mar. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>

DAVIS, Aaron. P. *et al.* An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006.15 dez.2006. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>

DE OLIVEIRA, Kenia Carvalho de; GUIMARÃES, Paula de Souza; BAZIOLI, Jaqueline Moraes; *et al.* Effects of somatic embryogenesis on gene expression of cloned coffee heterozygous hybrids. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 41, n. 7, p. 1-11, 7 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-019-2917-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-019-2917-7>. Acesso em: 10 jun. 2020.

DÉCHAMP, Eveline; BREITLER, Jean Christophe; LEROY, Thierry; ETIENNE, Hervé; KAN, Wang. *Coffee (Coffea arabica L.)*. In: **Agrobacterium Protocols: Third Edition**. [s.l.] : Springer, New York, NY, 2006. v. 343p. 275–291. DOI: 10.1385/1597451304.

DELTCHEVA, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602–7, 31 mar. 2011. DOI: 10.1038 / nature09886

EMBRAPA. **Exportações mundiais de café atingem 62 milhões de sacas de 60kg no acumulado de seis meses**. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52297927/exportacoes-mundiais-de-cafe-atingem-62-milhoes-de-sacas-de-60kg-no-acumulado-de-seis-meses>.

ESPÍRITO SANTO. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), 2020. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br>

EVANS, DAVID A.; BRAVO, JANIS E. Isolamento e cultura de protoplastos vegetais. **Protoplastos vegetais. Revisão internacional de citologia. Suplemento**, v. 16, p. 33-53, 1983. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8619832>.

FENG, Z. *et al.* Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system, *Cell Research*, v.23, n.10, p.1229-1232. 20 agosto.2013. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.114>

FERRANDO, M.; SPIESS, W. E. L. Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n. 2-3, p. 115-127, 2001.

FERRÃO, Romário Gava *et al.* **Café conillon**. Espírito Santo: cap.5, p. 120-173. Melhoramento genético de *Coffea canephora*, 2007. Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/696/1/livro2007cafeconilon5.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2020

FREARSON, E.M.; POWE, J.B.; COCKING, E.C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, Orlando, v.33, p.130-137, 1973. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(73\)90169-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(73)90169-3)

FREITAS, Nathália Chagas. **SISTEMA CRISPR/CAS9 VISANDO A EDIÇÃO GENÔMICA NO ALOTETRAPLOIDE *Coffea arabica***. 2019. 73 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2019.

FUENTES, Sandra R.I.; CALHEIROS, Maria B.p.; MANETTI-FILHO, João; VIEIRA, Luiz G.e.. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, v. 60, n. 1, p. 5-13, fev. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1006474324652>.

- GRATTAPAGLIA, D. e MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: Ministério da Agricultura, p.99-170, 1998.
- GUEDES, Rodrigo da Silva. **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE DENDEZEIRO**. 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Produção Vegetal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2008. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp084842.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2020.
- 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.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa, v. 2, p. 533-568, 1999.
- HARTUNG, Frank; SCHIEMANN, Joachim. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. **The Plant Journal**, v. 78, n. 5, p. 742-752, 2014.
- HATANAKA, T., ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T.. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell Reports**, Japão, v. 10, n. 1, p. 179-182, mar. 1991. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00234290.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2020.
- HOSOI, Yoshihisa; MARUYAMA, Tsuyoshi E. Somatic embryogenesis in Sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.). In: **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. Springer, New Delhi, 2016. p. 41-53.
- HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262–1278, 5 jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- HU, C. Y. e FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, v.1. p.371-393, 1998.
- INEK, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012. doi:10.1126 / science.1225829
- JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. Annual review of biophysics, v. 46, p. 505-529, mar. 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Co., Inc., 1940. 523p.
- KANAI, R.; EDWARDS, G. E. Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. **Plant Physiology**, v. 51, n. 6, p. 1133-1137, jun.1973. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.51.6.1133>
- KARUNARATNE, S. M.; SCOTT, K. J. Mitotic activity in protoplasts isolated from *Sorghum bicolor* leaves. **Plant Science Letters**, v. 23, n. 1, p. 11-16, out.1981. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(81\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0304-4211(81)90019-5)
- KIM, Jin-soo. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 1162-1164, 19 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3389>.

KIM, Sojung *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, v. 24, n. 6, p. 1012-1019. abr. 2014. Disponível em: <https://genome.cshlp.org/content/24/6/1012.short>

KOOP, Hans-ulrich; STEINMÜLLER, Klaus; WAGNER, Hiltrud; et al., Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Plant*, v. 199, n. 2, p. 193-201, jun. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00196559>.

LASHERMES, Philippe, *et al.* **Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome.** *Mol Gen Genet.*; v. 261, n.2, p.259-266, 1999. doi:10.1007/s004380050965. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10102360/>

LATADO, Rodrigo R.; VAZ, Fernando B. D.; TULMANN NETO, Augusto. Plant regeneration of "Rangpur" lime (*Citrus limonia* Osbeck) and "Cleopatra" mandarin (*Citrus reshni* Hort.) through protoplasts of cell suspension. **Scientia Agricola (Brazil)**, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161999000200023>

LAVRAS. INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CAFÉ. . **Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia**. 2020. Disponível em: <http://inct.cnpq.br/web/inct-cafe/home/>. Acesso em: 20 jun. 2020.

LEIFERT, C. *et al.* Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue culture. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Boca Raton, v.14, n. 2. p.83-109, 1995. <https://doi.org/10.1080/07352689509701923>

LIN, C.-S. *et al.* Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 7, p. 1295–1310, jul. 2018. <https://doi.org/10.1111/pbi.12870>

LIU, Degao *et al.* Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 30, p. 70-77, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.01.007>

LIU, J.H.; PANG, X.M.; CHENG, Y.J.; MENG, H.J.; DENG, X.X. Molecular characterization of the nuclear and cytoplasmic genomes of intergeneric diploid plants from cell fusion between *Microcitrus papuana* and Rough lemon. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.21, p.327-332, 2002.

LOYOLA-VARGAS, V.M., OCHOA-ALEJO, N, An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In: LOYOLA-VARGAS, V.M, OCHOA-ALEJO N (eds) *Plant cell culture protocols*. Springer, New York, NY, p 3–13, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1

LUO, Song *et al.* Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases . *Molecular Plant*, v. 8, n. 9, p. 1425-1427. set. 2015. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-plant/pdf/S1674-2052\(15\)00265-8.pdf](https://www.cell.com/molecular-plant/pdf/S1674-2052(15)00265-8.pdf)

MAHESHWARI SC, GILL R, MAHESHWARI N E GHARYAL PK. Em: Reinert J e B H (eds) *Diferenciação de protoplastos e de células vegetais transformadas*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg; p. 3-36, 1986

MALNOY, Mickael. *et al.* DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1904, 20 dez. 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01904>

MATSUMOTO, K. *et al.* Protoplastos de banana: cultura e suas aplicações. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2010.

MATSUMOTO, Kazumitsu *et al.* Banana protoplasts: culture and its applications. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**. v.4, n.1, p.32-38, jan.2010.Disponível em:
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/880183/1/TFSB4SI13238o.pdf>

MONTAGNON, Christophe; CUBRY, Philippe; LEROY, Thierry. Coffee *Coffea canephora* Pierre genetic improvement: acquired knowledge, strategies and perspectives. **Cahiers Agricultures**, v. 21, n. 2, p. 143-153, mar. 2012. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1684/agr.2012.0556>. Disponível em: ues.cirad.fr/index.php/cahttps://revhiers-agricultures/article/view/30970. Acesso em: 18 jun. 2020

MOREIRA, Cristina D. *et al.* Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids. **Molecular Breeding**, v. 6, n. 4, p. 401-405, 2000.

MOURÃO FILHO, Francisco A.A., **Fusão protoplástica de citros para melhoria do porta-enxerto e da copa, com ênfase na ampla hibridação**. Tese (Doutorado) - Universidade da Flórida. Gainesville, 1995.

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

OLIVEIRA, M.M, PAIS M.S.S. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var ‘deliciosa’ cv ‘Hayward’ (kiwifruit). *Plant Cell Rep* 9, p.643–646 ,1991.

OLIVEIRA, M.M, PAIS, M.S., Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var. deliciosa cv. Hayward (Kiwifruit). *Plant Cell Rep*. v.9, n.11, p. 643-696. 9 mar.1991. doi:10.1007/BF00231807

OSAKABE, Yuriko; SUGANO, Shigeo S.; OSAKABE, Keishi. Genome engineering of woody plants: past, present and future. **Journal of Wood Science**, v. 62, n. 3, p. 217-225, mar. 2016.
<https://doi.org/10.1007/s10086-016-1548-5>

PARK, Jongjin; CHOI, Sunmee; PARK, Siki; YOON, Jiyoung; PARK, Aiden Y.; CHOE, Sunghwa. DNA-Free Genome Editing via Ribonucleoprotein (RNP) Delivery of CRISPR/Cas in Lettuce. **Methods In Molecular Biology**, p. 337-354, 2019. Springer New York.
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-8991-1_25. Disponível em:
https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8991-1_25. Acesso em: 10 jun. 2020

PARTELLI, F. L. *et al.* Characterization of the main lipid components of chloroplast membranes and cold induced changes in *Coffea* spp. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 194–204, 12 jun.2011. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.06.001>

PASTERNAK, Taras *et al.* From Single Cell to Plants: Mesophyll Protoplasts as a Versatile System for Investigating Plant Cell Reprogramming. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4195, jun. 2020.

PEREIRA, Alba Regina. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM EXPLANTES FOLIARES DE *Coffea arabica* L. CV. ACAIÁ CERRADO: EFEITO DE CINETINA E ÁCIDO GIBERÉLICO. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, abr. 2007

PIETRZAK, Maciej; SHILLITO, Raymond D.; HOHN, Thomas; POTRYKUS, Ingo. Expressão em plantas de dois genes de resistência a antibióticos bacterianos após a transformação de protoplastos

com um novo vetor de expressão vegetal. *Nucleic Acids Research*, v. 14, n. 14, p. 5857-5868, 11 jul. 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/14.14.5857>. Acesso em: 18 jun. 2020.

PINHAL, Hernane Fernandes *et al.*. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Uberlândia-mg, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 15 jul. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000089>. Acesso em: 17 jun. 2020.

CÂMARA DE NEUBAUER DUPLA MELHORADA ESPELHADA, PRAvet. Disponível em: <https://www.pravet.com.br/camara-de-contagem-neubauer-dupla-melhorada-espelhada-marca-new-optics> Acesso em: 21 de junho de 2020.

RAN, Yidong; LIANG, Zhen; GAO, Caixia. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. *Science China Life Sciences*, v. 60, n. 5, p. 490-505, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9022-1>

RATANASANOBNON, K.; SEATON, K. A. Protoplast isolation for species in the *Chamelaucium* group and the effect of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) on protoplast viability. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 49, n. 5, p. 593–598, 25 nov. 2013.

REIS, M.V. dos. Caracterização de massa pró-embriogênicas de *Tabebuia roseo-alba* (ipê-branco), 2010.51p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RIBEIRO, Bruno Batista *et al.* **EVALUATION OF THE CHEMICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS OF *Coffea canephora* Pierre AND *Coffea arabica* L. BLENDS** Coffee Science, Lavras, v. 9, n. 2, p. 178-186, jun. 2014. (2013). Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/8027/Coffee>.

SCHÖPKE, C.; MÜLLER, L. E.; KOHLENBACH, H. W. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in protoplast cultures from somatic embryos of coffee (*Coffea canephora* P. ex Fr.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 8, n. 3, p. 243–248, 1987.

SEGURA, J. Morfogénesis in vitro. In: BIETO, J. A; TALON, M. (Ed.) *Fisiologia y bioquímica vegetal*. Madrid: Ed. Interamericana, 625p, 1993.

SHAN, Qiwei;*et al.*. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 686-688, ago. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2650>.

SHARMA, Sanjeev Kumar, MILLAM, Steve. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 3, p. 115-119, 8 jun. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-004-0814-y>.

SILVA, Luciano Coutinho. **VIABILIDADE DE CÉLULAS PRÓ-EMBRIOGÊNICAS E SUSPENSÃO CELULAR DE MURICI-PEQUENO**. 2009. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2009.

SMITH, Harry; SMITH, Harry (Ed.). **The molecular biology of plant cells**. University of California Press, vol.14, p- 496, 1977.

SOUZA, Flávio de França;*et al.* Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 221-227, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-70332013000400001>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-70332013000400001&script=sci_arttext. Acesso em: 18 jun. 2020.

- SUBBURAJ, Saminathan *et al.* Site-directed mutagenesis in *Petunia*× *hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. **Plant cell reports**, v. 35, n. 7, p. 1535-1544, jan.2016. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1937-7>
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, vol.1.;1998.
- TSAI, Shengdar Q. *et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 187, dez. 2014. <https://doi.org/10.1038/nbt.3117>
- UCHIMIYA, Hirofumi; MURASHIGE, Toshio. Evaluation of Parameters in the Isolation of Viable Protoplasts from Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiology*, v. 54, n. 6, p. 936-944, 1 dez. 1974. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.54.6.936>
- VAN BOXTEL, Jos; BERTHOULY, Marc. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, v. 44, n. 1, p. 7-17, jan. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00045907>.
- VAN DER VOSSSEN, Herbert; BERTRAND, Benoît; CHARRIER, André. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**, v. 204, n. 2, p. 243-256, fev. 2015. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1398-z>
- VIEIRA, Gabriel Viliod. **Nocaute de LEKTI, através da utilização de CRISPR/Cas9, em linhagem de queratinócito imortalizado**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.2019. doi:10.11606/D.17.2019.tde-15102018-104517.
- VIEIRA, L. G. E. e KOBAYASHI, A. K. Micropropagação do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1. 2000, Poços de Caldas. Palestras... Poços de Caldas: [s.n.], 2000. p. 147-167. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/536>
- VILLALTA-VILLALOBOS, Jimmy; GATICA-ARIAS, Andrés. **Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología** Agronomía Mesoamericana, v. 30, n. 2, p.577-599, agosto, 2019. doi:10.15517/am.v30i2.34173
- WOLTER, F.; SCHINDELE, P.; PUCHTA, H. Plant breeding at the speed of light: the power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 176, 2 dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1775-1>
- WOO, Je Wook; *et al.* Tape-Arabidopsis Sandwich-a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. **Plant methods**, v. 5, n. 1, p. 16, nov. 2009. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-5-16>
- XING, H.-L. *et al.* A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 327, nov. 2014. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
- XU, X.; LIU, J.; DENG, X.X. Production and characterization of intergeneric diploid cybrids derived from symmetric fusion between *Microcitrus papuana* Swingle and sour orange (*Citrus aurantium*). **Euphytica**, Dordrecht, v.136, p.115-123, 2004.
- YAO, Liping; *et al.* Protoplast isolation and development of a transient expression system for sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, v. 209, p. 14-21, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.003>.
- YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. **Embryogenic callus induction from Coffea arabica leaf explants by benzyladenine**. **Plant and Cell Physiology**, v. 26, p. 595-597, 1985.

YOO, Sang-dong; CHO, Young-hee; SHEEN, Jen. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1565-1572, 21 jun. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.199>. Acesso em: 18 jun. 2020.

ZHANG, Yang; SU, *et al.*. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. **Plant Methods**, v. 7, n. 1, p. 30, set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4811-7-30>.

APÊNDICE

Composição dos meios de cultura utilizados para cultivo dos protoplastos e cultivo das fontes de materiais biológicos as quais os protoplastos foram obtidos:

BH3	
MACRONUTRIENTES ESTOQUE (100x)	
	g.L⁻¹
MgSO ₄	37
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	15
K ₂ HPO ₄ (dibásico)	2
KI	150
MULTIVITAMINAS A (100X)	
	g.100 ml⁻¹
Pantotenato de cálcio	0,05
Ácido ascórbico	0,1
Cloreto de colina	0,05
Ácido p-aminobenzoico	0,001
Ácido fólico	0,02
Riboflavina	0,01
Biotina	0,001
Adicionar reagentes 1 a 1 e diluir no aquecimento	
MULTIVITAMINAS B (100X)	
	g.100ml⁻¹
Retinol (vitamina A) *	0,001
Colecalciferol (vitamina D3) *	0,001
Vitamina B12	0,002
*Insolúvel em água, solúvel em etanol. Reagentes fotossensíveis	
ESTOQUE DE KI (100X)	
	g.100ml⁻¹
KI	0,075
ESTOQUE ÁCIDOS ORGÂNICOS (50X)	
	g.100ml⁻¹
Piruvato de sódio	0,1
Ácido cítrico	0,2
Ácido málico	0,2
Ácido fumárico	0,2

ESTOQUE SUGAR+ SUGAR ALCOHOL (100X)	g.100ml⁻¹
Frutose	2,5
Ribose	2,5
Xylose	2,5
Manose	2,5
Rhamnose	2,5
Celobiose	2,5
Galactose	2,5
Manitol	2,5

BH3 0,6M	L⁻¹
Macro BH3 (100x)	10 ml
Micro MT (100X)	10 ml
Vitamina MT (100X)	10 ml
Cálcio MT (50X)	20 ml
Ferro MT (200X)	5 ml
BH3 Multivitamina A (50X)	4 ml
BH3 Multivitamina B	1 ml
KI – BH3	1ml
Sugar alcohol BH3	10 ml
Ácido orgânico BH3	20 ml
Água de côco	20 ml
Extrato de malte	1g
Sacarose*	51,35 g
manitol	81,99 g
glutamina	3,1 g
Caseína hidrolisada	0,25 g

Ajustar pH para 5,7 com KOH. *Para 0,7M BH3 aumentar a sacarose para 85,56 g.L⁻¹

MEIO DE CULTURA MT (MURASHIGE e TUCKER, 1962)	
MACRONUTRIENTES MT (50X)	
	g. L⁻¹
NH ₄ NO ₃	82,5
KNO ₃	95
MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	7,5
K ₂ HPO ₄ (dibásico)	1
MICRONUTRIENTES (100X)	
	g. L⁻¹
H ₃ BO ₃	0,62
MnSO ₄ . H ₂ O	1,68
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,86
KI	0,083
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0025
MT ESTOQUE FERRO (200X)	
	g. L⁻¹
Na ₂ EDTA	7,45
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5,57
ESTOQUE CÁLCIO MT (66X)	
	g. L⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O	29,33
ESTOQUE VITAMINA MT (100X)	
	g. L⁻¹
Mio-inositol	10
Tiamina-HCl	1
Piridoxina	1
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	0,2

MEIO EME (Regular EME, 0146M)

	L ⁻¹
Macro MT (50X)	20 ml
Micro MT (100X)	10 ml
Vitamina MT (100X)	10 ml
Cálcio MT (50X)	20 ml
Ferro MT (100X)	10 ml
Sacarose *	50 g
Extrato de malte	0,5 g
Ágar	8 g (p/ meio sólido)

Ajustar pH utilizando KOH e em seguida filtroesterelizar o meio

*Para o meio EME 0,6M usa-se 205,38 g. L⁻¹ de sacarose.

Na preparação do meio EME 0,7M deve ser utilizado 231,61 g.L⁻¹ de sacarose. A molaridade de um meio de cultura é dada pela soma da molaridade da sacarose (~0,15M) e manitol (~0,45M) presentes no meio. Utilizar sacarose altamente purificada para cultura de protoplasto.

SAIS CPW (FREASON *et al.*, 1973)

Estoque 1	Massa para 100 ml de solução
KH ₂ PO ₄	0,2720 g
KNO ₃	1,0 g
MgSO ₃	2,5 g
KI	0,0016 g
CuSO ₄	0,000025 g
<hr/>	
Estoque 2	
CaCl ₂	1,5 g

Adicionar 1 ml de cada solução estoque e 13 % (p/v) manitol ou 25% (p/v) sacarose alto grau de pureza. Ajustar pH para 5,8 com KOH.

Filtroesterelizar as soluções. Armazenar soluções prontas na geladeira e os estoques no congelador.

Meio de cultivo: Yasuda (usado para obter o calo embr. do café suspensão sem ágar, meio sólido para indução de embrião 8g. L⁻¹)

Macroelementos	Concentração final(mg. L ⁻¹)	Solução estoque (g. L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	412	41.2
KNO ₃	475	47.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	92	9.2
KH ₂ PO ₄	85	8.5
CaCl ₂ . 2H ₂ O	110	11
Microelementos		(mg. L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	3.1	155
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.005	0,25
MnSO ₄ . H ₂ O	6.8	340
Na ₂ Mo ₄ . 2H ₂ O	0.125	6,25
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4.3	215
Vitaminas Gamborg		(mg. L ⁻¹)
Tiamina-HCl	10	1000
Ácido nicotínico	1.0	100
Piridoxina-HCl	1.0	100
Mio-Inositol	100	10000
FeEDTA		10 ml. L ⁻¹
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8	
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	37.3	
Regulador de crescimento		
BAP (1mg/ml)	3	400mg. L ⁻¹
Sacarose	50 g	
pH 5,6		

Meio de maturação do embrião de café:

Solução estoque	Quantidade utilizada na preparação de 1L
Macro MS	50 ml
microMS	1 ml
FeEDTA MS	10 ml
CaCl ₂ (mesmo do MS)	1ml
Tiamina	1,2ml (estoque de 1,84g. L ⁻¹)
Mio-inositol	100mg (reagente sólido,não tem estoque)
BAP	0,75ml
Sacarose	30g
Ágar (na placa)	5g
Phytigel (no pote)	2,5g
pH 5,6	

