



**PALOMA CARMELINA DA SILVA**

**INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM DIFERENTES  
CLONES DE *Coffea canephora***

**LAVRAS-MG  
2022**

**PALOMA CARMELINA DA SILVA**

**INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM DIFERENTES CLONES DE *Coffea canephora***

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

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
Orientador

Dr. Renan Terassi Pinto  
Coorientador

Dr<sup>a</sup>. Tatiane Casarin  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2022**

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, Paloma Carmelina da.

Indução de embriões somáticos em diferentes clones de *Coffea  
canephora* / Paloma Carmelina da Silva. - 2022.

62 p.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Coorientador(a): Renan Terassi Pinto, Tatiane Casarin.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Protoplastos. 2. Embriogênese somática. 3. Café. I. Paiva,  
Luciano Vilela. II. Pinto, Renan Terassi. III. Casarin, Tatiane. IV.  
Título.

**PALOMA CARMELINA DA SILVA**

**INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM DIFERENTES CLONES DE *Coffea canephora***

**INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS IN DIFFERENT CLONES OF *Coffea canephora***

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

APROVADA em 21 de outubro de 2022.  
Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA-MG  
Dr. Breno Régis Santos UNIFAL-MG  
Dr. Renato Paiva UFLA-MG  
Dr<sup>a</sup>. Vanessa Cristina Stein -UFLA-MG

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
Orientador

Dr. Renan Terassi Pinto  
Coorientador

Dr<sup>a</sup>. Tatiane Casarin  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2022**

À Deus, minha família e amigos, gratidão.  
Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me proteger todo o tempo.

À minha família, em especial meus pais, Cida e Paulo, por estarem ao meu lado durante toda esta etapa, me encorajando sempre.

Aos meus irmãos Isac e Vinicius.

Ao meu namorado Everton por todo apoio e carinho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, pela oportunidade oferecida para a realização do mestrado.

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

Ao meu orientador, Dr. Luciano Vilela Paiva, por todo apoio e orientação durante o desenvolvimento do mestrado, pelos ensinamentos e oportunidades oferecidas para minha carreira profissional e pessoal.

Aos meus coorientadores Dr. Renan e Dra. Tatiane, que tanto me ajudaram neste trabalho, pela paciência, dedicação e ensinamentos desde o início.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Renato, Dra. Vanessa, Dr. Breno, Dr. Wesley e Dr. Welligton, pela participação e disponibilidade para contribuir com esta pesquisa.

Aos meus amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), pela amizade e parceria durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a execução desta pesquisa e conclusão de mais uma etapa especial em minha vida.

*Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles (Augusto Cury).*

## RESUMO

Com o advento da tecnologia CRISPR, a busca por novas técnicas eficientes de cultura de tecidos no cafeeiro tem se intensificado cada vez mais, visando principalmente o aperfeiçoamento de parâmetros relacionados às técnicas utilizadas atualmente, como a baixa eficiência dos eventos de edição e extenso período de tempo para a obtenção de plantas geneticamente editadas. Considerando que o Brasil ocupa a liderança na produção de café, sendo *C. Canephora* a segunda espécie mais cultivada, este trabalho teve como objetivo a determinação de protocolos eficientes de obtenção de embriões somáticos de *C. canephora*, utilizando embriogênese somática direta (ESD) e suspensão celular embriogênica de protoplastos, almejando aplicações em futuros trabalhos com edições genéticas via tecnologia CRISPR/Cas9. Para tal, foram realizados diferentes experimentos de indução ESD em *C. canephora*, inicialmente foram realizados testes para a verificação da influência de diferentes protocolos de ESD (para os clones 2 e 14), sendo também avaliado a influência das diferentes regiões das folhas ao serem inoculadas em meio para ESD (para clone 2), e posteriormente verificou-se a influência de diferentes clones no processo da ESD (para os clones 2, 14 e 22). Concomitantemente, buscou-se neste trabalho a indução de embriões somáticos de suspensão celular embriogênica de protoplastos (ECS) de *C. canephora* (Clone 14), para isso, utilizou-se meio de cultura Yasuda, enriquecido com carvão e variando agentes antioxidantes, carboidratos e concentrações de ácido abscísico (ABA). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e para as análises dos experimentos de ESD utilizou-se o teste de Tukey a 95% de confiança, já para os experimentos de indução de embriões em ECS, utilizou-se análise de regressão linear. No experimento de ESD foram avaliadas médias de frequência de regeneração e número médio de embriões por explante. Para o experimento de indução de embriões em suspensão celular embriogênica de protoplasto, foi avaliado o número médio de embriões obtidos em cada tratamento. Os resultados alcançados neste estudo, demonstraram que o clone 2 foi mais responsivo na embriogênese somática quando comparado aos clones 14 e 22, tanto em maiores frequências de regeneração de explantes, quanto em números de embriões por cada explante regenerado, indicando assim que a ESD é uma técnica altamente dependente do genótipo. Para o experimento da influência de diferentes regiões da folha na resposta embriogênica, não foi verificado diferenças entre as médias obtidas, assim como para diferentes protocolos utilizados. Tratando-se da indução de formação de embriões somáticos de ECS, foi observado a produção de embriões somente no meio de cultura enriquecido com 30 gL<sup>-1</sup> sacarose e acrescido de ABA, não havendo diferença significativas entre diferentes concentrações de do regulador de crescimento na formação de embriões. Desta forma, conclui-se com este trabalho que é possível utilizar a ESD como forma de regeneração de embriões geneticamente editados, bem como a aplicação de protoplastos na edição do cafeeiro, embora ainda sejam necessários estudos mais aprofundados em relação ao aumento da frequência de regeneração e seu posterior amadurecimento.

**Palavras-chaves:** Protoplastos; Embriogênese somática; Café; Cultivo *in-vitro*.

## ABSTRACT

With the advent of CRISPR technology, the search for new efficient techniques for tissue culture in coffee intensified, mainly aiming at the improvement of parameters related to the techniques currently used, such as the low efficiency of editing events and the long period of time to obtaining genetically modified plants. Considering that Brazil is the leader in coffee production, with *C. Canephora* being the second most cultivated species, this work aimed to determine efficient protocols for obtaining somatic embryos of *C. canephora*, using direct somatic embryogenesis (ESD) and embryogenic cell suspension protoplast (ECS), aiming applications in future work with gene editing via CRISPR/Cas9 technology. For this, different ESD induction experiments were carried out in *C. canephora*, and tests were also carried out to select the influence of different ESD protocols (for clones 2 and 14 they evaluated the influence of different regions of the leaves) inoculated in medium for ESD clone 2), and several different clones (for clone 2, 14) in the process (for clones 22, 11). Concomitantly, was sought in this work, the induction of somatic embryos from embryogenic cell suspension protoplasts of *C. canephora* (Clone 14), for this, Yasuda culture medium was used, enriched with charcoal, varying antioxidant agents, carbohydrates and abscisic acid (ABA) concentrations. The experiments were carried out in a completely randomized design and for the analysis of the ESD experiments, the Tukey test was used at 95% confidence, and for the experiments of induction of embryos in embryogenic cell suspension of protoplasts, regression analysis was used linear. In the ESD experiment, means of regeneration frequency and mean number of embryos per explant were evaluated. For the embryo induction experiment in protoplast callus, the average number of embryos obtained in each treatment was evaluated. The results achieved in this study showed that clone 2 was more responsive in somatic embryogenesis when compared to clones 14 and 22, both in higher explant regeneration frequencies and in number of embryos per regenerated explant, thus indicating that ESD is a highly genotype-dependent technique. For the experiment on the influence of different regions of the leaf on the embryogenic response, no differences were found between the means obtained, as well as for different protocols used. Concerning the induction of formation of ECS somatic embryos, the production of embryos was observed only in the culture medium enriched with 30 gL<sup>-1</sup> sucrose and added of ABA, with no significant difference between different concentrations of the growth regulator in the formation of embryos. In this way, it is concluded with this work that it is possible to use ESD as a way of regenerating genetically edited embryos, as well as the application of protoplasts in the *coffee* edition, although further studies are still needed in relation to the increase in the frequency of regeneration and its further maturation.

**Keywords:** Protoplasts; Somatic embryogenesis; *Coffee*; *In-vitro* cultivation.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<i>Coffea Canephora</i> .....	<b>12</b>
<b>2.2</b>	Transformação genética em <i>Coffea</i> .....	<b>13</b>
<b>2.3</b>	Embriogenese somática em <i>C. canephora</i> .....	<b>15</b>
<b>2.4</b>	Protoplastos em <i>C. canephora</i> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>20</b>
	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>26</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1</b>	Material vegetal .....	<b>29</b>
<b>2.2</b>	Indução de embriogênese somática direta por diferentes protocolos em <i>C. canephora</i> .....	<b>29</b>
<b>2.2.1</b>	Avaliação e manutenção dos embriões somáticos .....	<b>30</b>
<b>2.2.2</b>	Delineamento experimental e tratamento estatístico .....	<b>30</b>
<b>2.3</b>	Indução de embriogênese somática em explantes de diferentes posições na folha .....	<b>30</b>
<b>2.3.1</b>	Avaliações e manutenção dos embriões somáticos .....	<b>32</b>
<b>2.3.2</b>	Delineamento experimental e tratamento estatístico .....	<b>32</b>
<b>2.4</b>	Indução de Embriogênese somática utilizando diferentes clones de <i>C. canephora</i> .....	<b>32</b>
<b>2.4.1</b>	Avaliação da Frequência embrionária e quantificação do número de embriões .....	<b>33</b>
<b>2.4.2</b>	Delineamento experimental e tratamento estatístico .....	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1</b>	Embriogênese somática direta de <i>C. canephora</i> (clones 2 e 14) em diferentes protocolos .....	<b>34</b>
<b>3.2</b>	Indução de embriogenese somática direta em diferentes regiões da folha .....	<b>38</b>
<b>3.3</b>	Indução de embriogênese somática direta em diferentes clones de <i>C. canephora</i> .....	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>
	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>47</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1</b>	Material vegetal .....	<b>49</b>
<b>2.2</b>	Análise de dupla coloração para determinação da viabilidade embriogênica .....	<b>49</b>
<b>2.3</b>	Indução de regeneração embrionária .....	<b>50</b>
<b>2.3.1</b>	Experimento 1 .....	<b>51</b>
<b>2.3.2</b>	Experimento 2 .....	<b>51</b>
<b>2.3.3</b>	Experimento 3 .....	<b>51</b>

2.3.4	Experimento 4 .....	51
2.4	Manutenção e avaliações dos embriões .....	51
2.5	Delineamento experimental e Análises estatística .....	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
3.1	Viabilidade embriogênica da suspensão celular embriogênica de protoplastos .....	53
3.2	Regeneração embriogênica de protoplastos de <i>C. canephora</i> .....	53
4	CONCLUSÕES .....	58
5	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	59
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	62

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Apreciado mundialmente, o café é uma das commodities mais consumidas e comercializadas na sociedade (DURÁN *et al.*, 2017). Neste cenário, o Brasil ocupa a liderança na produção e exportação do grão, representando cerca de 42% de toda a produção mundial na safra de 2020/2021, sendo que deste volume, 38% é atribuído para a espécie *Coffea canephora* (DAVIS *et al.*, 2011; VOLSI *et al.*, 2019; CONAB, 2022).

*C. canephora* é a segunda espécie do gênero *Coffea* mais cultivada em todo mundo, sua produção tem sido destinada principalmente a indústria de cafés solúveis e blends, dado a maior disponibilidade de cafeína encontrada no grão e sabor amargo característico, quando comparada a espécie *Coffea arabica* (RONCHI, 2009). Agronomicamente, *C. canephora* é descrita pela alta rusticidade, resistência a pragas e doenças, tolerância a altas temperaturas e déficit hídrico, além de ser menos afetada pela bienalidade (FERRÃO *et al.*, 2020). Tais características, somadas a alta variabilidade genética da espécie, justificam o seu expressivo emprego em programas de melhoramento genético do cafeeiro (ETIENNE, 2005).

Com os adventos das técnicas biotecnológicas no cenário atual, diversos grupos de pesquisa têm focado em trabalhos relacionados ao melhoramento genético do cafeeiro, buscando aprimoramentos principalmente na resistência a pragas e doenças, tolerância a herbicidas, secas e geadas, bem como na qualidade da bebida (RIBAS *et al.*, 2003; AQUINO, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; MOHANAN *et al.*, 2014, MORAIS e MELO, 2011). Com o surgimento da tecnologia CRISPR/Cas9 (CHARPENTIER e DOUDNA, 2013), estratégias potentes vêm sendo traçadas para a obtenção de clones de elite no gênero *Coffea* (BREITLER *et al.*, 2018; CASARIN, 2020).

Dentre os primeiros métodos utilizados em estudos de transformação genética do cafeeiro, está a eletroporação de protoplastos (BARTON *et al.*, 1991), no entanto, não houve sucesso na regeneração das plantas. Atualmente o principal método utilizado para a obtenção de plantas geneticamente transformadas no gênero *Coffea* tem sido a infecção de calos embriogênicos, obtidos através da técnica de embriogênese somática indireta (ESI), entretanto, o processo é limitado, a devido à dificuldade de obtenção e manutenção de células embriogênicas da espécie e ao extenso tempo para regeneração da planta (cerca de nove meses), (RIBAS *et al.*, 2011., CASARIN, 2020).

Na busca pela otimização dos protocolos utilizados hoje na transformação

genética do cafeeiro, diferentes abordagens tem sido estudadas, principalmente na cultura de tecidos vegetais, dentre as quais destaca-se a embriogênese somática direta (ESD), técnica utilizada na produção de clones uniformes e isentos de pragas em alta escala no cafeeiro, além disso, a ESD é uma alternativa para redução de tempo na transformação genética do cafeeiro, visto que, a formação do embrião ocorre diretamente do material inoculado, sem passar por fases intermediárias de calos, contribuindo para a regeneração de embriões transformados em menor período de tempo, o que leva diminuição de custos e mão de obra técnica (RIBAS *et al.*, 2011; GHANTI *et al.*, 2010; PAIVA NETO, 2003). Autores têm demonstrado êxito na obtenção de embriões somáticos transformados ao induzir ESD em hipocótilos de *C. canephora*, constatando regeneração de embriões globulares transformados após 6 semanas da inoculação do material (SRIDEV *et al.*, 2010; AVINASH *et al.*, 2018).

O isolamento de protoplastos, técnica já dominada há mais de trinta anos tem sido utilizada para diversas manipulações experimentais (PIETRZAK *et al.*, 1986, WOO, 2009), surge hoje também, como um método de grande potencial para a edição genética do cafeeiro (FREITAS *et al.*, 2019). Embora haja grande dificuldade na regeneração destas células em plantas completas, com o surgimento de CRISPR/Cas9, pesquisadores tem dado foco ao método que permite a entrega direta do sistema a célula, através da introdução da proteína Cas9 associada ao RNA guia (sgRNA) no citoplasma celular, não deixando vestígios de DNA exógeno no genoma hospedeiro, o que facilita a liberação comercial da planta geneticamente transformada, quando comparado a sistemas de entrega do plasmídeo por metodologias convencionais de transformação genética (LUO *et al.*, 2015).

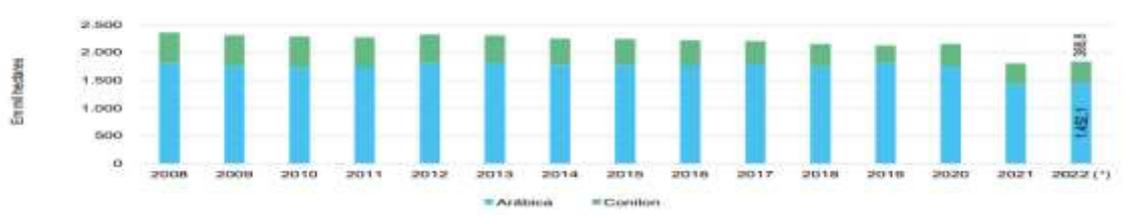
Técnicas de engenharia genética precisas aliadas a protocolos eficientes de indução de embriões e regeneração de plantas *in vitro* tem possibilitado grandes avanços na edição genética do cafeeiro. Considerando que o sucesso no cultivo *in vitro* de *C. canephora* é dependente das composições do meio de cultura, bem como o genótipo utilizado, torna-se extremamente necessário a busca pela aprimoração de técnicas e protocolos utilizados atualmente (SALAÜN *et al.*, 2021; BARRETO *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2019). Neste contexto, esta pesquisa tem como objetivo a otimização de protocolos referentes a embriogênese somática direta e regeneração de células de suspensão de protoplastos, visando aplicações em futuros trabalhos com transformação genética e edição genômica do cafeeiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Coffea Canephora*

Originário da Etiópia (África), o gênero *Coffea* pertencente à família Rubiaceae, abrange plantas dicotiledôneas, com folhas perenifólias, flores hermafroditas, caule lenhoso e porte arbustivo ou até arbóreo (LIVRAMENTO, 2010). Dentre as inúmeras espécies, apenas duas dominam a produção mundial, sendo *Coffea arabica* 65% e *C. canephora* 35%, sendo exploradas também no Brasil, como demonstrado na Figura 1 (DAVIS *et al.*, 2011; FERRÃO *et al.*, 2019, CONAB, 2022).

Figura 1 - Produção de café no Brasil nos últimos 14 anos.



Fonte: CONAB, 2022.

A espécie *C. canephora* é caracterizada por apresentar diploidia ( $n=11$ ) e polinização alógama superior a 95%, agronomicamente tem porte arbustivo multicaular, sendo também descrita pela alta rusticidade contra pragas, doenças e déficit hídrico, além de ser menos afetada pela produção bienal. Outra característica marcante da espécie, *C. canephora* possui altos teores de cafeína nos grãos, que juntamente com seu sabor amargo, faz com que a maior parte da sua produção seja destinada a composição de cafés solúveis e blends juntamente com a espécie *C. arabica* (RONCHI, 2009).

Para o cultivo, a espécie é adaptada a condições climáticas de regiões de baixas altitudes e de clima quente, sendo que no Brasil, o cultivo de *C. canephora* está concentrado principalmente em locais com altitudes inferiores a 500 m, e temperaturas médias anuais de 22 a 26 °C, cerca de 87% da produção nacional concentra-se no estado do Espírito Santo, na região sudeste, e também no norte do país em Rondônia (Figura 2) (MARTINS *et al.*, 2006).

Figura 2 - Cultivo de *Coffea Canephora* na região amazônica



Legenda: A: Cultura de *C. canephora*; B: Floração em *C. canephora*; C: Produção de frutos de café em *C. canephora*.

Fonte: EMBRAPA, 2022.

Dentre as 30 cultivares de *C. canephora* registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2020), clone 2 é descrito na literatura como um genótipo de alta produtividade, já clone 14 é descrito por possuir maior tolerância a seca devido à alta expressão de genes relacionados a respostas de tolerância ao déficit hídrico, para clone 22 são atribuídas características relacionadas a maior susceptibilidade a seca (FAZUOLI, 2015; REICHEL, 2016; TORRES *et al.*, 2019).

Considerando a expansão da espécie *C. canephora* no mercado, devido à alta variabilidade genética e maior rusticidade contra pragas, doenças e déficit hídrico, inúmeros grupos de pesquisa tem estado à frente dos estudos relacionados ao melhoramento genético do cafeeiro, especialmente para a obtenção de cultivares com características superiores (FERRÃO *et al.*, 2020; BERTRAND *et al.*, 2003; BRAGANÇA *et al.*, 2001). Além do melhoramento genético, a utilização de ferramentas biotecnológicas para a transformação genética pode oferece inúmeras vantagens na obtenção de clones de elite na espécie (MORAIS e MELO, 2011).

## 2.2 Transformação Genética em *Coffea*

Uma das principais vantagens da transformação genética é a quebra da limitação imposta pela incompatibilidade genética entre diferentes espécies, permitindo a

expressão de características que dificilmente seriam reunidas em uma cultivar obtida por cruzamentos (CARVALHO *et al.*, 2011; RIVERA *et al.*, 2012; MEDINA-FILHO *et al.* 1977). Com o avanço da biotecnologia, técnicas de transformação genética têm sido amplamente empregues em estudos relacionados a obtenção de genótipos com características elite no gênero *Coffea* (MORAIS e MELO, 2011).

O processo de transformação genética é composto por diferentes etapas, sendo que inicialmente ocorre o isolamento e introdução do DNA exógeno na célula (Etapa 1), posteriormente é necessário a seleção e desenvolvimento das células que foram transformadas (Etapa 2), e a última fase do processo (Etapa 3), está relacionada ao sistema de regeneração eficiente destas células (DUSI, 1999).

A infecção via *Agrobacterium tumefaciens* é o método biológico mais comumente utilizado em transformações genéticas, o mecanismo baseia-se no sistema natural da bactéria em infectar células vegetais (PACURAR *et al.*, 2011). *A. tumefaciens* possui a capacidade de reconhecer células injuriadas e inserir no genoma vegetal o T-DNA, região localizada no plasmídeo *TI* (*tumor inducing*). Esta região contém genes responsáveis pela produção de hormônios (auxinas e citocininas) e pela produção de opinas, compostos usados como fonte de carbono e nitrogênio pela bactéria (WILLMITZER *et al.*, 1980; ZANETTINI e PASQUALI, 2004). A adaptação da maquinaria da *A. tumefaciens* tornou-se fundamental na transformação genética de plantas, possibilitando que, através de colônias *A. tumefaciens* desarmadas seja possível inserir genes de interesse no T-DNA, que serão direcionados ao genoma vegetal, através dos genes *vir* (ZANETTINI e PASQUALI, 2004).

No cafeeiro, pesquisas envolvendo transformação genética tem buscado principalmente melhorias na resistência a pragas e doenças, tolerância a secas e geadas, bem como na qualidade da bebida (RIBAS *et al.* 2003; AQUINO, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; MOHANAN *et al.*, 2014). Para isto, os principais tecidos utilizados para transformação genética são calos embriogênicos obtidos por embriogênese somática direta, processo que leva 6 a 8 meses (RIBAS *et al.*, 2011). Entretanto, Sridev *et al.* (2010), obtiveram eficácia de 2–5% na obtenção de embriões somáticos transformados via *A. tumefaciens*, através da indução da técnica de embriogênese somática direta, a partir de hipocótilos de *C. canephora*. Após 6 semanas foi possível visualizar embriões globulares transformados. Já Avinash *et al.* (2010), obtiveram êxito utilizando tecidos embrionários para transformação genética de *C. canephora* via *A. tumefaciens*.

Embora as técnicas de transformações e edições genéticas atuais tenham possibilitado grandes avanços na obtenção de plantas com características superiores, limitações quanto a integração aleatória do T-DNA no genoma vegetal, ainda tem sido desafiador. Neste sentido, o surgimento de novas tecnologias precisas, como o sistema CRISPR/Cas9 do inglês (Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas), tem permitido o direcionamento específico da edição genética no genoma vegetal, gerando alterações precisas por meio de sistemas de reparo endógenos da espécie (KIM, 2014; CASARIN *et al.*, 2022).

### 2.3 Embriogênese Somática em *C. canephora*

A embriogênese somática é a técnica utilizada para a obtenção de embriões somáticos à partir de células somáticas ou células já diferenciadas e baseia-se na capacidade da célula vegetal em desdiferenciar-se e rediferenciar-se na presença de estímulos químicos, que posteriormente induzem a célula a alterações morfológicas e bioquímicas, culminando no desenvolvimento do embrião (GUERRA e NODARI, 2006; TERMIGNONI, 2005; ISAH, 2016).

Desde meados de 1990, a embriogênese somática (SE) tem possibilitado a propagação de variedades selecionadas das duas espécies de café cultivadas, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (Etienne *et al.*, 2018). Além da propagação e multiplicação massiva de clones, outra vantagem da embriogênese somática é o emprego da técnica para regeneração de plantas geneticamente transformadas (ZENG *et al.*, 2006, OLIVEIRA, 2019).

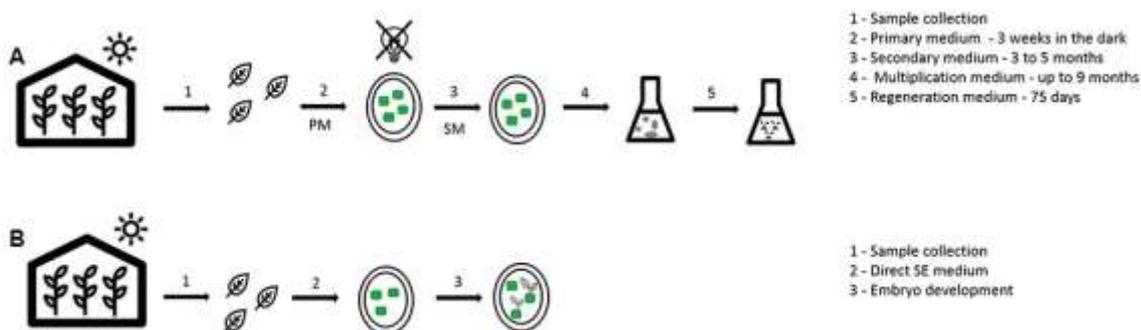
Figura 3 - Processo geral da embriogênese somática em *Coffea*.



Legenda: Etapas da indução de embriogênese somática em *Coffea*  
 Fonte: ETIENE *et al.*, 2018.

Dois padrões de embriogênese somática podem ser conduzidos, a embriogênese somática direta (ESD), no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes, sem a formação de estruturas calogênicas e a embriogênese somática indireta (ESI), quando os embriões formam-se à partir de calos embriogênicos (GUERRA e NODARI, 2006). As concentrações dos reguladores de crescimento utilizados e suas interações, são os principais fatores envolvidos em cada tipo de embriogênese somática (ROJAS-HERRERA *et al.*, 2002; VIEIRA e KOBAYASHI, 2000).

Figura 3 - Esquema geral da embriogênese somática direta e indireta no cafeeiro.



Legenda: Diferentes padrões de condução de embriogênese somática no cafeeiro.  
 Fonte: CAMPOS, 2017.

Em programas de melhoramento genético do cafeeiro, ESI tem sido o principal modelo utilizado, no entanto, a transformação de calos até a planta regenerada leva em média nove meses (RIBAS *et al.*, 2011), devido à baixa eficiência na transformação genética no café (menos de 1%), junto a dificuldade de manutenção de calos *in vitro* por longo período, torna-se extremamente importante a busca por técnicas que otimizem e acelerem este processo. Neste sentido, a embriogênese somática direta (ESD) é uma alternativa, principalmente devido à redução de tempo requerido para obtenção de embriões somáticos, vantagens extremamente relevantes para programas de transformações genéticas (GHANTI *et al.*, 2010; PAIVA-NETO, 2003).

*C. canephora* tem sido amplamente utilizado como modelo em trabalhos relacionados a embriogênese somática direta, visto que, a espécie é diplóide e bastante responsiva para a formação de embriões somáticos em meio de cultura suplementado com citocinina (VIEIRA e KOBAYASHI, 2000; FUENTES *et al.*, 2000). Pesquisas

conduzidas por Hatanaka *et al.*, (1991), revelaram a viabilidade na obtenção de embriões diretamente de explantes foliares. Estudos mais atuais em *C. canephora* demonstram que a resposta da ESD tem sido eficiente e as primeiras mudanças nos explantes são observadas entre 7 e 14 dias, e aos 56 dias, embriões cotiledonares podem ser amplamente visualizados (NIC-CAN *et al.*; 2015).

No cafeeiro o sucesso da ESD, é influenciado diretamente por fatores como o genótipo utilizado (PRIYONO *et al.*, 2010), explante inicial (DAM *et al.*, 2010), e tipo de protocolo (regulador de crescimento, carboidratos, vitaminas, composição de nutrientes e luminosidade) utilizado para indução e regeneração de embriões (GATICA *et al.*, 2008; SAMSON *et al.*, 2006). No entanto, estudos mais aprofundados em relação aos tecidos embriogênicos e não embriogênicos são extremamente importantes para a elucidação de métodos eficientes e adequados para a obtenção de embriões somáticos (FERRARI *et al.*, 2021).

Aliados a técnicas biotecnológicas e em busca de eficiência e reprodutibilidade, diferentes protocolos de ESD têm sido testados, alterando composições no meio de cultura, bem como o genótipo utilizado (SALAÜN, C. *et al.*, 2021; FREITAS *et al.*, 2019). Neste sentido, definir protocolos ideais de ESD é extremamente relevante para o processo contínuo e em larga escala de produção de plantas geneticamente transformadas ou editadas em menor período de tempo.

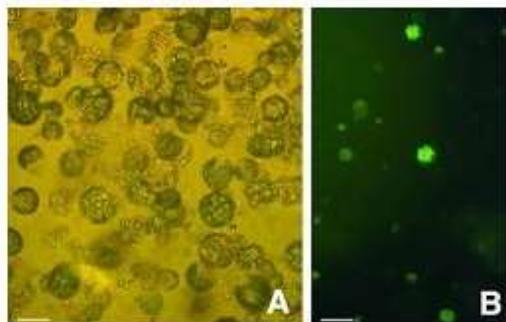
#### **2.4 Protoplastos em *C. canephora***

Protoplasto é a denominação de uma célula desprovida de parede celular, o termo foi proposto na década de 80 por Hanstein (1980), no entanto os primeiros estudos relacionados a ausência da parede celular em células vegetais, foi estabelecido por Gregory e Cocking ainda em 1965 à partir de tecidos parenquimáticos de frutos de tomate. Posteriormente, o mesmo autor demonstraria a possibilidade da regeneração de protoplastos em plantas completamente formadas (COCKING, 1972). Alguns anos mais tarde a regeneração de protoplastos em plantas dicotiledôneas também seria elucidada (ANDRIANKAJA *et al.*, 2012).

O método de extração da parede celular, definido como isolamento de protoplastos, é um processo complexo e dependente de temperaturas e enzimas específicas que atuam degradando os diferentes componentes da parede celular vegetal, composta principalmente por moléculas de pectina (primeiro composto a ser

sintetizados durante a formação da parede celular primária), e hemicelulose (ligantes de polissacarídeos que agregam a celulose, um dos principais componentes da parede celular de células vegetais ) (COSGROVE, 2005; PATERNAK, 2020; SILVA, 2020).

Figura 4 - Isolamento de protoplastos em *Anthurium spathiphyllum*



Legenda: A: Protoplastos de folhas de *Spathiphyllum spathiphyllum*, B: Protoplastos de embriões corados com FDA  
Fonte: DUQUENNE, 2007.

Inicialmente os estudos com protoplastos em plantas foram concentrados em técnicas de análises moleculares (expressão transiente e heteróloga), bem como metabolismo e reprogramação celular (EECKHAUT, *et al.*, 2013; YOO, CHO, SHEN, 2007). Com o surgimento da tecnologia CRISPR, o interesse pela pesquisa com protoplastos foi renovado, principalmente por fatores relacionados a possibilidade de entrega direta do sistema CRISPR/Cas9 a célula vegetal, através da introdução da proteína Cas9 associada ao RNA guia (sgRNA) no citoplasma celular, desta forma não deixando vestígios de DNA exógeno no genoma hospedeiro, o que facilita a liberação comercial da planta geneticamente editada, quando comparado ao sistema de entrega direta do plasmídeo (PASTERNAK *et al.*, 2020; WOO *et al.*, 2015 ; LUO *et al.*, 2015).

Calos de protoplastos, assim denominado o protoplasto após a regeneração completa da parede celular, são células totipotentes com potencial para a formação de embriões somáticos (EECKHAUT *et al.*, 2013). Ainda segundo o mesmo autor, o principal gargalo da técnica está na dificuldade da regeneração do material plantas completas. Neste sentido, a comparação das etapas de formação do embrião somático com o embrião zigótico, pode fornecer informações essenciais a resposta embriogênica, visto que, a partir da fase globular ambos os desenvolvimentos embrionários apresentam estádios morfológico similares (SILVA, 2005). Considerando esta abordagem, a ação de reguladores hormonais presentes durante a formação do embrião zigótico pode ser a

chave na indução da embriogênese somática (CORREIA, 2010).

Durante a última fase da embriogênese zigótica, o ácido abscísico é responsável pela dessecação e maturação do embrião, atuando na biosíntese de proteínas de reserva (DODEMAN., 1997), controle da expansão celular (GUTMANN., 1997) e biossíntese de triacélglicos (TAUTORUS, 1991). Nesta perspectiva, buscando simular situações de estresse que levam a maturação, o ácido abscísico tem sido amplamente utilizado na dessecação de embriões somáticos, associado ou não a outras substâncias desseccantes como polietilenoglicol (SILVA, 2005; ANDRADE, 2010; CORREIA, 2010).

A suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento e compostos antioxidantes na regeneração de embriões somáticos de calos de protoplastos tem gerado resultados satisfatórios na regeneração de plantas de diversas espécies monocotiledôneas, como milho (HE *et al.*, 2006) e tabaco (PATI *et al.*, 2005) e para espécies dicotiledôneas, como citros (OLIVARES, 2006) e acácia (KANWAR *et al.*, 2009).

Para a espécie *C. canephora* o isolamento de protoplastos tem tido êxito em diversos estudos, nos quais os principais tecidos utilizados são células meristemáticas de embriões (SCHÖPKE, 1987, ORGITA, 2020) e folhas (SILVA, 2020). No entanto, se tratando de regeneração de protoplastos na espécie, poucos são os relatos de sucesso, isto devido à grande dificuldade manter o material e das baixas frequências na regeneração de embriões (SCHÖPKE, 1987). Neste cenário, torna-se extremamente importante a busca por adaptações dos protocolos utilizados hoje na regeneração de protoplastos, buscando principalmente eficiência e repetibilidade da técnica, visionando aplicações em futuros trabalhos com edições genéticas da espécie.

## REFERENCIAS

- ALBUQUERQUE, E. V. S. *et al.* Seed-Specific Stable Expression of the  $\alpha$ -AI1 Inhibitor in *Coffea* Grains and the *in vivo* Implications for the Development of the Coffee Berry Borer. **Tropical plant biology**, v. 8, n. 3–4, p. 98–107, 2015.
- ANDRADE, J. B. **Efeito dos agentes de maturação, ABA, PEG e maltose, na produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia***. Tese (Doutorado em ciências biológicas) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- AQUINO, S. O. **Análise funcional da região promotora de haplótipos do gene CcDREB1D de *Coffea canephora* via transformação genética de *Nicotiana tacabum* cv. SRI**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, 2014.
- BARRETO, H. G. *et al.* In Silico and Quantitative Analyses of the Putative FLC-like Homologue in Coffee (*Coffea arabica* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 29–35, 2012.
- BARTON, C. R.; ADAMS, T. L.; ZAROWITZ, M. A. Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plants. In: **14. Colloque Scientifique International sur le Cafe, San Francisco (Etats Unis), 14-19 Jul 1991**. ASIC, 1992.
- BRAGANÇA, M. *et al.* Variedades clonais de café Conilon 33 para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 765–770, 2001.
- BREITLER, J. *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, 2018.
- CASARIN, T. **Embriogênese somática e validação do sistema crispr/cas9 em *Coffea canephora***. Tese (Doutorado-Biotecnologia Vegetal) UFLA - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.
- CASARIN, T. *et al.* Multiplex CRISPR/Cas9-mediated knockout of the phytoene desaturase gene in *Coffea canephora*. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2022.
- CAMPOS, N. A; PANIS, B; CARPENTIER, S. C. Somatic embryogenesis in *coffee*: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1460, 2017.
- CHARPENTIER, E; DOUDNA, J. A. Rewriting a genome. **Nature**, v. 495, n. 7439, p. 50-51, 2013.
- COCKING, E. C. Protoplastos de Células Vegetais - Isolamento e Desenvolvimento. Anu. Rev. **Plant Physiol.**1972.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Terceiro boletim de acompanhamento de safra de 2022, Brasília, DF**. v 9, n 3, 2022.

COSGROVE, D. J.; **Growth of the plant cell wall. Natures Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850, 2005.

DAM, A.; PAUL, S.; BANDYOPADHYAY, T. K. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Limonium sinensis* (Girard) Kuntze. **Scientia Horticulturae, Amsterdam**, v. 126, n. 2, p. 253-260, set. 2010.

DAVIS, A.P. *et al.* Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the linnean society**, London, v.167, n.4, p.357-377, Dec. 2011.

Duquenne, B., Eeckhaut, T., Werbrouck, S. *et al.* Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 91, 165–173, 2007.

DURÁN, C. A. A. *et al.* Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual de Química**. v. 9, n. 1, p. 107–134, 2017.

EECKHAUT, T; LAKSHMANAN, P.S; DERYCKERE, D. *et al.* Progresso na pesquisa de protoplastos vegetais. **Planta**, v. 238, p. 991-1003, 2013.

ETIENNE, H. Somatic Embryogenesis Protocol: *Coffee (Coffea arabica L. and C. canephora P.)*. In: Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. [s.l.]: **Springer-Verlag**, 2005.

ETIENNE H. *et al.* Coffee Somatic Embryogenesis: How Did Research, Experience Gained and Innovations Promote the Commercial Propagation of Elite Clones From the Two Cultivated Species? **Front Plant Sci**. Nov 12;9:1630, 2018.

FAZUOLI *et al.* **Características agronômicas de dez clones de café da cultivar conilon vitória de *Coffea canephora*, em Mococa-SP**. IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 24 a 26 de junho de 2015, Curitiba – PR.

FERRÃO, M.A.G. *et al.* Origin, geographical dispersion, taxonomy and genetic diversity of *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R.G. *et al.*, (ed.). **Conilon coffee**. 3rd ed. up. and exp. Vitoria: INCAPER. cap.4, p.85-109, 2019.

FERRÃO, M.A.G. *et al.*, Cultivares de cafés Conilon e Robusta. **Informe Agropecuário. Cafés Conilon e Robusta: potencialidades e desafios**, Belo Horizonte, v.41, n.309, p.17-25, 2020.

FERRARI, I.F; MARQUES, G.A; JUNIOR, W. L. S *et al.* A ontogênese comparativa de embriões somáticos de *Coffea arabica L.* revela a eficiência da regeneração modulada pela fonte do explante e pela via de embriogênese. **In Vitro Cell. Dev. Biol. - Planta** 57, 796-810, 2021.

FREITAS, Natália Chagas. **Sistema CRISPR/Cas9 visando a edição genômica no alotetraploide *Coffea arabica***. 2019. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

FUENTES, S. R. L, *et al.* 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, 2000.

GATICA A. M; ARRIETA G; ESPINOSA A. M. Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L cvs catura and catuai: effect of triacontanol, light condition, and medium consistence. **Agronomia Costarricense** 32(1):139–147, 2008.

GHANTI, S. K. *et al.* Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p.121- 125, Jan, 2010.

GREGORY, D.W; COCKING, E.C. O isolamento em larga escala de protoplastos de frutos de tomate imaturos. **J. Ebulição Celular**.v. 24, p. 143-146,1965.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia I – cultura de tecidos vegetal**. Florianópolis: Steinmacher, 2006.

HATANAKA T. *et al.* Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell**. Rep 10:179–182, 1991.

HE G, *et al.* An improved system to establish highly embryogenic haploid cell and protoplast cultures from pollen calluses of maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Tiss Org** 86:15–25, 2006.

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38(5): p.118. 2016.

KANWAR, K; BHARDWAJ, A; DEEPIKA, R. Efficient regeneration of plantlets from callus and mesophyll derived protoplasts of *Robinia pseudoacacia* L. **Plant Cell Tiss Org**, v. 96, p. 95–103, 2009.

KUMAR, A; SIMMI, P; GIRIDHAR, P. Cell wall remodelling involving galactomannan de-branching influence Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Coffea canephora* somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 134, n. 3, p. 369-382, 2018.

LIVRAMENTO, D. E. Do. Morfologia e fisiologia do cafeeiro. Café arábica: do plantio à colheita. Lavras: EPAMIG, p. 87–161, 2010.

LUO, S, *et al.* Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases. **Molecular Plant**, v. 8, n. 9, p. 1425-1427.set, 2015.

MACIEL, A.L.R.; PASQUAL, M; PEREIRA, A.R.; REZENDE, J.C.; SILVA, A.B.; DUTRA, L.F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Oboatã. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 27(1), p. 107-116, 2003.

MARTINS, C, *et al.* **Crescimento inicial do café Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex *Froehner*) sob diferentes lâminas de irrigação**. Engenharia na Agricultura, v. 14(3), p.193-201, 2006.

MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; MONACO, L.C. Melhoramento do cafeeiro. XXXVII. **Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro.** *Bragantia*, Campinas, v.36, p.131-137, 1977.

MOHANAN, *et al.* Evaluating the effect and effectiveness of different constructs with a conserved sequence for silencing of *Coffea canephora* N-methyltransferases. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 399–409, 2014.

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

NIC-CAN, *et al.* New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. **Plos one**, v. 8, n. 8, 2013.

OLIVARES-FUSTER, O., DURAN-VILA, N. & NAVARRO, L. Electrochemical protoplast fusion in citrus. **Plant Cell**, v. 24, p. 112–119, 2005.

PAIVA NETO, V. B.; BOTELHO, M. N.; AGUIAR, R.; SILVA, E. M., OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant**, v. 39, p. 629-634, 2003.

PASTERNAK, TARAS *et al.* De célula única a plantas: protoplastos de mesofilo como um sistema versátil para investigar a reprogramação de células vegetais. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 21, p. 12 4195, 2020.

PATI, P; SHARMA, M; AHUJA, P. R. protoplast isolation and culture and heterokaryon selection by immobilization in extra thin alginate film. **Protoplasma** 233:165–171, 2008.

PIETRZAK, M, *et al.* Expressão em plantas de dois genes de resistência a antibióticos bacterianos após a transformação de protoplastos 53 com um novo vetor de expressão vegetal. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 14, p. 5857-5868, 11 jul. 1986.

PRIYONO *et al.* Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 343–357, 2010.

REICHEL, T. Análise da expressão dos genes da subfamília DREB em resposta à seca em plantas de *Coffea canephora* Conilon. [S. l.], 2016.

REIS, M. V. **Caracterização de massas pró-embriogênicas de ypê branco.** Dissertação (Mestrado em fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras. 2010.

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

RIBAS, *et al.* Transformação genética de *Coffea canephora* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com gene heterólogo de ACC-oxidase na orientação anti-

- senso. **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil** (Porto Seguro, BA). Resumos. Brasília, D.F.: Embrapa Café, 2003.
- RIVERA, A. L.; GÓMEZ-LIM, M.; FERNÁNDEZ, F.; LOSKE, A. M. Physical methods for genetic plant transformation. **Physics of Life Reviews**, v. 9, n. 3, p. 308–345, 2012.
- RONCHI, Cláudio Pagotto. Emprego adequado da poda para renovação do cafeeiro conilon. 2009.
- SALAÜN, C.; LEPINIEC, L.; DUBREUCQ, B. Genetic and Molecular Control of Somatic Embryogenesis. **Plants**, 2021.
- SAMSON N, *et al.* Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 86:37–45, 2006.
- SCHÖPKE, C; MÜLLER, L. E; KOHLENBACH, H. W. Embriogênese somática e regeneração de plântulas em culturas de protoplastos de embriões somáticos de café (*Coffea canephora* P. ex Fr.). **Plant Cell Tiss Organ**, v. 8, p. 243-248, 1987.
- SILVA, T. **Isolamento e regeneração de protoplastos de *Coffea canephora* a partir de suspensão de células.** Dissertação (Mestrado - Biotecnologia Vegetal), UFLA-Universidade Federal de Lavras, 2020.
- SILVA, V, C. **ESTUDO MORFOANATÔMICO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E SOMÁTICOS DE JABUTICABA-BRANCA (*Myrciaria* sp.).** Tese (Doutorado-Fitotecnia) UFV-Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- TAUTORUS, T., FOWKE, L., DUNSTAN, D. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69 (9), p. 1873-1899, 1991.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais.** UFRGS, p.182, 2005.
- TORRES, L. F. *et al.* Expression of DREB-like genes in *Coffea canephora* and *C. arabica* subjected to various types of abiotic stress. **Tropical Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 98-116, 2019.
- VOLSI, B.; TELLES, T. S.; CALDARELLI, C. E.; CAMARA, M. R.G. The dynamics of coffee production in Brazil. **Plos One**, v.14, n.7, p.1-15, 2019.
- VON HANSTEIN, J. **Das protoplasma.** Alemanha: Heidelberg, p. 197, 1980.
- WILLMITZER, L.; DE BEUCKELEER, M. & LEMMERS, M. DNA from Ti Plasmid Present in Nucleus and Absent from Plastids of Crown Gall Plant Cells. **Nature**, Londres, 287: 359-361, 1980.
- WOO, Je Wook; *et al.* Tape-Arabidopsis Sandwich-a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. **Plant methods**, v. 5, n. 1, p. 16, nov. 2009.

YOO, S; CHO, Y; SHEEN, J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1565-1572, 21 jun. 2007.

ZANETTINI, M.H.B; PASQUALI, G. Plantas transgênicas. In: MirL (Ed.) **Genômica**. São Paulo, Atheneu. p. 721-736, 2004.

ZENG, F, *et al.* Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology**, v.60, p.167–183, 2006.

**CAPÍTULO 2**  
**EMBRIOGENESE SOMÁTICA DIRETA EM DIFERENTES**  
**CLONES DE *C. Canephora***

## RESUMO

A embriogênese somática tem possibilitado progresso na obtenção de mudas uniformes e isentas de patógenos em escala no cafeeiro, bem como a regeneração de plantas geneticamente editadas da espécie. A técnica se baseia na capacidade totipotente da célula vegetal e pode ser conduzida via indireta e direta. Em *C. canephora* a embriogênese somática direta (ESD) pode ser influenciada por fatores como o protocolo, tecido e clone utilizado. Considerando as vantagens da utilização da ESD na transformação do cafeeiro, devido ao menor período de tempo para a formação do embrião, este trabalho teve como objetivo verificar a influência do protocolo, da região do explante na folha e de diferentes clones de *C. canephora* na indução da ESD, visando futuras aplicações em edições genéticas com a tecnologia CRISPR. Para tal, foram utilizados diferentes meios de culturas já publicados para a espécie para a indução ESD em *C. canephora* (para os clones 2 e 14), os quais variavam entre tipos e concentrações de vitaminas, proteínas e suplementos. Em seguida também foi verificada a influência das diferentes regiões das folhas ao serem inoculadas em meio para ESD (para o clone 2), e posteriormente verificou-se a influência de diferentes clones no processo da ESD (para os clones 2, 14 e 22). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e para as análises utilizou-se o teste de TUKEY a 95% de confiança. Para as avaliações da influência da região da folha, não houve diferenças significativas, assim como para os diferentes protocolos utilizados. Ainda como resultado deste estudo, foi observado que o clone 2 é mais responsivo a ESD, demonstrando maiores frequências de regeneração e número médio de embriões por explante, quando comparado aos clones 14 e 22. Além disso, o clone 2 se demonstrou mais precoce na resposta a indução embriogênica, considerando que aos 30 dias de inoculação do explante, já foi possível observar o início da formação da massa pré-embriogênica. Conclui-se com este experimento que, a ESD pode ser uma técnica vantajosa para a regeneração de plantas transformadas, sendo o clone 2 altamente viável para a transformação e edição genética de *C. canephora*.

**Palavras-chave:** Café; Cultivo *in-vitro*; Edição genética; Meio de cultura.

## 1. INTRODUÇÃO

A indução da embriogênese somática está relacionada a capacidade da célula vegetal em desdiferenciar-se e rediferenciar-se de acordo com estímulos hormonais, que induzem cascatas de sinalizações internas e culminam na formação de embriões sem que ocorra a fusão de gametas (ZANIN, 2017; ISAH, 2016). A técnica de embriogênese somática tem permitido diversos avanços em relação a propagação massiva de clones de elite de maneira rápida, além de serem isentos de microrganismos (DOMINGHETTI, 2016). Outra aplicação importante da embriogênese somática está no emprego da técnica em programas de melhoramento genético (OLIVEIRA, 2019; ZENG *et al.*, 2006).

A embriogênese somática pode ser conduzida via indireta (ESI), quando ocorre formação de calos intermediários e via direta (ESD), quando o embrião tem origem do próprio explante inoculado (GUERRA e NODARI, 2006). A ESI tem sido o padrão utilizado em transformação genética no cafeeiro, entretanto o longo período para obtenção do calo embriogênico e posterior formação do embrião (21 meses em média), junto à baixa eficiência da transformação da espécie (menos de 1%), tem feito com que outras alternativas mais eficientes sejam buscadas, como a ESD, quando o embrião forma-se em períodos reduzidos (3 meses); (RIBAS, 2011; GHANTI *et al.*, 2010).

De maneira geral a técnica da ESD é influenciada por diversos fatores, para a espécie *C. canephora* especificamente, a resposta na ESD pode variar de acordo com o tipo de protocolo utilizado para a obtenção de embriões somáticos (regulador de crescimento, carboidratos, vitaminas, composição de nutrientes e luminosidade) (GATICA *et al.*, 2008; SAMSON *et al.*, 2006), a fonte e o tipo de explante inicial a ser inoculado (DAM *et al.*, 2010), bem como o genótipo utilizado (PRIYONO *et al.*, 2010).

Na busca de eficiência e reprodutibilidade da ESD em *C. canephora*, pesquisas tem se concentrado na elucidação da capacidade embriogênica de tecidos, além da influência do tipo de protocolo e genótipos utilizados (SALAÜN, C. *et al.*, 2021; BARRETO *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2019; FERRARI *et al.*, 2021). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar influência de diferentes meios de cultura para ESD (para os clones 2 e 14), bem como a influência das diferentes regiões das folhas ao serem inoculadas em meio para ESD (clone 2), e diferentes clones no processo da ESD (clones 2, 14 e 22), visando aplicações em futuros trabalhos de edição genética em *C. canephora*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

O experimento foi desenvolvido no Laboratório Central de Biologia Molecular, (LCBM) localizado na Universidade Federal de Lavras - Brasil. Para os experimentos de embriogênese somática direta foram utilizadas como fonte inicial, folhas oriundas de *C. canephora* clone 2, 14 e 22, cultivadas em câmaras de crescimento de plantas, sob condições de crescimento controladas de 27 °C, luminosidade de 40  $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 8 h de luz.

### 2.2 Indução de Embriogênese somática direta por diferentes protocolos em *C.*

#### *canephora*

Folhas de *C. canephora* (clones 2 e 14), totalmente expandidas do segundo ou terceiro internódio do ramo plagiotrópico foram coletadas no período da manhã. Após a coleta, o material foi lavado em água corrente e detergente comercial para a retirada de resquícios superficiais, em seguida as folhas permaneceram em repouso por 30 minutos, para o completo fechamento estomático. Após este período, em câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas em álcool 70% por 1 min, seguido de 20 minutos em hipoclorito de cálcio (30g L<sup>-1</sup>), acrescido de 5 gotas por litro de *Tween 20*, passando então por tríplice lavagem de 5 min cada, em água destilada autoclavada.

Em seguida, as folhas foram seccionadas em explantes de 0,25 cm<sup>2</sup>, excluindo-se nervuras centrais e bordas externas, sendo então inoculados com face adaxial em contato com o meio de cultura em potes de vidro contendo meio de cultura para a indução de embriões. Para a indução da embriogênese somática direta, foram utilizados três diferentes meios de cultura, já explorados para a espécie, contendo diferentes tipos e proporções de vitaminas, suplementos e reguladores de crescimento (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados para indução de embriogênese somática direta em *C. canephora*.

Tratamentos	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Referência	Quiroz-Figueroa <i>et al.</i> , 2006	Fuente <i>et al.</i> , 2000	Priyono <i>et al.</i> , 2010
Macronutrientes	1/4 MS	1/4 MS	1/2 MS
Micronutrientes	1/4 MS	1/2 MS	1/2 MS
Vitaminas e Suplementos	4,86 $\mu\text{M}$ piridoxina 8,12 $\mu\text{M}$ ác. Nicotínico 29,6 $\mu\text{M}$ tiamina	vitaminas B5 0,8 $\mu\text{M}$ cisteína 29,43 $\mu\text{M}$ AgNO <sub>3</sub>	1/2 vitaminas Gamborg 100mg.L caseína hidrolisada 21 $\mu\text{M}$ Pantetonato de cálcio

			135,7 $\mu\text{M}$ de sulfato de adenina 8,25 $\mu\text{M}$ cisteína
<b>Regulador de Crescimento</b>	5 $\mu\text{M}$ BAP	5 $\mu\text{M}$ 2ip	23,23 $\mu\text{M}$ cinetina
<b>Sacarose</b>	30 $\text{gL}^{-1}$	30 $\text{gL}^{-1}$	40 $\text{gL}^{-1}$
<b>Phytigel</b>	2,5 $\text{gL}^{-1}$	2,5 $\text{gL}^{-1}$	3,0 $\text{gL}^{-1}$

Fonte: (CASARIN, 2020).

Após a inoculação, o material permaneceu em sala de crescimento em fotoperíodo de 8 h de luz e  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$  e intensidade luminosa de aproximadamente  $40 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ . Os explantes foram mantidos nas mesmas condições durante quatro meses, para a formação de embriões.

### 2.2.1 Avaliações e manutenção dos embriões somáticos

Para a avaliação do experimento, foi contabilizada a frequência da regeneração embrionária dos explantes, para tanto, considerou-se explantes com ou sem presença de embriões em relação ao número total de explantes inoculados inicialmente. Posteriormente, os embriões somáticos formados foram unicamente separados do explante inicial, com o auxílio de pinça e bisturi, e transferidos para meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sem a adição de reguladores de crescimento e solidificado com  $2,5 \text{ gL}^{-1}$  de phytigel<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich), pH 5,8; sendo mantidos em condições de sala de crescimento  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$  e intensidade luminosa de cerca de  $40 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ . Os embriões foram subcultivados nas mesmas condições a cada oito semanas até a aclimatização das plantas em substrato comercial em câmaras de crescimento controladas, aos 9 meses em média.

### 2.2.2 Delineamento experimental e tratamento estatístico

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constando de um fatorial  $2 \times 3$ . Para cada tratamento, utilizou-se 30 repetições, sendo que cada repetição era composta por quatro explantes. As médias obtidas da frequência da regeneração embrionária dos explantes foram submetidas a análise de variância – ANOVA por meio do software SISVAR, utilizando o teste de Tukey a 95% de confiança (FERREIRA, 2008).

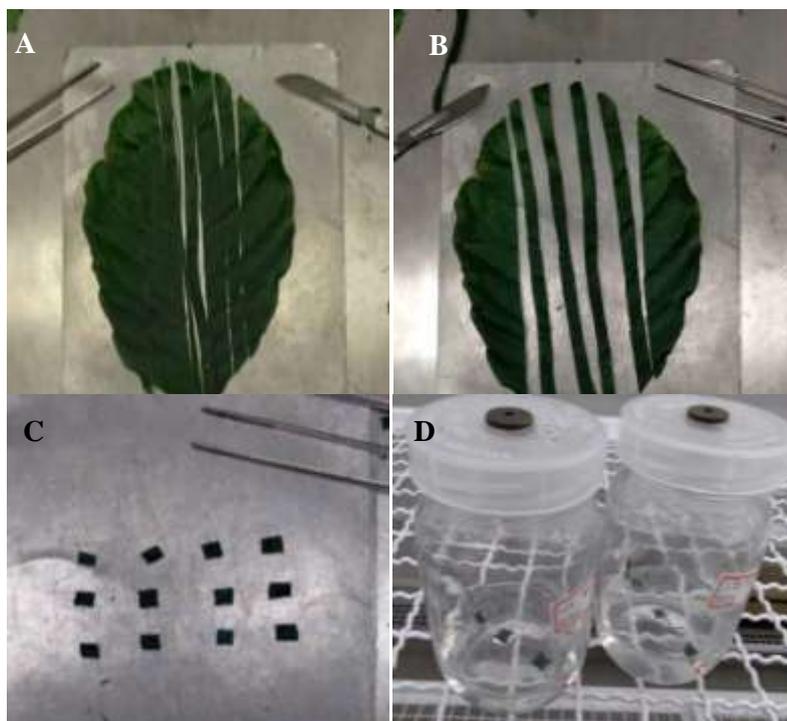
## 2.3 Indução de Embriogênese somática em explantes de diferentes posições na folha

Na busca pela elucidação da influência da região da folha na indução da ESD, folhas de *C. canephora* (clone 2) foram coletadas de plantas em câmara de crescimento controlado e desinfestadas conforme descrito anteriormente (tópico 2.2). Após o processo de desinfestação em câmaras de fluxo laminar, as folhas foram seccionadas em explantes de 0,25 cm<sup>2</sup>.

Para os cortes, foi retirado a nervura central da folha e em seguida a folha foi dividida entre os lados e realizados cortes de quatro faixas, sendo duas faixas do lado esquerdo (Faixa 1 e 2), e duas do lado direito (Faixa 3 e 4). Dentro de cada faixa foram retirados três explantes, sendo o primeiro próximo ao pecíolo foliar (Explante A), o segundo da região mediana da folha (Explante B) e o terceiro próximo ao ápice foliar

Figura 5 - Esquema demonstrando as etapas de corte e inoculação de explantes foliares de *C. canephora*.

(Explante C), como demonstrado na Figura 1.



Legenda: A: Folha fragmentada entre lado esquerdo e direito; B:Folha sem a nervura central e seccionada em 4 faixas de (Lado esquerdo: Faixa 1 e 2; Lado direito: Faixa 3 e 4); C: Explantes separados das faixas; D: Explantes inoculados em meio para ESD. Fonte: Da autora, 2022.

Os explantes foram inoculados em meio para embriogênese somática direta (PRIYONO *et al.*, 2010) com a face adaxial em contato com o meio de cultura e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 8 h de luz  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$  sob intensidade luminosa de cerca de  $40 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ .

### **2.3.1 Avaliações e manutenção dos embriões somáticos**

Para as avaliações, foi calculado a frequência embrionária de cada posição, faixa e explante do material inoculado, considerando a presença ou ausência de embriões nos explantes foliares de cada nível. Após quatro meses, os embriões regenerados foram transferidos para o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sem a adição de reguladores de crescimento e solidificado com  $2,5 \text{ gL}^{-1}$  de phytigel <sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich), pH 5,8; e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 8 h de luz  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$  e intensidade luminosa de cerca de  $40 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ , sendo subcultivados a cada oito semanas até a aclimatização em substrato comercial em câmaras de crescimento controladas, aos nove meses em média.

### **2.3.2 Delineamento experimental e tratamento estatístico**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo constituído de um fatorial de 4x3, com 8 repetições, compostas por um explante cada. As médias obtidas da frequência embrionária dos explantes de cada posição foram submetidas a análise de variância - ANOVA, utilizando o teste de Tukey a 95% de confiança, através do software SISVA (FERREIRA, 2008).

## **2.4 Indução de Embriogênese somática utilizando diferentes clones de *C.***

### ***canephora***

Utilizando a metodologia para indução de embriogênese somática direta em explantes foliares, proposta por Priyono *et al* (2010), foram inoculados três diferentes clones de *C. Canephora* (Clone 2, 14 e 22). Folhas oriundas de plantas cultivadas em câmaras de crescimento controladas, foram coletadas e desinfestadas conforme o protocolo utilizado nos experimentos anteriores (tópico 2.2). Após o processo de desinfestação, as folhas foram inoculadas com a face adaxial em contato com o meio de cultura, sendo mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 8 h de luz  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$  e intensidade luminosa de cerca de  $40 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ .

#### **2.4.1 Avaliação da Frequência embrionária e quantificação do número de embriões**

Após quatro meses inoculados, foi verificado a frequência embrionária, bem como a quantificação dos embriões formados em cada explante de cada clone. Para a frequência levou-se em consideração a presença ou ausência de embriões nos explantes em relação ao número inicial de explantes inoculados.

Para a separação e contabilização dos embriões em câmara de fluxo laminar, utilizou-se pinças cirúrgicas e bisturi, sendo o processo realizado com auxílio de lupas eletrônicas. Após a separação e contagem, os embriões foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sem a adição de reguladores de crescimento e solidificado com 2,5 gL<sup>-1</sup> de Phytigel™ (Sigma-Aldrich), pH 5,8; e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 8 h de luz 27°C ± 2 e intensidade luminosa de cerca de 40 μmol.m<sup>2</sup>. s<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2 Delineamento experimental e tratamento estatístico**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constando de 3 tratamentos com 20 repetições cada. Os dados obtidos da frequência embrionária e número de embriões obtidos de cada clone foram submetidos a análise de variância - ANOVA, através do software SISVAR, utilizando o teste de Tukey a 95% de confiança (FERREIRA, 2008).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

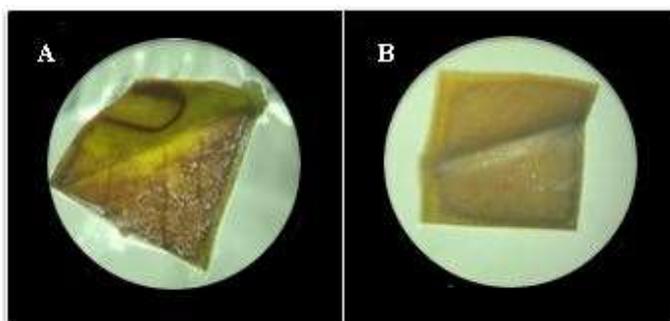
#### 3.1 Embriogênese somática direta de *C. canephora* em diferentes protocolos

Após 4 meses de inoculação de *C. canephora* (clones 2 e 14), foi observado formação de embriões somáticos para ambos os clones utilizados, sendo também verificado formação de embriões nos três protocolos para indução da embriogênese somática utilizadas neste experimento (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; FUENTE *et al.*, 2000; PRIYONO *et al.*, 2010).

Verificou-se que a formação dos embriões ocorreu principalmente nas regiões próximas a nervura secundária ou feixes vasculares do tecido foliar. Esta observação, pode ser explicada possivelmente pela presença de tecidos parenquimáticos que circundam os feixes vasculares, bem como a presença de células já desenvolvidas com capacidade meristemática do procâmbio (MEIRA *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2021). Outro fator positivo se baseia na alta concentração de auxinas próximas as regiões de seu transporte, que ocorre através de células parenquimáticas próximo ao xilema e floema (DIEL, 2022), fatores que contribuem para a reprogramação celular e posterior embriogênese.

O período necessário para o início da formação da massa pré-embriogênica para clone 2 foi mais precoce, quando comparado ao clone 14, no qual a regeneração pôde ser visualizada aos 30 dias após a inoculação do material em meio de indução de ESD (Figura 2). Em contrapartida, para explantes de clone 14 o início da regeneração foi observado apenas aos 60 dias após a inoculação. Tais discrepâncias entre genótipos da mesma espécie podem estar relacionadas com a condição de genotipodependência no processo da ESD ou capacidade de reprogramação celular intrínseca de cada clone (WERNER *et al.*, 2012; PRIYONO *et al.*, 2010; NIC-CAN *et al.*, 2015).

Figura 6 - Regeneração de embriões somáticos em clone 2 e 14 aos 30 dias.

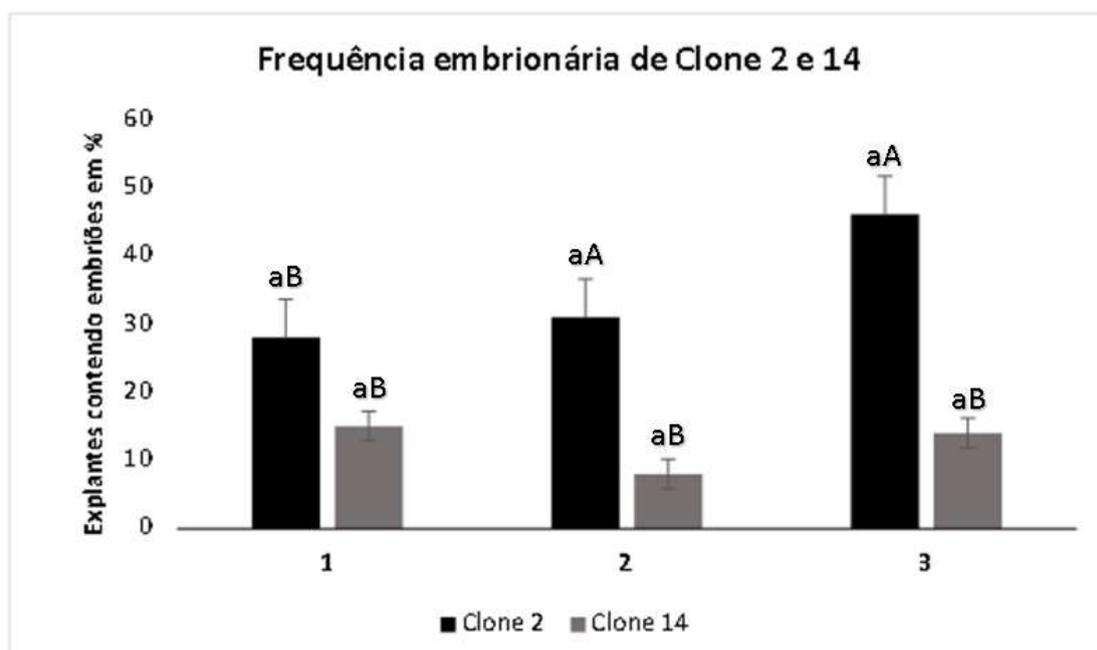


Legenda: A: Clone 2 aos 30 dias no protocolo 3; B: clone 14 aos 30 dias no protocolo 3.  
FONTE: Da autora, 2022.

Foram observadas diferenças significativas na frequência de regeneração dos explantes entre os clones, em clone 2 foi verificado frequência média de 30% a 45% de regeneração, já para clone 14, essa média foi menor, apenas 9% a 15% de explantes desenvolveram embriões somáticos. Tais resultados, reforçam ainda mais o fato de que a resposta embriogênica não está ligada somente ao tipo de protocolo utilizado, mas também do genótipo, como já demonstrado em *Coffea* (NIC-CAN *et al*; 2015; REZENDE, 2005).

A frequência embrionária dos explantes em cada tipo de meio, foi contabilizada aos 120 dias. Os resultados obtidos podem ser verificados na figura 3, sendo possível confirmar estatisticamente que o clone 2 foi mais responsivo na indução da embriogênese direta, quando comparado com o clone 14.

Figura 7 - Frequência embrionária de clone 2 e 14 em meio 1, 2 e 3.

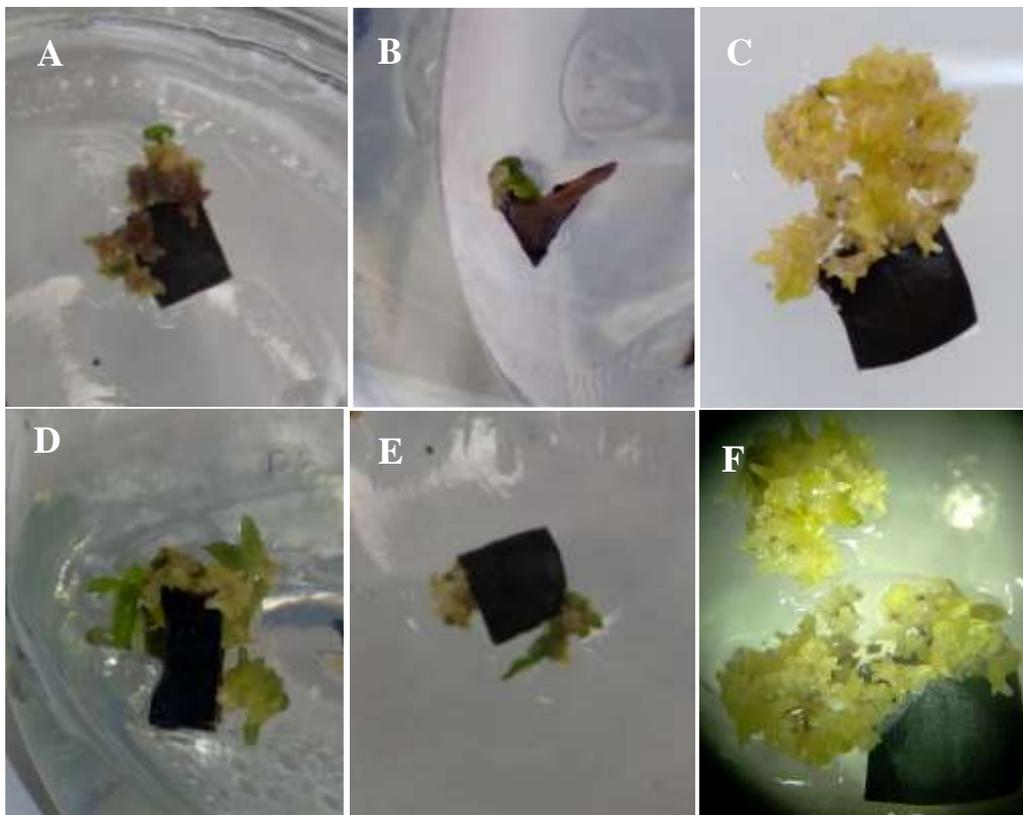


Legenda: Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os meios e maiúsculas entre os clones não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Fonte: Da autora, 2022.

Visualmente, observou-se intensa proliferação de embriões somáticos no meio 3 tanto para o clone 14, quanto para o clone 2, quando comparado aos meios de cultivo 1 e 2, esta diferença pode ser observada nas figuras 4 e 5. Esta influência provavelmente está relacionada com os componentes utilizados em cada meio de cultura, como

vitaminas, inibidores de etileno e hormônios que podem auxiliar ou inibir a formação do embrião (FUENTES *et al.*, 2000, CASARIN, 2020).

Figura 8 - Resposta na indução embriogênica de *C.canephora* clone 2 e 14 aos 120 dias.

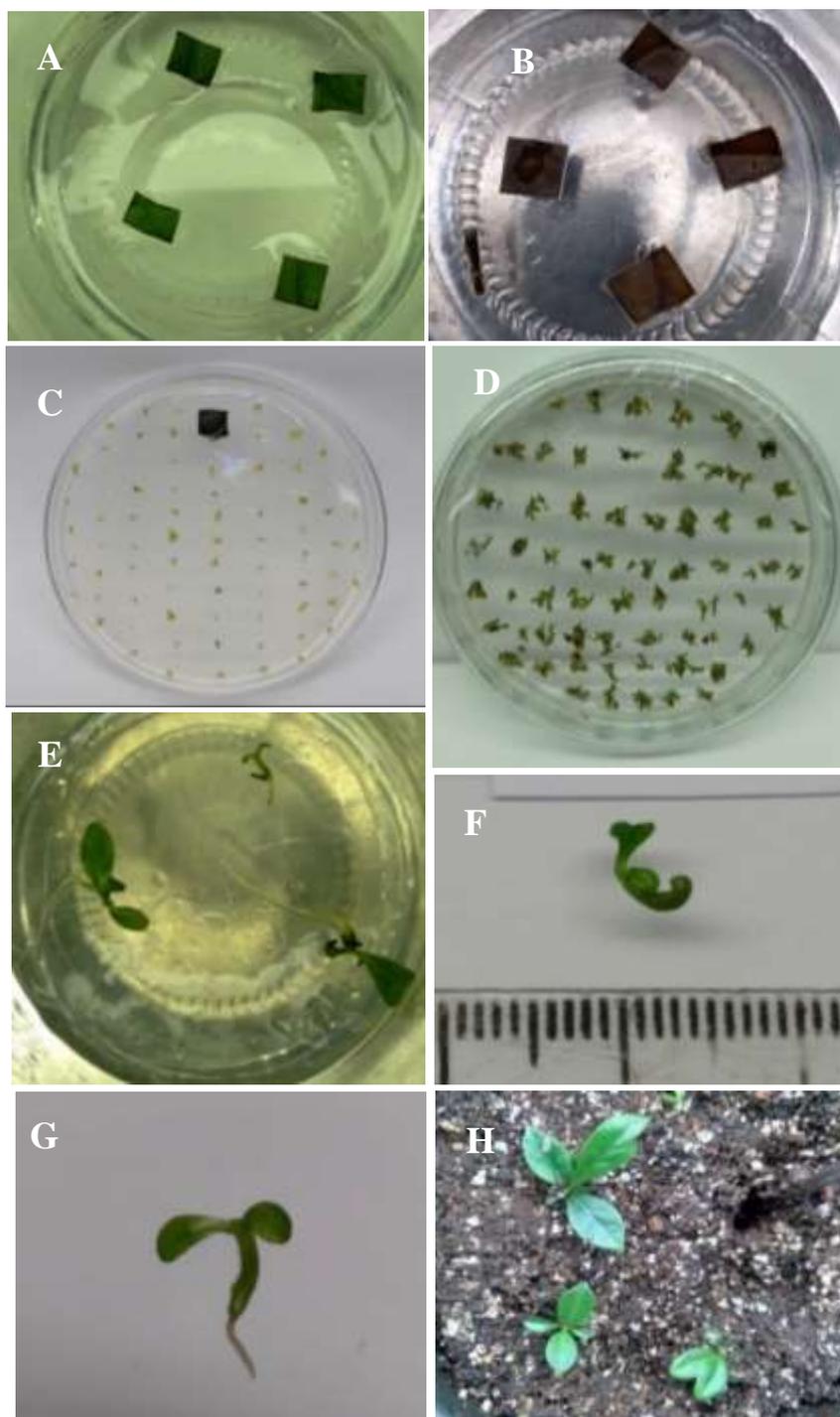


Legenda: A: Clone 14 em meio de cultura 1; B: Clone 14 em meio de cultura 2; C: Clone 14 em meio de cultura 3, D: Clone 2 em meio de cultura 1; E: Clone 2 em meio de cultura 2; F: Clone 2 em meio de cultura 3.

Fonte: Da autora, 2022.

Aos 120 dias, os embriões em estágios globular, torpedo, codiforme ou cotiledonar, foram transferidos para potes contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após um período médio de 90 dias de inoculação, observou-se formação de primórdios radiculares nos embriões de ambos os clones, sendo essa formação mais intensa e precoce em clone 2 quando comparado ao clone 14 (Figura 6.E e 6.G). Quando as plantas atingiram estágio de desenvolvimento de dois a três pares de folhas completamente expandidas acima do cotilédone e proliferação intensa de raízes, estas foram aclimatizadas em substrato comercial em câmeras de crescimento controlado (Figura 6.H).

Figura 9 - Resposta na indução embriogênica de *C.canephora* clone 2 e 14



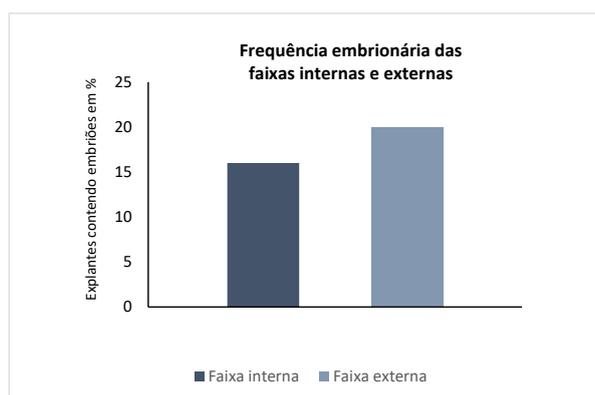
Legenda: A: Clone 2 no dia da inoculação; B: Clone 2 após 30 dias de inoculação 2; C:Clone 14 aos 4 meses em meio para ESD 3 ; D: Clone 14 aos 30 dias em MS ; E: Clone 2 aos 90 dias em MS; F: Clone 14 aos 60 dias em MS; G: Clone 2 aos 90 dias em MS; H: Clone 2 aclimatizado aos 9 meses.

Fonte: Da autora, 2022.

### 3.2 Indução de embriogênese somática direta em diferentes regiões da folha

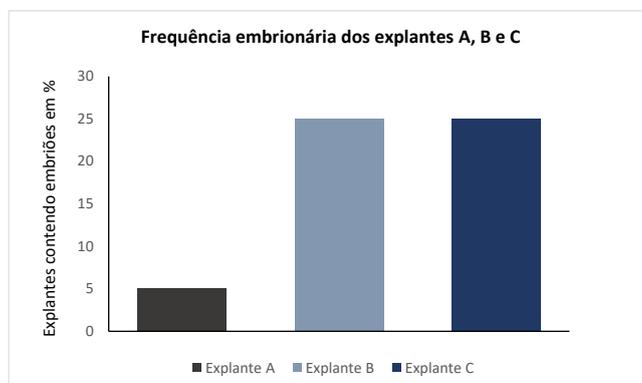
Embora o processo de embriogênese somática direta já tenha sido amplamente estudado, ainda é extremamente necessário a investigação de fatores que alteram a resposta à formação dos embriões, buscando principalmente a adaptação de protocolos já utilizados atualmente, um destes parâmetros é a influência dos tecidos embriogênicos e não embriogênicos (FERRARI *et al*, 2021). Neste estudo utilizando o clone 2, para a avaliação da posição do explante na formação de embriões somáticos, não foram observadas diferenças significativas entre os lados esquerdo e direito da folha ou entre a posição interna e externa das faixas (Figura 7). Para os diferentes explantes inoculados (A: Região apical da folha; B: Próximo a região mediana da folha e C: Região basal da folha), também não foram identificadas diferenças significativas, como demonstrado nas figuras 8.

Figura 10 - Frequência embrionária das faixas interna e externa.



Legenda: Médias não diferenciadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). FONTE: Da autora, 2022.

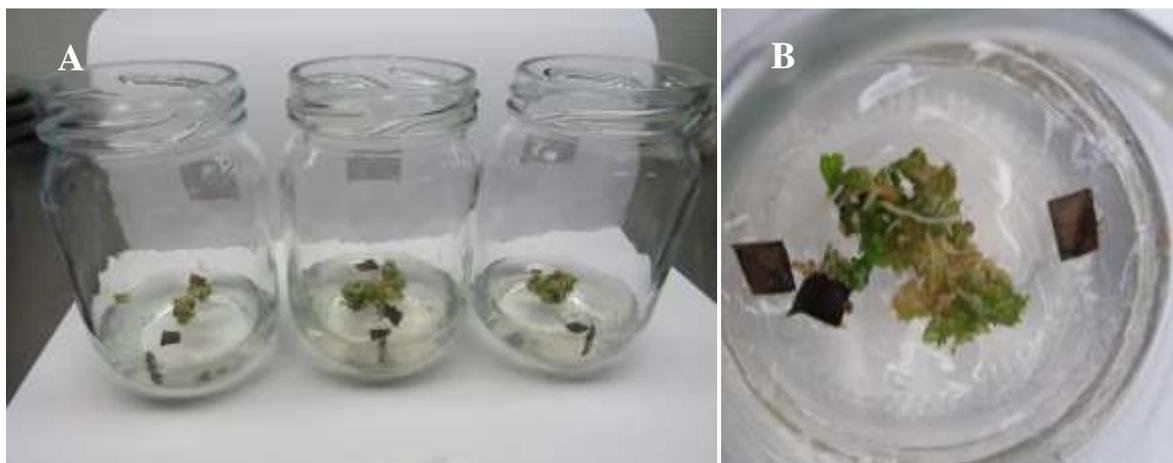
Figura 11 - Frequência embrionária dos explantes A, B e C.



Legenda: Médias não diferenciadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Fonte: Da autora, 2022.

Como pode ser observado na figura 9, houve intensa formação de embriões somáticos nos explantes inoculados utilizando o protocolo de indução de embriogênese somática direta proposto por Priyono *et al.*, 2010. Este resultado indica que a técnica é aplicável em larga escala e tem potencial para ser utilizada na regeneração de plantas transformadas de *C. canephora*.

Figura 12 - Resposta na indução embriogênica de explantes de diferentes partes da folha de *C. canephora* (clone 14) aos 120 dias.

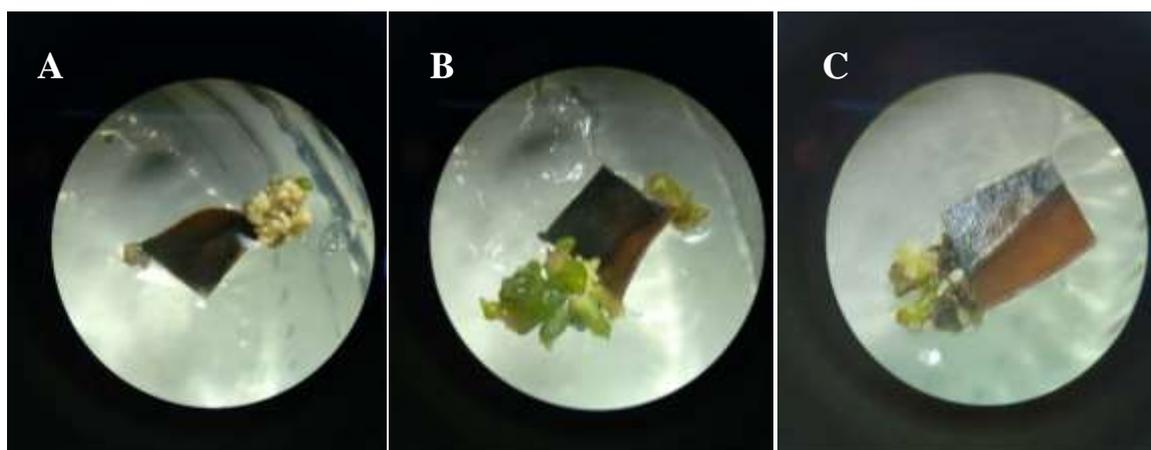


Legenda: A: Explantes do lado esquerdo e direito da folha e de diferentes posições do limbo foliar; B: Regeneração embriogênica em explante da região mediana da folha.  
Fonte: Da autora, 2022.

### 3.3 Indução de embriogênese somática direta em diferentes clones de *C. canephora*

A resposta aos estímulos para a embriogênese somática em *C. canephora* está intimamente ligada ao clone utilizado (REZENDE, 2005, PRIYONO *et al.*, 2010; NIC-CAN *et al.*; 2015). Na busca por genótipos com alto potencial para regeneração na embriogênese somática direta, verificou-se neste estudo a frequência embrionária e o número médio de embriões por explante dos clones 2, 14 e 22 após 120 dias de inoculação, como demonstrado na figura 10.

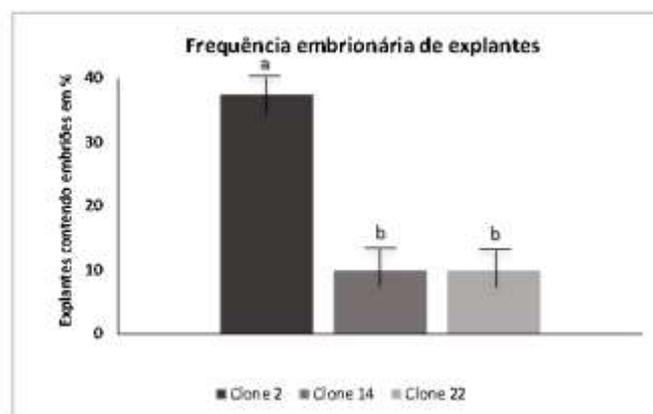
Figura 13 - Resposta na indução embriogênica de *C. canephora* (clone 2, 14 e 22)



Legenda: A Clone 2 aos 120 dias; B: Clone 14 aos 120 dias; C: Clone 22 aos 120 dias.  
 Fonte: Da autora, 2022.

Os resultados obtidos demonstraram diferença significativa entre a frequência embrionária dos clones utilizados neste estudo. Para clone 2, o mais responsivo, a frequência média de explantes regenerados foi de 38%, já os clones 14 e 22, a frequência média de regeneração foi de 10%, como expresso na figura 11.

Figura 14 - Resposta na frequência embrionária de explantes de *C. canephora* (clones 2, 14 e 22).



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).  
 Fonte: Da autora, 2022.

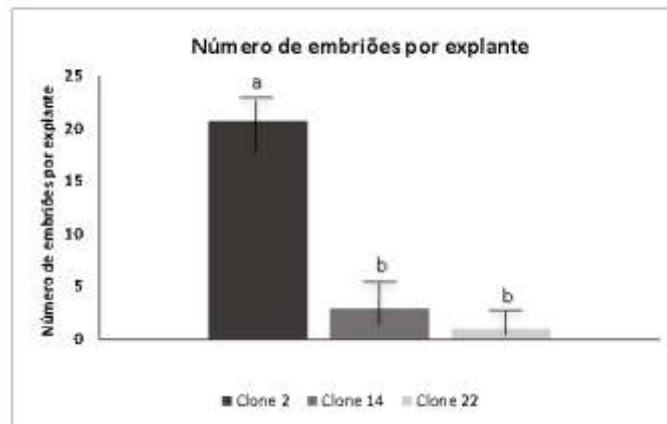
Na embriogênese somática direta, além de uma taxa elevada da frequência regenerativa, é necessário também, que haja a formação de elevados números de embriões por explante inoculado, tais parâmetros são essenciais para a definição de um material viável à técnica (CASARIN, 2020). Ainda, como discutido pela autora, um material, pode apresentar frequências embrionárias altas, porém números médios de formados embriões baixos.

Para o número médio de embriões somáticos produzido por explante regenerado houve diferenças significativas entre os clones utilizados. Para clone 2, o número médio de embriões formados por explante permaneceu em 20, já para clone 14 o número médio de embriões foi de 3 e para clone 22, o número médio obtido foi de 1 embrião por cada explante regenerado, como observado na figura 12.

Com os dados obtidos neste experimento, verificou-se que o clone 2, quando comprado ao clone 14 e 22, foi mais responsivo na embriogênese somática direta, tanto em relação a maiores frequências embrionária, quanto para a produção de embriões por explante regenerado. Este conhecimento, indica que o clone 2 é um material viável para

ser utilizado em experimentos de transformação genética com a espécie *C. canephora*, visto que a aplicação de técnicas de cultura de tecidos eficientes aliados a sistemas potentes de edição genética permite avanços na aquisição de clones de elite no gênero *Coffea*.

Figura 15 - Número médio de embriões formados por explante regenerado de *C. canephora* (clones 2, 14 e 22).



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).  
Fonte: Da autora, 2022.

#### 4 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a técnica de embriogênese somática direta pode ser utilizada para a produção de mudas de cafeeiro, bem como para a regeneração de plantas geneticamente transformadas da espécie, considerando o menor período para a obtenção do embrião. Entretanto, a produção de embriões via ESD em *C. canephora* é influenciada diretamente pelo clone utilizado, neste caso, o clone 2 apresentou médias superiores em relação a frequência embrionária e número de embriões produzidos, quando comparado ao clone 14 e 22, indicando que este é um clone ideal para a edição genética da espécie. Outro fator observado, se baseia na ampla produção de embriões em meio 3 para ambos os clones, quando comparado aos demais meios, justificando a utilização deste em futuros trabalhos com embriogênese somática direta em *C. canephora*.

## REFERENCIAS

- ALMEIDA, J. A. *et al.* Embriogênese somática em genótipos de *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, v.03, n.2, 2008
- BARRETO, H. G. *et al.* In Silico and Quantitative Analyses of the Putative FLC-like Homologue in Coffee (*Coffea arabica* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 29–35, 2012.
- DIEL, T. H. **Viabilidade do uso de um biorregulador de crescimento em *Cynodon spp.*(tifton-85) para a produção de feno**, 2022.
- DOMINGHETTI, A. W. *et al.* **Tolerância ao déficit hídrico de cafeeiros produzidos por estaquia e embriogênese somática**, 2016.
- FERRARI, IF; MARQUES, GA, JUNIOR, WLS *et al.* A ontogênese comparativa de embriões somáticos de *Coffea arabica* L. revela a eficiência da regeneração modulada pela fonte do explante e pela via de embriogênese. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Planta** 57, 796-810, 2021.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.
- FREITAS, Natália Chagas. **Sistema CRISPR/Cas9 visando a edição genômica no alotetraploide *Coffea arabica***. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- FUENTES, S. R. L, *et al.* 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, 2000.
- GATICA A. M; ARRIETA G; ESPINOSA A. M. Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L cvs catura and catuai: effect of triacontanol, light condition, and medium consistence. **Agronomia Costarricense**, v. 32(1), p. 139–147, 2008.
- GHANTI, S. K. *et al.*, Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p.121- 125, 2010.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia I – cultura de tecidos vegetal**. Florianópolis: Steinmacher, 2006.
- ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, 38(5): 118. 2016.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NIC-CAN, *et al.* New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

OLIVEIRA, L. B. HERBICIDAS AUXÍNICOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Euterpe edulis*: ESPÉCIE SÍMBOLO DA FLORESTA ATLÂNTICA, 2021.

OLIVEIRA, W. B. S. *et al.* Efeitos da transgenia em milho: performance agrônômica e adaptativa em cultivares híbridas e variedade crioula sob diferentes proporções de fluxo gênico, 2019.

PAIVA NETO, V. B.; BOTELHO, M. N.; AGUIAR, R.; SILVA, E. M., OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, v. 39, p. 629-634, 2003.

PAIXÃO, M.V.S. Propagação de plantas. 2.<sup>ed.</sup> Santa Teresa: Ifes, p. 230, 2019.

PRIYONO *et al.* Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Reports*, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 343–357, 2010.

QUIROZ-FIGUEROA, *et al.* Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Culture Protocols*, [S. l.], v. 318, n. 4, p. 111–116, 2006.

REZENDE, J. C. **Desenvolvimento de embriões e plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de embriogênese somática direta.** 2015.

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

SALAÜN, C.; LEPINIEC, L.; DUBREUCQ, B. Genetic and Molecular Control of Somatic Embryogenesis. **Plants**, 10, 1467, 2021.

SAMSON N, *et al.* Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 86:37–45, 2006.

WERNER, E; LIMA, A; AMARAL, J. A. Expressão gênica na embriogênese somática vegetal. **Enciclopédia biosfera**, [S. l.], v. 8, n. 14, 2012.

ZENG, F, *et al.* Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology**, v.60, p.167–183, 2006.

### **CAPÍTULO 3**

## **REGENERAÇÃO DE SUSPENSÃO CELULAR EMBRIOGÊNICA OBTIDOS DE PROTOPLASTOS DE *C. canephora***

## RESUMO

Protoplastos são células desprovidas de parede celular, e constituem explantes ideais para estudos de expressão gênica desde meados dos anos 90. Com o surgimento da tecnologia CRISPR, houve um recente aumento no interesse da utilização de protoplastos na edição genética do cafeeiro, no entanto a transformação destas células em embriões é o grande gargalo da técnica. A vantagem da transformação genética de protoplasto, baseia-se na possibilidade da entrega direta do sistema CRISPR/Cas9 a célula, neste caso não deixando traços de DNA exógeno no organismo hospedeiro, o que facilita a regularização das futuras plantas transformadas, visto que elas não são consideradas organismos geneticamente modificados. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de regeneração de embriões somáticos através de suspensão celular embriogênica obtidos de protoplastos de *C. canephora* (clone 14). Para isso, utilizou-se do meio de cultura Yasuda, enriquecido com  $15 \text{ gL}^{-1}$  de carvão, variando agentes antioxidantes (carvão ativado e polietilenoglicol), carboidratos (sacarose e glicose) e concentrações de ácido abscísico (1; 0,5 e  $0,1 \mu\text{M}$ ). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e para o teste de média utilizou-se o teste de regressão linear a 95% de confiança. Como resultado desta pesquisa, foi verificado a produção de embriões em tratamentos contendo  $30 \text{ gL}^{-1}$  sacarose e diferentes concentrações de ácido abscísico, não havendo diferenças significativas entre as concentrações de ácido abscísico na formação de embriões. Desta forma, conclui-se a utilização de ácido abscísico e doses adequadas de carvão ativado e sacarose tornam-se essenciais a regeneração de embriões somáticos provenientes de suspensão de protoplastos, no entanto novos estudos relacionados ao aumento da frequência da produção de embriões e a sua posterior maturação ainda são necessários.

**Palavras-chave:** Sacarose; Ácido abscísico; Meio de cultura.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura de protoplasto, assim denominado as células desprovidas de parede celular, é uma técnica biotecnológica já bastante utilizada para análises moleculares (EECKHAUT, *et al.*, 2013; WOO, 2009). Com o advento de CRISPR/Cas9 (CHARPENTIER e DOUDNA, 2013), o interesse por protoplastos foi retificado, principalmente devido a possibilidade de entrega direta do sistema a célula, não deixando vestígios de DNA exógeno no organismo hospedeiro, o que facilita a comercialização das futuras plantas editadas por não serem consideradas organismos geneticamente modificados (PASTERNAK *et al.*, 2020; WOO *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2019).

O isolamento de protoplastos é realizado por processos complexos, dependente de temperaturas e enzimas apropriadas que atuam degradando os componentes da parede celular vegetal, como a pectina e hemicelulose (FREITAS *et al.*, 2019; PASTERNAK, 2020; SILVA, 2020). Após o isolamento, as células retornam à atividade de formação de pectinas e hemicelulose e a parede celular é então regenerada, sendo denominados de calos de protoplasto, células totipotentes com potencial para a formação de embriões somáticos (EECKHAUT *et al.*, 2013). Ainda segundo o mesmo autor, o principal gargalo da técnica está na dificuldade da regeneração dos protoplastos em plantas completas.

Embriões somáticos e zigóticos compartilham as mesmas etapas de formação, neste sentido, a utilização de reguladores de crescimento presentes na formação do embrião zigótico pode ser chave na embriogênese somática (CORREIA, 2010; SILVA, 2005). Um destes hormônios é o ácido abscísico, responsável pela dessecação e maturação do embrião (GUTMANN., 1997). Nesta perspectiva, diversas pesquisas têm abordado o uso do ácido abscísico na dessecação de embriões somáticos, associados ou não a outros componentes dessecantes como polietilenoglicol (SILVA, 2005; ANDRADE, 2010; CORREIA, 2010; PATI *et al.*, 2005).

Em estudos desenvolvidos com calos oriundos de protoplastos da espécie *C. canephora* foi observado complexidades na transição dos calos para embriões somáticos, isto devido à grande dificuldade na manutenção do material e das baixas frequências na regeneração de embriões (SCHÖPKE, 1987). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a definição de protocolos eficientes para a indução de embriões somáticos à partir de suspensão celular embriogênica de protoplastos (clone

14), utilizando meios de cultura com diferentes combinações de ácido abscísico combinados com agentes antioxidantes, visionando aplicações em futuros trabalhos com edição genética da espécie *C. canephora*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

O experimento foi desenvolvido no Laboratório Central de Biologia Molecular, (LCBM) localizado na Universidade Federal de Lavras - Brasil. Para o experimento, foram utilizadas suspensões celulares embriogênicas (ECS) obtidas de protoplastos de *C. canephora* (clone 14), já disponíveis no laboratório. Essas ECS eram mantidas em suspensão celular em meio líquido EME (GROSSER *et al.*,1990) em sala de crescimento a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$  e fotoperíodo de 8 h de luz, sob luminosidade aproximada  $40 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e agitação constante de 105 rpm em agitador orbital.

### 2.2 Análise de dupla coloração para determinação da viabilidade embriogênica

Para avaliar a viabilidade celular do material ou capacidade embriogênica, amostras de ECS, foram coletadas para a realização do teste de dupla coloração com os corantes carmim acético e azul de Evans, os quais possibilitam a identificação da viabilidade células com potencial embriogênico (REIS, 2010).

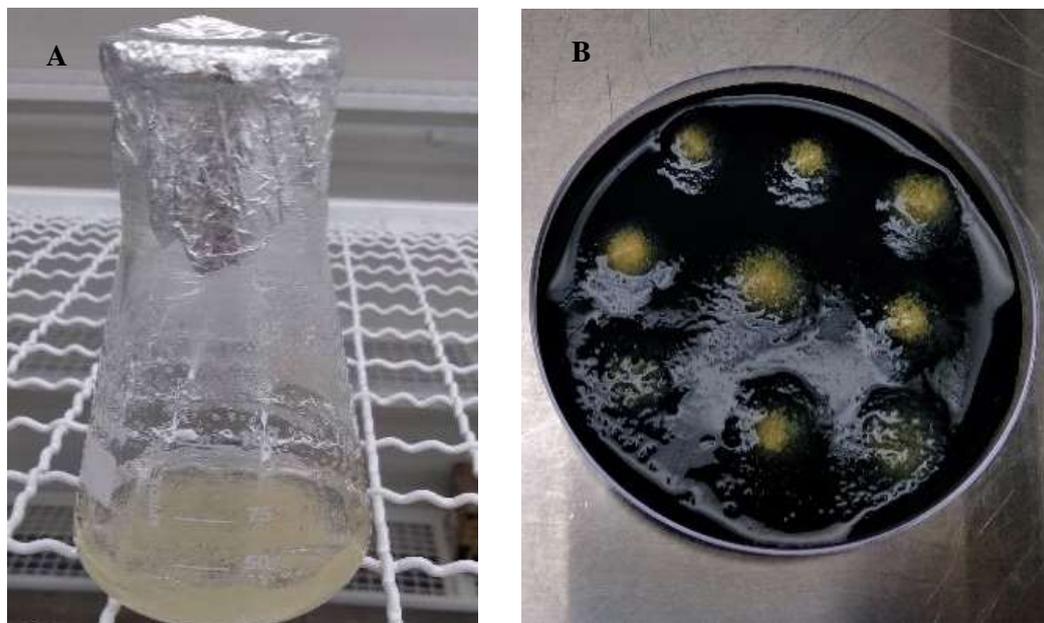
Uma proporção de 500 mg de ECS foi depositada em uma lâmina para microscópio, em seguida foi adicionado  $200 \mu\text{M}$  de carmim acético (2%) por 1 min, após esse processo, adicionou-se água destilada para retirar o excesso do corante. Posteriormente, foi adicionado ao material,  $100 \mu\text{M}$  de azul de Evans (0,1%) por 30 segundos e repetido o processo de lavagem dos calos. A água foi retirada com o auxílio de pipetas e em seguida adicionou-se  $200 \mu\text{M}$  de glicerina (50%) na amostra corada. As lâminas foram visualizadas no microscópio óptico modelo de ZEISS Axio Scope.A, sob a lente objetiva de 20x.

### 2.3 Indução de regeneração embrionária

Amostras da suspensão celular foram transferidos com o auxílio de pipetas para placas de petri (60x15 mm), contendo diferentes tratamentos para a indução de embriões somáticos, sendo que todos os tratamentos continham meio basal Yasuda (YASUDA *et al.*, 1985), acrescido de  $15 \text{ gL}^{-1}$  de carvão e ácido abscísico em diferentes concentrações (1,0; 0,5 e  $0,1 \mu\text{M}$ ). Diferentes tipos e proporções de componentes, como carboidratos, agentes gelificantes e oxidantes também foram avaliados de acordo com as tabelas 2, 3, 4 e 5. Após a inoculação do material as placas foram vedadas com plástico

insulfilm, permanecendo em sala de crescimento na ausência total de luz e temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ , sendo transferidas para as mesmas condições a cada quarenta e cinco dias (Figura 13).

Figura 16 - Aspectos e métodos utilizados no plaqueamento de ECS de protoplastos.



Legenda: A: Suspensão celular embriogênica de protoplastos de *C. canephora* clone 14 em meio EME; B: Plaqueamento da ECS em meios para a regeneração de embriões somáticos em meio basal yasuda.

Fonte: Da autora, 2022.

### 2.3.1 Experimento 1

Tabela 1 - Composições do meio de cultura utilizados para a indução de embriões somáticos em ECS oriundas de protoplastos de *C. canephora*.

Tratamentos	T1	T2	T3
Macronutrientes	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
Micronutrientes	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
Ácido Abscísico	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0.5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0.1 <math>\mu\text{M}</math></b>
Sacarose	30 $\text{gL}^{-1}$	30 $\text{gL}^{-1}$	30 $\text{gL}^{-1}$
Carvão ativado	15 $\text{gL}^{-1}$	15 $\text{gL}^{-1}$	15 $\text{gL}^{-1}$
Ágar	8 $\text{gL}^{-1}$	8 $\text{gL}^{-1}$	8 $\text{gL}^{-1}$

### 2.3.2 Experimento 2

Tabela 2 - Composições do meio de cultura utilizados para a indução de embriões somáticos em ECS oriundas de protoplastos de *C. canephora*.

<b>Tratamentos</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>
<b>Macronutrientes</b>	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
<b>Micronutrientes</b>	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
<b>Ácido Abscísico</b>	<b>1 µM</b>	<b>0.5 µM</b>	<b>0.1 µM</b>
<b>Sacarose</b>	<b>50 gL<sup>-1</sup></b>	<b>50 gL<sup>-1</sup></b>	<b>50 gL<sup>-1</sup></b>
<b>Carvão ativado</b>	15 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>
<b>Phytigel</b>	<b>9 gL<sup>-1</sup></b>	<b>9 gL<sup>-1</sup></b>	<b>9 gL<sup>-1</sup></b>

### 2.3.3 Experimento 3

Tabela 3 - Composições do meio de cultura utilizados para a indução de embriões somáticos em ECS oriundas de protoplastos de *C. canephora*.

<b>Tratamentos</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>
<b>Macronutrientes</b>	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
<b>Micronutrientes</b>	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
<b>Ácido Abscísico</b>	1 µM	0.5 µM	0.1 µM
<b>Glicose</b>	<b>5 gL<sup>-1</sup></b>	<b>5 gL<sup>-1</sup></b>	<b>5 gL<sup>-1</sup></b>
<b>Carvão ativado</b>	15 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>
<b>Polietilenoglicol</b>	<b>30 gL<sup>-1</sup></b>	<b>30 gL<sup>-1</sup></b>	<b>30 gL<sup>-1</sup></b>
<b>Ágar</b>	<b>12 gL<sup>-1</sup></b>	<b>12 gL<sup>-1</sup></b>	<b>12 gL<sup>-1</sup></b>

### 2.3.4 Experimento 4

Tabela 4 - Composições do meio de cultura utilizados para a indução de embriões somáticos em ECS oriundas de protoplastos de *C. canephora*.

<b>Tratamentos</b>	<b>T10</b>	<b>T11</b>	<b>T12</b>
<b>Macronutrientes</b>	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
<b>Micronutrientes</b>	1/4 MS	1/4 MS	1/4 MS
<b>Ácido Abscísico</b>	<b>1 µM</b>	<b>0.5 µM</b>	<b>0.1 µM</b>
<b>Glicose</b>	<b>5 gL<sup>-1</sup></b>	<b>5 gL<sup>-1</sup></b>	<b>5 gL<sup>-1</sup></b>
<b>Carvão ativado</b>	15 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>	15 gL <sup>-1</sup>
<b>Ágar</b>	<b>12 gL<sup>-1</sup></b>	<b>12 gL<sup>-1</sup></b>	<b>12 gL<sup>-1</sup></b>

## 2.4 Manutenção e avaliações dos embriões

Após cinco meses nas condições citadas acima, os embriões em estágios globular, torpedo, coração ou cordiforme obtidos em cada tratamento foram contabilizados e transferidos para meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), solidificado com 2,5 gL<sup>-1</sup> de phytigel™ (Sigma-Aldrich), pH ajustado para 5,8. Em

seguida o material permaneceu em sala de crescimento sob fotoperíodo de 8 horas de luz, sob intensidade de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ , sendo transferidos para as mesmas condições a cada trinta dias.

## **2.5 Delineamento experimental e Análises estatística**

Para a condução do experimento foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância, onde as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Regressão linear a 95% de confiança, através do programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

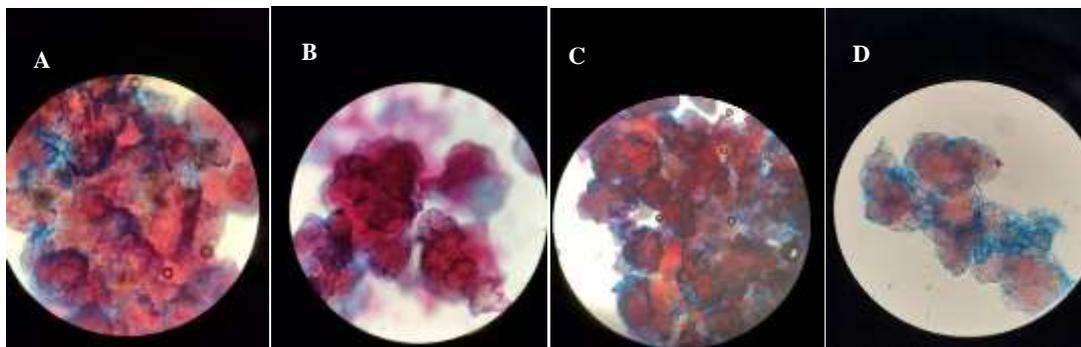
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Viabilidade embriogênica da suspensão celular embriogênica de protoplastos

Os corantes carmim acético e azul de Evans possibilitaram a identificação de agregados de células viáveis com potencial embriogênico nas ECS advindas de protoplastos, como indicado na figura 14. Materiais que reagem com carmim acético, são denominados embriogênicos, pois possuem células íntegras e características específicas como, formato isodiamétrico e citoplasma denso (REIS, 2010).

Células não embriogênicas geralmente possuem formatos alongados devido a vacuolização, processo inicial da morte celular, que culmina no rompimento da membrana plasmática e desintegração celular. A reação com o corante azul de Evans, é um indicativo de inviabilidade das células, sendo que, a reação dá-se pela penetração do corante através da membrana plasmática, que adentra no citoplasma celular e reage com seus componentes (COSTA, 2015).

Figura 17 - Dupla coloração com carmim acético e azul de evans para identificação de aglomerados de células com viabilidade embriogênica.



Legenda: A, B, C, D: ECS corados com carmim acético (vermelho), indicam viabilidade e integridade celular e calos corados com azul de Evans (azul) indicam células.

Fonte: Da autora, 2022.

#### 3.2 Regeneração embriogênica de protoplastos de *C. canephora*

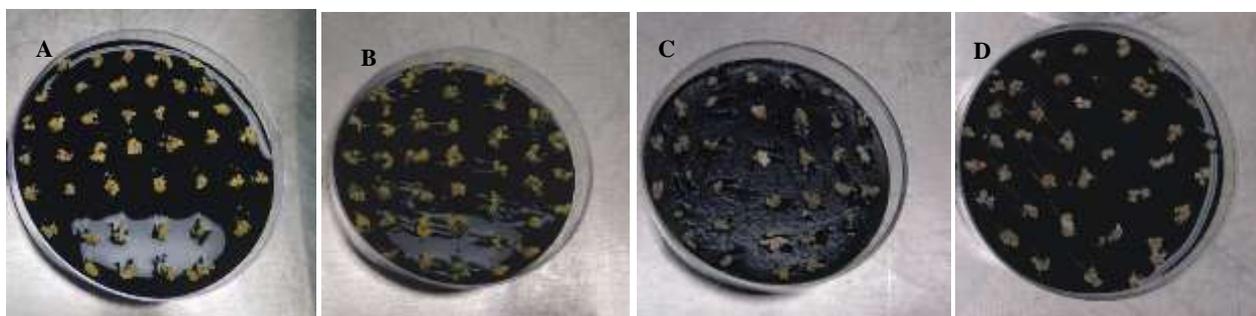
Após um período de cinco meses em que a ECS de protoplastos de *C. canephora* foram inoculados para a indução embriogênica, foi verificada presença de embriões somáticos no experimento 1, quando foi utilizado a sacarose  $30 \text{ gL}^{-1}$  como carboidrato (Figura 15.a.). Em experimentos com  $50 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose, o material apresentou coloração amarela, aspecto friável, havendo intensa multiplicação do material e

ausência de embriões somáticos (Figura 15.b).

É sabido que a sacarose é o carboidrato mais utilizado na cultura de tecidos, no entanto a concentração pode influenciar diretamente nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (GUERRA *et al.*, 1999; REZENDE *et al.*, 2003). Tais alterações na resposta embriogênica foram observadas neste estudo, visto que quando o calo recebeu uma concentração superior de sacarose a  $50 \text{ gL}^{-1}$  o material foi induzido apenas a multiplicação. Provavelmente uma concentração inferior de sacarose a  $30 \text{ gL}^{-1}$  não foi suficiente para induzir intensas multiplicações no material, induzindo-o a uma situação de estressante e posterior transformação em embriões.

Nos demais experimentos 3 e 4 também não ocorreu formação de embriões e o material apresentou coloração opaca, baixa multiplicação e aspecto não friável, sendo que estas características foram ainda mais acentuadas quando se utilizou polietilenoglicol no meio de cultura, culminando na ausência de embriões em ambos os tratamentos (Figura 15.a).

Figura 18 - Indução de formação de embriões em ECS de protoplastos em diferentes tratamentos.



Legenda: A: Experimento 1; B: Experimento 2; C: Experimento 3; D: Experimento 4.

Fonte: Da autora, 2022.

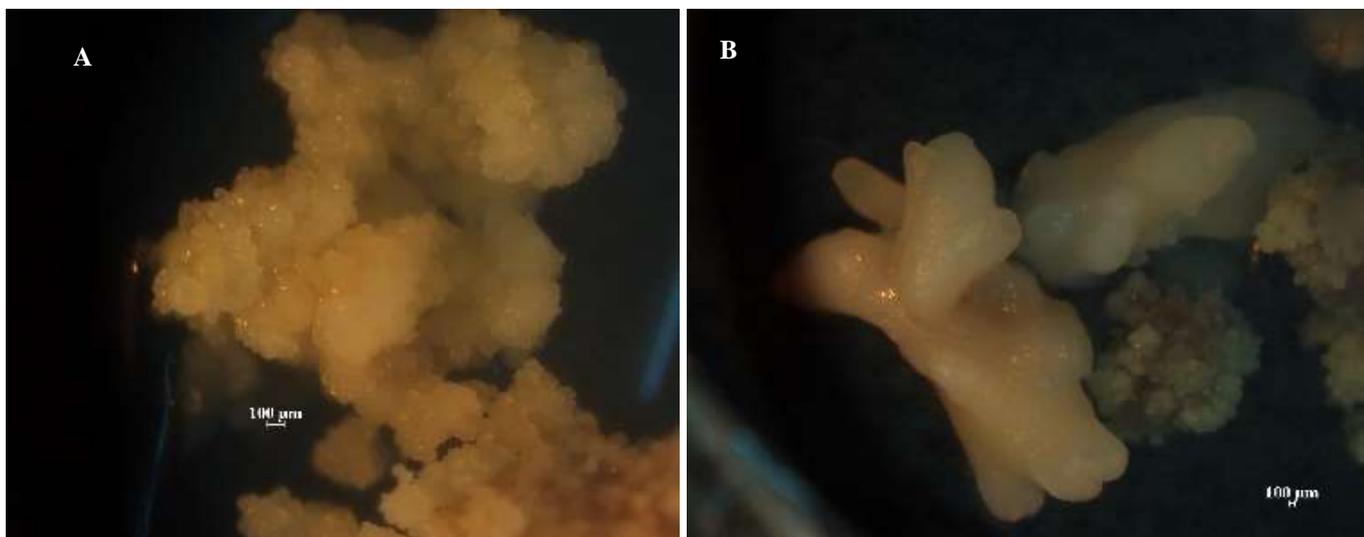
No experimento 1, no qual foi utilizado  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose, verificou-se a presença de embriões somáticos nas diferentes concentrações de ácido abscísico utilizadas (0,1; 0,5 e  $1 \mu\text{M}$ ), como observado na figura 16. Os primeiros embriões foram visualizados no quinto mês de inoculação, havendo maior quantidade no sétimo mês, provavelmente devido ao maior período de exposição ao ácido abscísico, que atua na indução de proteínas relacionadas ao processo de formação do embrião somático (FEHÉR, 2015; ALMEIDA, 2020).

Na busca pela concentração ideal de ácido abscísico para a indução da

regeneração de ECS de protoplastos em embriões somáticos, foi realizado neste experimento a quantificação dos embriões obtidos, no entanto não houve diferenças entre o número de embriões em relação a concentração de ácido abscísico, como observado na figura 17. Este resultado indica que neste caso, doses baixas ou pequenas concentrações hormonais, foram suficientes para estimular e desencadear redes sinalizadoras internas na célula que culminam em uma resposta embriogênica.

As alterações do estado somático para o embriogênico estão relacionadas à ação de genes que codificam proteínas envolvidas em sinalizações hormonais e respostas a estresses, tais genes já foram identificados como análogos entre o desenvolvimento de embriões somáticos e zigóticos (AGUILAR-HERNÁNDEZ, 2018; FEHÉR, 2015). Sabe-se que embriões somáticos são estimulados a se desenvolver e amadurecer *in vitro* sob estresses, como calor, depleção de nutrientes e estresse hídrico, neste sentido, concentrações específicas do hormônio vegetal ácido abscísico adicionados ao meio de cultura pode induzir a formação de embriões somáticos de ECS de protoplastos (OCHATT *et al.*, 2016; VALENCIA-LOZANO, 2021).

Figura 19 - Indução de formação de embriões em ECS de protoplastos em 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose e diferentes concentrações de ABA.

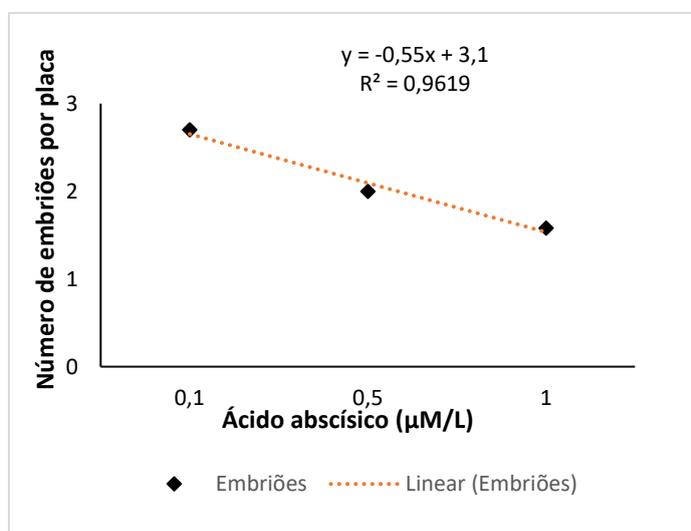




Legenda: A: Embriões em meio de cultura enriquecido com 0,1  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico; B: Embriões em meio de cultura enriquecido com 0,5  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico; C: Embriões em meio de cultura enriquecido com 1  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico.

Fonte: Da autora, 2022.

Figura 20 - Número de embriões somáticos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido abscísico



Legenda: Número de embriões regenerados de ECS de protoplastos em  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose e diferentes concentrações de ácido abscísico.

Fonte: Da autora, 2022.

A regeneração de protoplastos, é altamente dependente dos componentes utilizados no meio de cultura e a regeneração inicial elucidada neste estudo pode ser um grande avanço para viabilizar a cultura de protoplastos na espécie *Coffea*, visto que

existe grande dificuldade de regeneração de ECS de protoplastos na espécie do cafeeiro (SCHÖPKE, 1987). No entanto é importante ressaltar que, embora tenha sido obtido embriões no experimento 1, estas médias ainda são baixas, tal fato pode ser explicado pelo período extenso em que o material foi isolado e inoculado *in vitro*, visto que, o extenso período *in vitro* pode ocasionar a perda de potencial embriogênico do material (TAKAMORI, 2014; PASTERNAK *et al.*, 2020; EECKHAUT, *et al.*, 2013).

#### 4 CONCLUSÕES

Os resultados discutidos neste estudo demonstram que a adição de hormônios presentes no desenvolvimento de embriões zigóticos podem ser chave para a formação de embriões somáticos. Neste caso, a adição de ácido abscísico (1; 0,5 e 0,11  $\mu\text{M}$ ) no meio de cultura, juntamente com carvão ativado e sacarose ( $30 \text{ gL}^{-1}$ ) promoveu a formação de embriões somáticos em ECS obtidos de protoplastos de *C. canephora* (clone 14), técnica considerada extremamente complexa para a espécie do cafeeiro.

## REFERENCIAS

- AGUILAR-HERNÁNDEZ, V; LOYOLA-VARGAS, V. M. Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1658, 2018.
- ALMEIDA, F. A. **Dinâmicas de sinalizações envolvidas na aquisição da competência embriogênica em cana-de-açúcar: uma abordagem fosfoproteômica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2020.
- ANDRADE, J. B. **Efeito dos agentes de maturação, ABA, PEG e maltose, na produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio em culturas embriogênicas de Araucaria angustifolia**. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas), Universidade de São Paulo, 2020.
- CORREIA, A.E.C. **Análise de substâncias de reserva em embriões zigóticos e somáticos de feijoa e de tamarilho-otimização da embriogênese somática**. Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade de Coimbra, 2010.
- COSGROVE, D. J.; Growth of the plant cell wall. *Natures Reviews* **Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850, 2005.
- COSTA, A. S. *et al.* Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço. **Scientia Plena**, São Cristóvão, v. 11, n. 1, jan. 2015.
- EECKHAUT, T. *et al.* Progresso na pesquisa de protoplastos vegetais. **Planta**, 238, 991-1003, 2013.
- FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 536, 2019.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v. 6, n. 2, p. 36-41. 2008.
- 2GROSSER, J. W., *et al.* Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: Citrus reticulata and Citropsis gilletiana. **Plant Cell Reports**, v. 8.11, p. 656-659, 1990.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática em sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S; BUSO, J. A (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. **Brasília: EMBRAPA - SPI/EMBRAPA - CNPH**, p. 533-568, 1999.
- LUO, S, *et al.* Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases. **Molecular Plant**, v. 8, n. 9, p. 1425-1427, 2015.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

OLIVEIRA, Leandro Francisco de. **Metabolismo de poliaminas na embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. Tese (Doutorado em ciências), Universidade de São Paulo, 2017.

PASTERNAK, TARAS *et al.* De célula única a plantas: protoplastos de mesofilo como um sistema versátil para investigar a reprogramação de células vegetais. **Revista Internacional de Ciências Moleculares** vol. 21, p.12 4195, 2020.

PATI, P; SHARMA, M; AHUJA, P. Rose. Protoplast isolation and culture and heterokaryon selection by immobilization in extra thin alginate film. **Protoplasma** v. 233, p.165–171, 2008.

REIS, Michele Valquiria. **Caracterização de massas pró-embriogênicas de ypê branco**. Dissertação (Mestrado em fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras. 2010.

REZENDE, *et al.* Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. CV. **Obatã. Ciencia e agroecologia**, 2003.

SCHÖPKE, C, MÜLLER, L.E & KOHLENBACH, H.W. Embriogênese somática e regeneração de plântulas em culturas de protoplastos de embriões somáticos de café (*Coffea canephora* P. ex Fr.). **Plant Cell Tiss Organ Cult** 8, 243-248, 1987.

SILVA, T. **Isolamento e regeneração de protoplastos de *Coffea canephora* a partir de suspensão de células**. Dissertação (Mestrado-Biotecnologia Vegetal), UFLA-Universidade Federal de Lavras. 2020.

SILVA, V, C. **ESTUDO MORFOANATÔMICO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E SOMÁTICOS DE JABUTICABA-BRANCA (*Myrciaria* sp.)**. Tese (Doutorado-Fitotecnia), UFV-Universidade Federal de Viçosa, 2005.

TAKAMORI, L.M. Optimization of *in vitro* regeneration of *Urochloa* spp via somatic embryogenesis. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2014.

VALENCIA-LOZANO, *et al.* Maturação embrionária somática induzida por estresse osmótico de café *Coffea arabica* L., desenvolvimento e robustez dos meristemas apicais da parte aérea e radicular. **Sci Rep**, v. 11, p. 9661, 2021.

WOO, Je Wook; *et al.* Tape-Arabidopsis Sandwich-a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. **Plant methods**, v. 5, n. 1, p. 16, nov. 2009.

YASUDA, T; FUJII, Y; YAMAGUCHI, T. Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* Leaf Explants by Benzyladenine. **Growth (Lakeland)**, v. 26, n. 3, p. 595– 597, 1985.

ZANIN, F. C. **Análise de expressão gênica de membros da família Saur durante a embriogênese somática de *Coffea arabica***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal), 2017.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados discutidos, é possível afirmar que a embriogênese somática direta é uma técnica vantajosa para a regeneração de plantas geneticamente transformadas, considerando o menor período para a obtenção do embrião. Clone 2 mostrou grande desempenho na frequência e número de embriões produzidos quando comparado aos demais clones investigados neste estudo, indicando ser um clone ideal para programas de edição genética em *C. canephora*.

Para a indução de embriões somáticos à partir de suspensão de protoplastos, o ácido abscísico juntamente com doses específicas de sacarose foram primordiais, viabilizando o uso da técnica para estudos de edição genética de *C. canephora*. No entanto, novas pesquisas relacionadas ao aumento da produção embrionária e seu posterior amadurecimento ainda sejam necessários.