



ANDERSON TADEU SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *BABY BOOM (BBM)* E *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)*
ENVOLVIDOS NA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

**LAVRAS - MG
2011**

ANDERSON TADEU SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *BABY BOOM (BBM)* E
SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)
ENVOLVIDOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAFEIEIRO
(*Coffea arabica* L.)**

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

Orientador

Dr. Luciano Vilela Paiva

**LAVRAS - MG
2011**

Silva, Anderson Tadeu.

Análise da expressão dos genes *Baby Boom (BBM)* e *Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK)* envolvidos na embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) / Anderson Tadeu Silva. – Lavras : UFLA, 2011.

129 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Genoma Café. 2. ESTs-*contigs*. 3. Suspensão de células embriogênicas. 4. RT-qPCR. 5. *In silico*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

ANDERSON TADEU SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *BABY BOOM (BBM)* E
SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)
ENVOLVIDOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO CAFEIEIRO
(*Coffea arabica* L.)**

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

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2011.

Dr. Anderson Cleiton José

UFLA

PhD. Alan Carvalho de Andrade

EMBRAPA

Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

LAVRAS - MG

2011

AGRADECIMENTOS

À Deus, autor de minha vida e minha vocação, pela escolha, pelo amor que sempre tem para comigo.

À minha querida família: Meu pai - Milton, Minha mãe - Carmem, Minha irmã – Andressa, Minhas tias – Nazaré e Marlene, Meu tio - José Alvarenga e Minha avó - Maria, pelas lágrimas, pelas dores, alegrias, incentivos, pela doação de vida por mim.

À minha namorada - Roseane, pelas lágrimas, pelas dores, alegrias, convivência, companheirismo, confiança e amor, me apoiando e incentivando para continuar todos os dias.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), através do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), pela oportunidade de aprimoramento.

A todos os professores deste curso pelos conhecimentos acrescentados.

Ao companheiro de laboratório Douglas Barduche, em especial pela ajuda na redação dessa dissertação.

À Kalyinka, pelo fornecimento do material e ajuda nos experimentos.

Aos funcionários do LCBM, Fabricio, Heliete e a ex-funcionária Eula, pelo apoio técnico.

A CAPES, FAPEMIG e CNPq, pela concessão de materiais e da bolsa.

Ao meu orientador, professor Dr. Luciano Vilela Paiva pela oportunidade e orientação, na maioria das vezes na correria, mas com muita sabedoria e sempre com uma palavra de apoio! “Luciano, obrigado por tudo!”

Ao PhD. Alan Carvalho Andrade, pelo auxílio nas pesquisas.

A todos os colegas da turma de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da UFLA, com destaque para Horllys, Rodrigo e Gabriel, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Luiz Gustavo, José Renato e José Romário, pela amizade e convivência em harmonia no laboratório.

Aos amigos Vinicius, Emerson, Rodrigo e Isabela pelas descontrações.

À banca examinadora pelo aceite do convite.

E a todos que de, alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho!

Muito obrigado!

“Uma descoberta, seja feita por um menino na escola ou por um cientista trabalhando na fronteira do conhecimento, é em sua essência uma questão de reorganizar ou transformar evidências, de tal forma que se possa ir além delas assim reorganizadas, rumo a novas percepções.”

Jerome Bruner

RESUMO GERAL

Retrata-se, neste estudo, os genes identificados e caracterizados na embriogênese somática de *Coffea arabica* L. cv Catiguá conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais. A embriogênese somática – formação do embrião a partir de células somáticas é um mecanismo de reprodução assexuada natural em algumas espécies vegetais, mas que pode ser induzido *in vitro* de modo generalizado. Análises histológicas das características diferenciadoras entre células somáticas e embriogênicas podem ser usadas para aumentar a eficiência metodológica, porém, não permitem o diagnóstico dos eventos indutores da transição entre essas características e, portanto, o estudo e obtenção de marcadores moleculares ligados aos eventos de transição são de extrema utilidade. Nesse contexto, foi avaliada a expressão *in silico* e *in vitro* dos genes *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) e *BBM* (*Baby Boom*), envolvidos no processo de transição do estado vegetativo para o embriogênico, visando à expressão diferencial “*in vitro*” e também a busca por um marcador molecular, mediante análises *in silico*. No artigo 1 apresenta-se a expressão diferencial do gene *SERK* nos estágios de calos embriogênicos, calos não embriogênicos e suspensão celular. Um total de três ESTs-*contigs* foram analisados, em que o ESTs-*contig* 166 apresentou, em sua expressão, características diferenciadas para a embriogênese de café. Esses dados sugerem que o ESTs-*contig* 166 seja o possível ortólogo de *SERK* em *C. arabica* (*CaSERK*) e indicam que essa estratégia pode aumentar ainda mais a eficiência metodológica para a obtenção de suspensão de células embriogênicas - ECS, em outras espécies e cultivares. No artigo 2 apresenta-se a expressão diferencial do gene *BBM* nos estágios de calos embriogênicos, calos não embriogênicos e suspensão celular. Um total de dois ESTs-*contigs* foram analisados, em que o ESTs-*contig* 9 apresentou uma alta e exclusiva expressão nos estágios de calos embriogênicos e suspensão celular, em relação aos calos não embriogênicos. Esses dados sugerem que ESTs-*contig* 9 seja o possível ortólogo de *BBM* em *C. arabica* (*CaBBM*) e indicam que o uso dele como marcador molecular pode aumentar ainda mais a eficiência metodológica durante a obtenção de materiais embriogênicos de cafeeiro. Pelo artigo 3 indica-se uma relação transiente de indução e retroinibição entre *CaBBM* e *CaSERK* durante a curva de crescimento das ECS, na qual a expressão diametralmente opostas entre eles coincide com a estabilização da taxa de crescimento das ECS. No artigo 4 apresenta-se a possibilidade de cinco ESTs-*contigs* identificados *in silico* nas bibliotecas de cafeeiro, também serem usados como marcadores do processo de aquisição embriogênica.

Palavras-chave: Genoma Café. ESTs-*contigs*. Suspensão de células embriogênicas. RT-qPCR. *In silico*.

GENERAL ABSTRACT

This study reports the genes identified and characterized in the somatic embryogenesis of *Coffea arabica* L. cv Catiguá conducted at the Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), at the Federal University of Lavras (UFLA), Minas Gerais. Somatic embryogenesis – the formation of the embryo starting from somatic cells, is a natural asexual reproduction mechanism in some plant species, but it can be induced *in vitro* in a general manner. Histological analyses of the differentiating characteristics between somatic and embryogenic cells can be used to increase methodological efficiency, however, they do not allow the diagnosis of the transition inductor events among those characteristics and, therefore, the study and obtaining of molecular markers related to the transition events are of extreme usefulness. In that context, we evaluated the *in silico* and *in vitro* expression of the SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) and BBM (Baby Boom) genes involved in the process of transition from the vegetative state to the embryogenic, seeking the differential expression “*in vitro*” and also the search for a molecular marker, by *in silico* analyses. Article 1 presents the differential expression of the SERK gene in the embryogenic calli, non-embryogenic calli and cellular suspension stages. A total of three EST-contigs were analyzed, in which EST-contig 166 presented, in its expression, characteristics differentiated for coffee embryogenesis. That data suggest that EST-contig 166 is a possible ortholog of SERK in *C. arabica* (CaSERK) and indicates that that strategy can also further increase the methodological efficiency for the obtaining of embryogenic cell suspensions - ECS, in other species and cultivars. Article 2 presents the differential expression of the BBM gene in the embryogenic calli, non-embryogenic calli and cellular suspension stages. A total of two EST-contigs were analyzed, in which EST- contig 9 presented high and exclusive expression in the embryogenic calli and cellular suspension stages, in relation to the non-embryogenic calli. That data suggest that EST-contig 9 is a possible BBM ortholog in *C. arabica* (CaBBM) and indicates that its use as a molecular marker can further increase the methodological efficiency during the obtaining of coffee plant embryogenic materials. Article 3 indicates a transient induction relationship and retroinhibition between CaBBM and CaSERK during the ECS growth curve, in the which the diametrically opposed expression between them coincides with the stabilization of the ECS growth rate. Article 4 presents the possibility that five EST-contigs, identified *in silico* in the coffee libraries, can also be used as embryogenesis acquisition process markers.

Keywords: Coffee Genome. ESTs-*contigs*. Embryogenic Cell Suspension. RT-qPCR. *In silico*.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 GENÔMICA DO CAFEIEIRO.....	15
2.2 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	19
2.3 GENES <i>SERK</i> (<i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE</i>) E <i>BBM</i> (<i>BABY BOOM</i>).....	24
3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA ...	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
SEGUNDA PARTE	36
ARTIGO 1	37
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA <i>JOURNAL OF PLANT</i> <i>PHYSIOLOGY</i> (VERSÃO PRELIMINAR)	37
ANÁLISE <i>IN SILICO</i> E EXPRESSÃO QUANTITATIVA <i>IN VITRO</i> DE UM POSSÍVEL ORTÓLOGO DE <i>SERK</i> EM SUSPENSÃO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Coffea arabica</i> L. (<i>CaSERK</i>)	38
RESUMO	38
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	43
BUSCA DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS AO <i>SERK</i>	43
DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE	44
EXPRESSÃO GÊNICA <i>IN SILICO</i> – <i>NORTHERN</i> ELETRÔNICO	44
MATERIAL VEGETAL	44
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA	45
QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA	47
ANÁLISE <i>IN SILICO</i> E EXPRESSÃO GÊNICA DAS SEQUÊNCIAS DOS POSSÍVEIS HOMÓLOGOS	47
REFERÊNCIAS	58
ARTIGO 2	63
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA <i>PLANT SCIENCE</i> (VERSÃO PRELIMINAR)	63
ANÁLISE <i>IN SILICO</i> E EXPRESSÃO QUANTITATIVA <i>IN VITRO</i> DE UM POSSÍVEL ORTÓLOGO DE <i>BBM</i> EM CALOS EMBRIOGÊNICOS E SUSPENSÃO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Coffea arabica</i> L. (<i>CaBBM</i>)	64
RESUMO	64

INTRODUÇÃO	66
MATERIAL E MÉTODOS	68
BUSCA DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS AO <i>BBM</i>	68
DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE	69
EXPRESSÃO GÊNICA <i>IN SILICO</i> – <i>NORTHERN</i> ELETRÔNICO	69
MATERIAL VEGETAL	69
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA	70
QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	70
RESULTADO E DISCUSSÃO	71
ANÁLISE DA SEQUÊNCIAS DOS POSSÍVEIS HOMÓLOGOS	71
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA	72
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA – RT-QPCR	72
ARTIGO 3	85
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA <i>PLANT MOLECULAR BIOLOGY</i> (VERSÃO PRELIMINAR)	85
RELAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA QUANTITATIVA DE <i>CaSERK</i> E <i>CaBBM</i> COM O CRESCIMENTO DE SUSPENSÕES CELULARES DE <i>Coffea arabica</i> L.	86
RESUMO	86
INTRODUÇÃO	88
MATERIAL E MÉTODOS	91
MATERIAL VEGETAL	91
QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	91
RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>CASERK</i> E <i>CABBM</i> COM A CURVA DE CRESCIMENTO DE ECS.	93
REFERÊNCIAS	100
ARTIGO 4	105
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA <i>GENETICS AND MOLECULAR</i> <i>RESEARCH</i> (VERSÃO PRELIMINAR)	105
IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS NO GENOMA DO CAFÉ POTENCIALMENTE ASSOCIADAS À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	106
RESUMO	106
INTRODUÇÃO	108
MATERIAL E MÉTODOS	109
BUSCA DE SEQUÊNCIAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS	109
EXPRESSÃO GÊNICA <i>IN SILICO</i> – <i>NORTHERN</i> ELETRÔNICO	109
DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE	110
RESULTADO E DISCUSSÃO	111
ESTS-<i>CONTIG 3605</i>	112
ESTS-<i>CONTIG 9850</i>	113

ESTs-<i>CONTIGS</i> 13686	113
ESTs-<i>CONTIGS</i> 17240	114
ESTs-<i>CONTIG</i> 17265	115
REFERÊNCIAS	124

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café no mundo, e ainda o segundo maior consumidor, posicionando-se atrás apenas dos Estados Unidos. O café mais cultivado no Brasil e no mundo é o Arábica, cuja espécie é *Coffea arabica* L. (MORICOCI, 2003). O café Arábica representa aproximadamente 74%, e o restante é ocupado pelo cultivo do café Robusta que pertence à espécie *C. canephora* Pierre (CONAB, 2011).

A embriogênese somática – formação do embrião a partir de células somáticas, sem fusão de gametas, é uma técnica capaz de maximizar a propagação do cafeeiro, que pode ser induzido *in vitro* de modo generalizado sendo assim um importante método de multiplicação dos genótipos de elite, em larga escala, apresentando um grande potencial a ser explorado. Os primeiros trabalhos realizados com embriogênese somática no gênero *Coffea* foram feitos por Starisky (1970), que obteve a rápida proliferação de calos nas espécies *C. arabica* e embriões e plântulas em explantes de *C. canephora*.

Embora embriões somáticos induzidos *in vitro* e os embriões zigóticos se desenvolvam por vias diferentes, eles são morfológicamente semelhantes, o que torna os somáticos um sistema modelo para estudos embriológicos. A indução *in vitro* de embriões somáticos permite também aplicações tecnológicas, como a propagação vegetativa em larga escala, a formação de bancos de germoplasma criopreservados ou como alvo para eventos de transformação genética.

Um sistema de propagação *in vitro* bastante eficiente para essas aplicações tecnológicas é a “suspensão de células embriogênicas” (*embryogenic cell suspension* – ECS). ECS se caracteriza por milhares de glomérulos celulares por cm^3 , mantidos em alta e uniforme porcentagem no estágio de potencial embriogênico – ou seja, passíveis de serem induzidos a completar o desenvolvimento embrionário. Desse modo, o desenvolvimento de protocolos

para obtenção de ECS tornou-se, em si, um dos principais objetivos na propagação *in vitro*.

Embora a metodologia para ECS seja bem estabelecida, os protocolos são genótipo-dependente, o que força o desenvolvimento de protocolos específicos para cada espécie.

Este desenvolvimento é quase empírico. O conhecimento sobre os primeiros eventos da transição de células somáticas para embriogênicas é escasso (SCHMIDT et al., 1997) e as análises que permitem acompanhar estes eventos, e conseqüentemente, a obtenção, ou não, de um cultivo embriogênico, são análises histológicas das características diferenciadoras entre células somáticas e embriogênicas.

Em função de maior rapidez, sensibilidade e capacidade de amostragem, análises que utilizem marcadores moleculares ligados aos eventos de transição podem ser de extrema utilidade para os trabalhos de desenvolvimento de protocolos de ECS. *BBM* (*Baby Boom*), *LEC1* (*Leafy Cotyledon 1*), *AGL15* (*Agamous-like 15*), *PKL* (*Kinesin-like protein*), *WUS* (*WUSCHEL*) e *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*) são genes relacionados à embriogênese somática (BOUTILIER et al., 2002; HECK et al., 1995; LOTAN et al., 1998; DEAN RIDER et al., 2003; SCHMIDT et al., 1997; STONE et al., 2001; ZUO et al., 2002;), mas apenas o gene *SERK* é específico das células embriogênicas (SCHMIDT et al., 1997), já o gene *BBM* induz à formação espontânea de embriões somáticos em cotilédones de *Arabidopsis thaliana* transgênica quando superexpresso (BOUTILIER et al., 2002).

Objetivou-se, neste trabalho, verificar se os genes *SERK* e *BBM* podem ser usados como marcadores moleculares do potencial embriogênico de calos e células em suspensão de café (*Coffea* ssp).

Para isso, homólogos ao *SERK* e ao *BBM* foram denominados *CaSERK* e *CaBBM* respectivamente, identificados *in silico*, foram isolados dessa espécie e

seus respectivos padrões de expressão, relacionados aos eventos da embriogênese somática, foram analisados usando RT-qPCR.

Espera-se que a identificação e uso dos genes *SERK* e/ou *BBM* como marcadores do estágio embriogênico permita maior eficiência nos trabalhos de desenvolvimento de protocolos de ECS, para essa espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Genômica do cafeeiro

O café (*Coffea* L.), produzido em mais de 60 países, é um dos mais importantes produtos de exportação mundial, foi introduzido no Brasil no século XVIII e se expandiu por todas as regiões do país (KRUG et al., 1938). O cafeeiro pertence ao subgênero *Coffea*, à família *Rubiaceae* e é formado por cerca de 100 espécies, mas apenas duas têm importância econômica: *Coffea arabica* L. (Café Arábica) e *Coffea canephora* Pierre (Café Robusta), sendo o primeiro responsável por mais de 70% da produção nacional (CONAB, 2011) e mundial (HERRERA et al., 2002).

Entretanto, existem inúmeros fatores que contribuem para a redução da produtividade, como a principal doença do cafeeiro, a ferrugem (JULIATTI; SILVA, 2001; MENDES; GUIMARÃES, 1997; ZAMBOLIM et al., 1997), visto que essa doença pode causar prejuízo em 30% da produção (KUSHALAPPA; ESKES, 1989). Tais restrições podem, contudo, ser superadas com o emprego de técnicas biotecnológicas, como o uso da engenharia genética na reprodução *in vitro*, que pode proporcionar oportunidades viáveis para o desenvolvimento de genes de resistência e reforçar o cafeeiro.

Apesar dos avanços alcançados no estabelecimento de culturas de células embriogênicas em suspensão de café, esse sistema é limitado devido à baixa frequência na indução de calos e posteriormente à indução de embriões somáticos (TEIXEIRA et al., 2004). Neste contexto, as pesquisas em biotecnologia vegetal estão causando grande impacto na agricultura, o desenvolvimento da genômica tem gerado muitas informações e criado banco de dados de sequências de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), que possibilitam a

identificação dos fatores genéticos determinantes e/ou associados com características de interesse agrônômico.

O sequenciamento de ESTs é um método que apresenta uma boa relação de custo benefício para a obtenção de dados de interesse em genomas. Em plantas modelo, tais como *Arabidopsis thaliana* (HÖFTE et al., 1993) e *Oryza sativa* (YAMAMOTO; SASAKI, 1997) o sequenciamento de ESTs está contribuindo para a rápida identificação de genes responsáveis por características de interesse agrônômico, assim possibilitando a manipulação de genes desejáveis por meio de ferramentas biotecnológicas. Assim, a cultura cafeeira também está se beneficiando da genômica, por iniciativa do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), que teve início em fevereiro de 2002, com o Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC).

O projeto foi criado para desenvolver ferramentas úteis para a descoberta de genes e análise genética funcional em café e ajudar no avanço de conhecimento da organização e evolução do genoma do café. A base de dados das ESTs de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea racemosa* gerada pelo projeto resultaram na identificação de mais de 30 mil unigenes (sequências que representam um único gene) (VIEIRA et al., 2006). Essas informações fornecem recursos valiosos para estudos de processos fisiológicos no nível molecular do cafeeiro, que poderá resultar no isolamento e na caracterização de genes de importância agrônômica para o melhoramento de *Coffea*. Os genes identificados poderão ser úteis para acelerar a escolha de variedades mais produtivas e também terá utilidade para obtenção de novos cultivares com qualidades superiores (VIEIRA et al., 2006).

O PBGC gerou 214.964 ESTs de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea racemosa*. Essas sequências foram obtidas de clones de 37 bibliotecas de cDNA (Tabela 1) provenientes de diferentes tecidos de cafeeiros em diferentes

estádios de desenvolvimento e/ou sob estresses bióticos e abióticos (VIEIRA et al., 2006).

Tabela 1 Bibliotecas do Projeto Brasileiro do Genoma Café com os respectivos números de *reads*

<i>Coffea arabica</i>		
Biblioteca	Descrição	Reads
AR1	Folhas com tratamento de ácido araquidônico	1074
BP1	Bion positive - plântulas inteiras + células	3404
CA1	Calo	3416
CB1	Células em suspensão com bion e brassinosteróides	5409
CL2	Calo com e sem bion	5698
CS1	Células em suspensão com sais	4921
EA1	Calos embriogênicos	3919
EB1	Embrião zigótico (frutos imaturos)	192
EM1	Embrião de sementes germinando	88
FB1	Botão floral estágio 1 e botão floral estágio 2 – longa	4485
FB2	Botão floral estágio 1 e botão floral estágio 2 – curta	3315
FB4	Botão floral estágio 3 e botão floral estágio 4 – curta	1775
FR1	Botão floral nº 6, chumbinho nº 1, frutos estádios 1 e 2 – longa	2420
FR2	Botão floral nº 6, chumbinho nº 1, frutos estádios 1 e 2 – curta	3343
IA1	Calos embriogênicos	72
IA2	Linhagem embriogênica (folha) com indução de 2,4D	1889
IC1	Linhagem não embriogênica (folha) sem indução de 2,4D	1552
LP1	Plântulas com tratamento de ácido araquidônico	1066
LV4	Folhas jovens de galhos ortotrópicos sem bion – longa	2513
LV5	Folhas jovens de galhos ortotrópicos sem bion – curta	3464
LV8	Folhas plagiotrópicas de plantas adultas sem bion – longa	3511
LV9	Folhas plagiotrópicas de plantas adultas sem bion – curta	1597
NS1	Raízes com nematóide	286
PA1	Linhagem embriogênica (calos primários)	1534
PC1	Linhagem não embriogênica (folhas) com indução de 2,4-D	1422

Tabela 1, conclusão

RM1	Folhas com ferrugem e bicho mineiro	2307
RT3	Raiz sem bion – longa	121
RT5	Raiz com bion – longa	679
RT8	Raiz e células em suspensão na presença de alumínio – curta	2989
RX1	Ramos infectados com <i>Xylella</i>	5764
SH2	Estresse hídrico no campo (pool de tecidos)	3360
S13	Sementes germinando (inteira)	4433
SS1	Condições normais - irrigado (pool de tecidos)	579
<i>Coffea canephora</i>		
Biblioteca	Descrição	Reads
EC1	Calos embriogênicos	4616
SH1	Folhas - estresse hídrico	113
<i>Coffea racemosa</i>		
Biblioteca	Descrição	Reads
FR4	Fruto	3127
FV2	Fruto verde - estágio 1, 2 e 3	3137

Análises *in silico* são necessárias para minerar (identificar e selecionar) os dados gerados pelos projetos de sequenciamento. No PBGC, o objetivo dessas análises foi o de encontrar sequências de genes relacionados com processos biológicos de interesse, como os que envolvem a obtenção de embriões somáticos. O envolvimento desses genes nos processos biológicos deve ser confirmado usando a genômica funcional, que envolve a caracterização da variabilidade gênica, modo de expressão, função e interação dos genes em mecanismos biológicos relacionados com o estabelecimento de características agronômicas.

Uma tecnologia bastante utilizada na genômica funcional é a de marcadores moleculares, definidos como qualquer fenótipo molecular oriundos de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA;

GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores moleculares têm sido empregados no melhoramento de plantas para diversos fins (FERREIRA, 2003), que têm como exemplo: estudos de diversidade genética, caracterização de bancos de germoplasma, mapeamento gênico (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Desta forma, torna-se importante a incorporação de técnicas avançadas de biotecnologia aos métodos tradicionais de melhoramento. A utilização de marcadores moleculares pode auxiliar o melhoramento dessa espécie de forma bem ampla. As avaliações com esse tipo de tecnologia podem, por exemplo, ser realizadas em estádios iniciais de desenvolvimento da planta, com vêm demonstrando a grande importância na possível otimização de protocolos na obtenção de embriogênese somática em plantas, como o gene *SERK* (SCHMIDT et al., 1997) e o *BBM* (BOUTILIER et al., 2002).

2.2 Embriogênese somática

Embriogênese somática ou assexual é o processo pelo qual células somáticas se desenvolvem em embriões semelhantes aos embriões zigóticos (ZIMMERMAN, 1993) (Figura 1), passando, inclusive, pelo estágio globular, coração e torpedo em dicotiledôneas.

De acordo com Jiménez (2001), a embriogênese somática é um processo que pode ser dividido em duas fases: indução e expressão. Durante a fase de indução, células somáticas diferenciadas adquirem a competência e proliferam como células embriogênicas que, na fase de expressão, diferenciam-se para formar embriões somáticos.

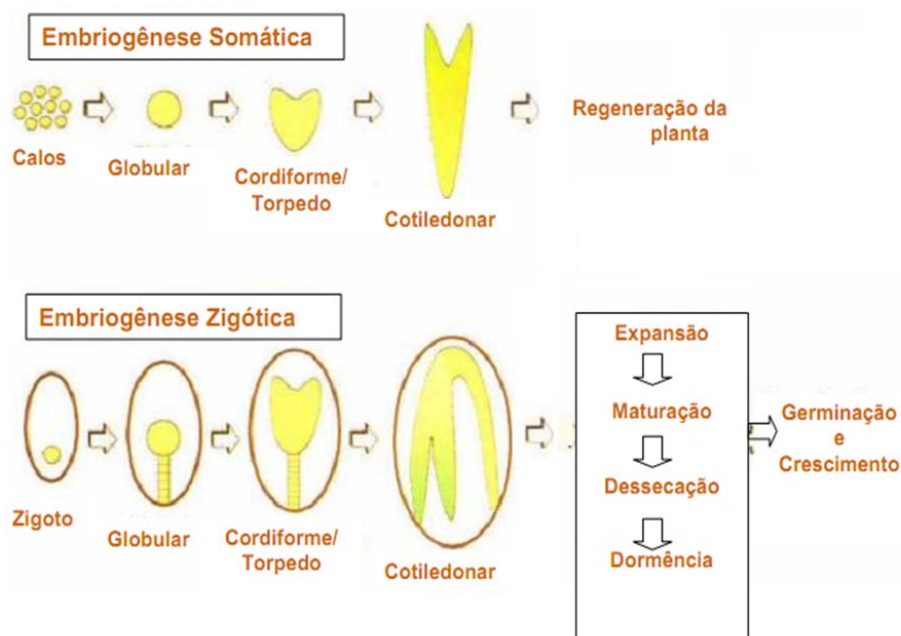


Figura 1 Diferentes estágios de desenvolvimento do embrião durante as embriogêneses somática e a zigótica. Adaptado de Zimmerman, 1993

O termo “célula embriogênica” é restrito às células que completaram sua transição do estado somático para um estado no qual estímulos exógenos são suficientes para produzir o embrião somático – por exemplo, a aplicação de reguladores de crescimento (JONG; SCHMIDT; VRIES, 1993; KOMAMINE et al., 1992). As células em estado de transição incompleto são definidas como células competentes (TOONEN et al., 1994).

Os cultivos embriogênicos contêm tipos celulares em vários estágios de desenvolvimento, presentes tanto como células isoladas ou como aglomerados celulares (VAN ENGELEN; DE VRIES, 1992) e quanto mais desuniformes

forem esses tipos, pior a qualidade do cultivo para fins tecnológicos, pois a frequência dos tipos embriogênicos é baixa.

A regeneração de plantas via embriogênese somática, inclui de modo geral cinco passos: 1º- iniciação das culturas embriogênicas pelo cultivo do explante primário em meio suplementado com reguladores de crescimento, principalmente auxinas, mas muitas vezes também citocininas; 2º- proliferação das culturas embriogênicas em meio sólido ou líquido suplementado com reguladores de crescimento de modo semelhante à iniciação; 3º- pré-maturação de embriões somáticos em meio sem reguladores de crescimento – isso inibe a proliferação e estimula a formação do embrião somático; 4º- maturação dos embriões somáticos pelo cultivo em meio suplementado com ABA e/ou com o potencial osmótico reduzido; e 5º- regeneração de plantas em meio sem reguladores de crescimento.

A embriogênese somática pode ser induzida *in vitro* por via direta ou indireta. Na via direta os embriões se desenvolvem a partir de células do tecido organizado do explante e, na indireta, os embriões se desenvolvem a partir de células de calos (ou de ECS) provenientes da dediferenciação de células do explante. Nesse caso, um meio mais complexo é requerido para induzir a dediferenciação e divisão das células do explante antes que elas expressem a competência embriogênica (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986).

As condições para a indução em diferentes espécies e cultivares são usualmente determinadas por tentativa e erro (HENRY; VAIN; BUYSER, 1994; JACOBSEN, 1991), analisando o efeito de tratamentos como balanço entre reguladores de crescimento, concentrações osmóticas, de pH, de aminoácidos e sais, choque térmico e outros (AMMIRATO, 1983; ARMSTRONG; GREEN, 1985). Um dos fatores principais das condições de indução é o balanço entre reguladores de crescimento. Embora as auxinas sejam os principais indutores, citocininas ou ácido abscísico (ABA) (NISHIWAKI et al., 2000), e mesmo

ausência de reguladores (CHOI et al., 1998) podem induzir a resposta embriogênica.

Além destas condições, a frequência de indução depende também do genótipo e do estágio de desenvolvimento do tecido usado como explante (CARMAN, 1990), bem como dos teores de fitormônios endógenos (JIMÉNEZ, 2001). Em função da amplitude de tratamentos indutores, é pouco provável que uma única molécula seja responsável pela competência embriogênica (TOONEN; DE VRIES, 1996) e pouco se conhece sobre os eventos de transição de células somáticas para células embriogênicas (JONG; SCHMIDT; VRIES, 1993).

Estudos histológicos sobre a morfologia e padrões de divisão celular durante os primeiros estágios de desenvolvimento do embrião somático que o primeiro evento é, frequentemente, uma rápida redução do vacúolo, seguida pela primeira divisão celular. Divisões celulares continuadas resultam então na formação de massas de células embriogênicas, que se caracterizam por serem pequenas, isodiamétricas, possuem alta razão núcleo/citoplasma (citoplasma denso e núcleo grande) e cujos núcleo e nucléolo são densamente corados (GARRIDO et al., 1995; GUZZO et al., 1994; FRANSZ; SCHEL, 1991; HALPERIN, 1966; HALPERIN; JENSEN, 1967; HO; VASIL, 1983; JONES; ROST, 1989; PUIGDERRAJOLS; MIR; MOLINAS, 2001; KARLSSON; VASIL, 1986; TAYLOR; VASIL, 1996;).

Embora as características histológicas sejam um parâmetro seguro para identificar células embriogênicas e, assim, avaliar a qualidade de uma suspensão celular, não está claro se a aquisição da competência embriogênica pelas células somáticas reflete unicamente o tipo morfológico (JONG; SCHMIDT; VRIES, 1993).

Pelos dados obtidos de alfafa conclui-se que a polaridade celular (KRIKORIAN; KELLY; SMITH, 1990; SANTOS; CUTTER; DAVEY, 1983) e

a primeira divisão celular assimétrica (KOMAMINE et al., 1992) estão envolvidas na iniciação da embriogênese somática, provavelmente pela interferência dos reguladores de crescimento nos gradientes de pH e campos elétricos ao redor das células (SMITH; KRİKORIAN, 1990). No entanto, um estudo no qual se acompanhou por vídeo uma suspensão celular de cenoura mostrou que também células ovais e alongadas foram capazes de se desenvolver em embriões somáticos (TOONEN et al., 1994). Isso implica que um plano determinado de divisão não é necessário para a embriogênese somática e que membros heterogêneos de uma população de células embriogênicas são capazes de formar embriões somáticos.

Sabe-se que a indução e ativação de uma variedade de genes são requisitos para a formação do embrião vegetal e muitos estudos têm empregado diferentes técnicas de *screening* para identificá-los (SCHMIDT et al., 1997).

Entretanto, o processo de aquisição da competência embriogênica pelas células somáticas deve envolver uma integração entre a reprogramação dos padrões de expressão gênica com fatores anatômicos e fisiológicos, que reflete os processos de desdiferenciação, ativação da divisão celular e mudança no destino da célula.

De fato, análises usando o gene *SERK* como marcador molecular para a competência embriogênica em cenoura indicaram dados positivos para uma classe de células alongadas da superfície do explante (SCHMIDT et al., 1997), assim como para células morfologicamente embriogênicas de *Dactylis glomerata* (SOMLEVA; SCHMIDT; DE VRIES, 2000). Estudos envolvendo a expressão ectópica do gene *BBM* em *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus* apresentaram dados positivos para a indução de embriões somáticos (BOUTILIER et al., 2002). Isso aumenta a possibilidade de que o gene *SERK*, assim como *BBM* possam estar envolvidos na aquisição da competência

embriogênica, e até mesmo no aumento do número de embriões regenerados durante a embriogênese somática.

2.3 Genes *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) e *BBM* (*Baby Boom*)

Dentre o grupo dos principais genes envolvidos na embriogênese somática (*BBM*) (BOUTILIER et al., 2002), (*LEC*) (LOTAN et al., 1998, STONE et al., 2001), (*AGLI*) (HECK et al., 1995), (*PKL*) (DEAN RIDER et al., 2003), (*WUS*) (ZUO et al., 2002) e (*SERK*) (SCHMIDT et al., 1997), somente o *SERK* foi bem sucedido como marcador específico para distinguir células individuais que formam embrião em suspensão celular de cenoura, sendo expresso durante a formação de massas pro-embriogênicas até o estágio globular (SCHMIDT et al., 1997).

Os mesmos autores observaram pela primeira vez, mediante a hidridação *in situ*, a expressão do *SERK* (*DcSERK*) em células embriogênicas de cenoura isoladas a partir de culturas induzidas com 2,4-D durante sete dias. Um padrão semelhante ao *SERK* também foi observado durante o início da embriogênese zigótica, mostrando que o *SERK* tem a mesma via de sinalização ativada tanto durante a embriogênese zigótica quanto na embriogênese somática (SCHMIT et al., 1997). Homólogos de *DcSERK* foram identificados em monocotiledôneas, como por exemplo, em *Dactylis glomerata* (SOMLEVA; SCHMIDT; DE VRIES, 2000) e *Zea mays* (BAUDINO et al., 2001), e em dicotiledôneas, por exemplo, *Arabidopsis thaliana* (HECHT et al., 2001), *Medicago truncatula* (NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003) e *Helianthus annuus* (THOMAS et al., 2004).

O gene *SERK* codifica um receptor transmembrana que contém um domínio intracelular de proteína-kinase e um domínio extracelular rico em

repetições de leucina (LRR - *Leucine-Rich Repeat*), pertencente a uma grande e diversificada família de receptores kinases em vegetais (BECRAFT, 1998). *AtSerkl*, homólogo do cDNA *SERK* de cenoura, foi isolado de *A. thaliana* como um dos cinco membros de uma família gênica, sendo detectado por hibridização *in situ* em óvulos em desenvolvimento. Em óvulos maduros, a expressão foi restrita ao saco embrionário, mas em todas as células. Nos estágios mais tardios, *AtSerkl* foi expresso no endosperma, no zigoto e nos embriões até a fase de coração, quando então a expressão cessou (HECHT et al., 2001).

Expressão ectópica de *AtSerkl* sob controle de um promotor constitutivo forte (35S::*AtSerkl*) mostrou que a frequência de iniciação de embriões somáticos foi aumentada em aproximadamente quatro vezes nas plântulas transgênicas, sugerindo que *AtSerkl* aumentou a competência embriogênica (HECHT et al., 2001). A expressão do gene *AtSerkl* também foi observada no meristema apical do caule e cotilédones de plântulas de *A. thaliana* tratadas com auxina. Esses são os melhores locais nos quais calos embriogênicos emergem em *A. thaliana* (MORDHORST et al., 1998). Essas observações indicam que a expressão de *AtSerkl* não é restrita a células embriogênicas, mas é característica daquelas capazes de responder a sinais hormonais para formar embriões somáticos (HECHT et al., 2001).

Utilizando-se hibridização subtrativa durante embriogênese de micrósporo de *Brassica napus*, foi identificado um cDNA diferencialmente expresso e passou a ser denominado *Baby Boom* (*BBM*) (BOUTILIER et al., 2002). O gene *BBM* codifica um fator de transcrição (denominado *AP2/ERF*), específico de plantas, que é relacionado ao processo embriogênico e à proliferação celular em regiões meristemáticas. Quando superexpresso em *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (BOUTILIER et al., 2002) e *Glycine max* (EL OUAKFAOUI et al., 2010), induz à formação espontânea (sem adição de reguladores) de calos embriogênicos e de embriões somáticos. Um membro da

família do *BBM* (*ANT*), produz o mesmo efeito quando superexpresso em *Arabidopsis* e, quando suprimido, provoca a redução do número de células dos calos (ELLIOTT et al., 1996; KLUCHER et al., 1996).

Em tabaco, a expressão heteróloga do *BBM* induziu à formação espontânea de raiz e calos, em que uma quantidade de citocinina foi necessária para a formação de embriões somáticos (SRINIVASAN et al., 2007)

Esses indícios levantam a hipótese de que tanto o *SERK* quanto o *BBM* possam estar envolvidos no aumento e na aquisição da competência embriogênica durante a embriogênese somática.

3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A COMPETÊNCIA EMBRIOGÊNICA

A embriogênese somática é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas diplóides desenvolvem-se em plantas diferenciadas, pelos estádios embrionários característicos, sem a fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Diferentes origens de explantes em *Coffea*, como fragmentos caulinares jovens, folhas, cotilédones, endosperma, embrião, perisperma, antera e óvulo, já foram testados para a produção de embriões somáticos (NAKAMURA et al., 1992).

Os indutores para a obtenção da embriogênese somática *in vitro* são altamente variáveis, e a resposta celular é bastante indefinida. *In vitro*, a embriogênese somática é associada a condições artificiais, altos níveis de reguladores de crescimento exógeno e outros fatores de estresse. Embora a embriogênese somática desenvolva embriões somáticos semelhantes aos embriões zigóticos, elas diferem em seus pontos de partida. Enquanto a embriogênese zigótica começa com a dupla fecundação, a embriogênese somática começa com a desdiferenciação e rediferenciação de células somáticas, mas os eventos moleculares que ocorrem durante a embriogênese somática e

zigótica são semelhantes a partir de uma fase precoce do desenvolvimento embrionário.

Os melhores genes caracterizados até o momento e que podem ser associados com aquisição e aumento da competência embriogênica são os genes *SERK* e o *BBM*, identificados pela primeira vez por Schmidt et al. (1997) e por Boutilier et al. (2002), respectivamente.

De modo geral, a super expressão do *SERK* em *Arabidopsis thaliana* aumenta a frequência de iniciação de embriões (HECHT et al., 2001), já o *BBM* quando superexpresso em *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, induz à formação espontânea (sem adição de reguladores) de calos embriogênicos e de embriões somáticos (BOUTILIER et al., 2002).

O estabelecimento de suspensões celulares embriogênicas a partir de calos friáveis embriogênicos em *Cofea*, tem mostrado variação intraespecífica (BERTHOULY; MICHAUX-FERRIERE, 1996; BIEYSSE; GOFFLOT; MICHAUX-FERRIERE, 1993), principalmente com relação à necessidade e ao tipo de reguladores de crescimento (BIEYSSE; GOFFLOT; MICHAUX-FERRIERE, 1993). Assim, o uso de marcadores moleculares, tais como o *SERK* e *BBM*, relacionado com a competência embriogênica pode ser de importância para a otimização dos protocolos de aquisição de suspensões celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P. V. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. p. 82-123

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.

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

BECRAFT, P. W. Receptor kinases in plant development. **Trends in plant science**, v. 3, n. 10, p. 384-388, 1998.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, n. 2, p. 169-176, 1996.

BIEYSSE, D.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal of Botany**, v. 71, n. 11, p. 1496-1502, 1993.

BORÉM, A.; CAIXETA, T. C. **Marcadores Moleculares**. UFV. Viçosa/MG: 2006.

BOUTILIER, K. et al. Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. **The Plant Cell Online**, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, 2002.

CARMAN, J. Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behavior. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 26, n. 8, p. 746-753, 1990.

CHOI, Y. E. et al. Plant regeneration via adventitious bud formation from cotyledon explants of *Panax ginseng* C. A. Meyer. **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 9, p. 731-736, 1998.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 1º **Estimativa**, Brasília, 2011. Disponível em: < www.abic.com.br/estat_pagricola.html >. Acesso em: 15 Fev. 2011.

DEAN RIDER, S. et al. Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 35, n. 1, p. 33-43, 2003.

EL OUAKFAOUI, S. et al. Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. **Plant Molecular Biology**, v. 74, n. 4, p. 313-326, 2010.

ELLIOTT, R. C. et al. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like Gene of Arabidopsis with Pleiotropic Roles in Ovule Development and Floral Organ Growth. **The Plant Cell Online**, v. 8, n. 2, p. 155-168, 1996.

FERREIRA, M. A. J. F. Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas. **Embrapa Roraima.Documentos**, v. 1, p. 63, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FRANSZ, P. F.; SCHEL, J. H. N. An ultrastructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 4, p. 858-865, 1991.

GARRIDO, D. et al. Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. **Protoplasma**, v. 186, n. 3, p. 220-230, 1995.

GUZZO, F. et al. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 10, p. 1427-1432, 1994.

HALPERIN, W. Single Cells, Coconut Milk, and Embryogenesis in vitro. **Science**, v. 153, n. 3741, p. 1287-1288, 1966.

HALPERIN, W.; JENSEN, W. A. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 18, n. 3-4, p. 428-443, 1967.

HECHT, V. et al. The Arabidopsis Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. **Plant Physiology**, v. 127, n. 3, p. 803-816, 2001.

HECK, G. R. et al. AGL15, a MADS Domain Protein Expressed in Developing Embryos. **The Plant Cell Online**, v. 7, n. 8, p. 1271-1282, 1995.

HERRERA, J. C. et al. Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora* genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. arabica* × *C. canephora*). **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 661-668, 2002.

HO, W. J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasma**, v. 118, n. 3, p. 169-180, 1983.

HÖFTE, H. et al. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*†. **The Plant Journal**, v. 4, n. 6, p. 1051-1061, 1993.

JACOBSEN, H.-J. Biochemical and molecular studies on plant development *in vitro*. In: BISWAS, B. B. e HARRIS, J. R. (Ed.). **Subcellular Biochemistry: Plant Genetic Engineering**. New York: Plenum Press, v.17, 1991. p.265-277.

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

JONES, T. J.; ROST, T. L. The developmental anatomy and ultra-structure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. **Botanical Gazette**, v. 150, p. 41-49, 1989.

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

JULIATTI, F. C.; SILVA, S. A. D. **Antracnose - *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. e outras espécies: manejo integrado de doenças na cafeicultura do cerrado**. Uberlândia: UFU, 2001. p. 37-50

KARLSSON, S. B.; VASIL, I. K. Growth, cytology and flow cytometry of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* jacq. and *Pennisetum purpureum* schum. **Journal of Plant Physiology**, v. 123, p. 211-227, 1986.

KLUCHER, K. M. et al. The AINTEGUMENTA Gene of *Arabidopsis* Required for Ovule and Female Gametophyte Development Is Related to the Floral Homeotic Gene APETALA2. **The Plant Cell Online**, v. 8, n. 2, p. 137-153, 1996.

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

KOMAMINE, A. et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures – physiology, biochemistry and molecular biology. In: NIJKAMP, H. J. J.; PLAS, L. H. W. V. D., *et al* (Ed.). **Progress in Plant Cellular and Molecular Biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p.307- 313.

KRIKORIAN, A. D.; KELLY, K.; SMITH, D. L. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Plant Hormones and their role in plant growth and development. In: (Ed.). **Plant Hormones and their role in plant growth and development**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990. p.593-613.

KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.; CARVALHO, A. **Taxonomia de *Coffea arabica* L. : descricao das variedades e formas encontradas no Estado de Sao Paulo**. Campinas: Instituto Agronomico do Estado, 1938.

KUSHALAPPA, A. C.; ESKES, A. B. **Coffee rust: epidemiology, resistance and management**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1989. 345 pp.

LOTAN, T. et al. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 Is Sufficient to Induce Embryo Development in Vegetative Cells. **Cell**, v. 93, n. 7, p. 1195-1205, 1998.

MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade - plantio e formação da lavoura cafeeira**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 42

MORDHORST, A. P. et al. Somatic Embryogenesis in Arabidopsis thaliana Is Facilitated by Mutations in Genes Repressing Meristematic Cell Divisions. **Genetics**, v. 149, n. 2, p. 549-563, 1998.

MORICOCCHI, L. et al. Perfil tecnológico da indústria de café torrado e moído. **Agricultura em São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 53-72, 2003.

NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, T.; MAEDA, E. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 61, n. 3, p. 476-486, 1992.

NISHIWAKI, M. et al. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, v. 211, n. 5, p. 756-759, 2000.

NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; ROSE, R. J. Auxin Up-Regulates MtSERK1 Expression in Both *Medicago truncatula* Root-Forming and Embryogenic Cultures. **Plant Physiology**, v. 133, n. 1, p. 218-230, 2003.

PUIGDERRAJOLS, P.; MIR, G.; MOLINAS, M. Ultrastructure of Early Secondary Embryogenesis by Multicellular and Unicellular Pathways in Cork Oak (*Quercus suber* L.). **Annals of Botany**, v. 87, n. 2, p. 179-189, 2001.

SANTOS, A. V. P. D.; CUTTER, E. G.; DAVEY, M. R. Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (alfalfa). **Protoplasma**, v. 117, n. 2, p. 107-115, 1983.

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

SMITH, D. L.; KRIKORIAN, A. D. Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 34-37, 1990.

SOMLEVA, M. N.; SCHMIDT, E. D. L.; DE VRIES, S. C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 7, p. 718-726, 2000.

SRINIVASAN, C. et al. Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Planta**, v. 225, n. 2, p. 341-351, 2007.

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

STONE, S. L. et al. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11806-11811, September 25, 2001.

TAYLOR, M.; VASIL, I. Quantitative analysis of ultrastructural changes during zygotic and somatic embryogenesis in pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.). **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, n. 5, p. 286-298, 1996.

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

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

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

TOONEN, M. A. J.; VRIES, S. C. D. Initiation of somatic embryos from single cells. In: WANG, T. L. e CUMING, A. (Ed.). **Embryogenesis, the generation of a plant**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1996. p.173-190.

VAN ENGELLEN, F. A.; DE VRIES, S. C. Extracellular proteins in plant embryogenesis. **Trends in Genetics**, v. 8, n. 2, p. 66-70, 1992.

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

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. **Annals of Botany**, v. 57, n. 4, p. 443-462, 1986.

YAMAMOTO, K.; SASAKI, T. Large-scale EST sequencing in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 135-144, 1997.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R. D. e ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa:UFV: Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. cap. 3, p.120-122.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. **The Plant Cell Online**, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, 1993.

ZUO, J. et al. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 30, n. 3, p. 349-359, 2002.

SEGUNDA PARTE
ARTIGOS

ARTIGO 1
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA *JOURNAL OF PLANT*
PHYSIOLOGY
(VERSÃO PRELIMINAR)

ANÁLISE *IN SILICO* E EXPRESSÃO QUANTITATIVA *IN VITRO* DE UM POSSÍVEL ORTÓLOGO DE *SERK* EM SUSPENSÃO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Coffea arabica* L. (*CaSERK*)

Anderson Tadeu Silva¹; Luciano Vilela Paiva^{1,2*}; Douglas Barduche¹; Kalynka Gabriella do Livramento¹

¹ Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil; ² Departamento de Química, UFLA, Brasil.

* **Autor correspondente:** luciano@dqi.ufla.br; fax: +55-35-3829-1624

RESUMO

A obtenção de suspensões de células embriogênicas (ECS - *Embryogenic Cell Suspension*) tem sido o alvo em trabalhos de indução *in vitro* à embriogênese somática com objetivos biotecnológicos, devido a maior eficiência das ECS como material vegetal para transformação genética, produção em larga escala ou criopreservação de germoplasma. No entanto, a metodologia para obtenção de ECS é quase empírica, devido aos protocolos experimentais serem genótipo-dependentes. Análises histológicas das características diferenciadoras entre células somáticas e embriogênicas podem ser usadas para aumentar a eficiência metodológica, porém, não permitem o diagnóstico dos eventos indutores da transição entre essas características e, portanto, o estudo e obtenção de marcadores moleculares ligados a esses eventos passam a ser de extrema utilidade. Nesse contexto, inicialmente foi realizada uma busca de sequências homólogas ao gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) a partir de sequências candidatas obtidas no banco de ESTs (*Expression Sequences Tags*), gerado pelo Projeto Genoma Café Brasileiro. Dessa busca foram obtidos 18

ESTs-*contigs* que apresentaram o domínio conservado das kinases (Pkc), presente na sequência do *SERK*. A expressão *in vitro* de três ESTs-*contigs* (C36, C166 e C170), que mostraram expressão *in silico* em bibliotecas de materiais embriogênicos e calos não embriogênicos de cafeeiro (Vieira et al., 2006), foi quantificada via RT-qPCR em calos embriogênicos (CE), calos não embriogênicos (CNE) e suspensões celulares embriogênicas (ECS) de *Coffea arabica* cv. Catiguá. O ESTs-*contig* 166, que apresentou também os domínios ricos em leucina (LRR) e prolina (SPP) de *SERK*, formando um grupo isolado em alta similaridade com os homólogos *DcSERK* (de *Dacus carota*), *AtSERK1* e *AtSERK3* (de *Arabidopsis thaliana*), foi expresso *in vitro* aproximadamente 3,8 vezes mais em ECS do que em CE. Os ESTs-*contigs* 36 e 170 não se agruparam com C166 e foram expressos em ECS numa proporção de aproximadamente 12,5 e 3,6 vezes menores que C166, respectivamente. Em CE, a expressão de C36 foi praticamente basal, enquanto C170 não foi expresso. Todos apresentaram expressão basal em CNE. Esses dados sugerem que C166 seja o possível ortólogo de *SERK* em *C. arabica* (*CaSERK*) e indicam que essa estratégia pode aumentar ainda mais a eficiência metodológica para a obtenção de ECS em *C. arabica* e em outras espécies.

Palavras-chave: *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase* Suspensões de células embriogênicas Biotecnologia ESTs-*contigs* PCR em Tempo Real

Análise *in silico* e expressão quantitativa *in vitro* de um possível ortólogo de *SERK* em suspensão de células embriogênicas de *Coffea arabica* L. (*CaSERK*)

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática – formação do embrião a partir de células somáticas, é um mecanismo de reprodução assexuada natural em algumas espécies vegetais, mas que pode ser induzido *in vitro* de modo generalizado. Porém, as condições experimentais de indução à embriogênese somática – ou da aquisição do potencial embriogênico pela célula somática, são específicas ao genótipo, tecido e fase de desenvolvimento da planta matriz, o que torna praticamente empírica a obtenção dos protocolos (Namasivayam, 2007).

No entanto, análises histológicas podem aumentar a eficiência metodológica. Células com potencial embriogênico caracterizam-se por serem pequenas, isodiamétricas, possuírem núcleo grande, nucléolo evidente, citoplasma denso, microvacúolos e serem ricas em amiloplastos (Georget et al., 2000; Quiroz-Figueroa et al., 2006; Namasivayam, 2007), assemelhando-se às células meristemáticas (Guerra et al., 1999). De fato, em agrupamentos de células embriogênicas, contidos em suspensões celulares de banana, as células que estão formando o embrião (embrionárias) têm poucos amiloplastos, mas são circundadas pelas embriogênicas (Georget et al., 2000), de modo que se estabelece uma relação entre fonte e dreno dentro do agrupamento. Esses dados foram usados para classificar e avaliar a qualidade de ECS de banana (Georget et al., 2000).

Embora as análises histológicas sejam de grande utilidade metodológica na obtenção de ECS, obviamente não permitem detectar os eventos moleculares que induzem à diferenciação morfológica associada ao potencial embriogênico.

Portanto, a detecção desses eventos nas fases iniciais do cultivo *in vitro* pode ser um fator fundamental para o aumento da eficiência.

Nesse contexto, sabe-se que vários genes são diferencialmente expressos durante as fases de indução, desenvolvimento e maturação do embrião zigótico ou somático. Dentre todos os genes envolvidos na aquisição do potencial embriogênico, o gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*) tem sido considerado o marcador mais específico.

O *SERK* codifica uma proteína transmembranar que contém o domínio intracelular conservado das kinases (Pkc – *Protein Kinase*) (Hanks et al., 1988) e um domínio extracelular que contém repetições ricas em leucina (LRR – *Leucine-Rich Repeat*), associado às interações proteína-proteína (Diévert e Clark, 2004; Kobe e Deisenhofer, 1994). O domínio LRR diferencia as proteínas *SERK* das demais kinases receptoras de membrana (RLK – *Receptor-Like Kinase*) (Schimit et al., 1997; Hecht et al., 2001) e as caracterizam como LRR-RLKs exclusivas de plantas (Walker, 1994). Porém, as proteínas *SERK* contêm mais um domínio extracelular rico em prolina (SPP), talvez associado à interações com a parede celulósica, que ainda as distinguem das demais LRR-RLKs (Hecht et al., 2001).

A provável função das proteínas LRR-RLKs reside no mecanismo de transdução de sinais. Em resposta a um estímulo, as LRR-RLKs formam homo- ou heterodímeros com outras RLKs, causando a fosforilação do domínio intracelular Pkc e desencadeando as reações em cascata da transdução do sinal (Hecht et al., 2001; Becraft, 1998; Becraft, 2002). Desse modo, LRR-RLKs estariam envolvidas em vários processos celulares, incluindo a embriogênese. A comunicação célula-célula é importante para a formação do embrião e um dos mecanismos de comunicação propostos é a sinalização via LRR-RLKs (von Arnold et al., 2002). De fato, o padrão temporal de expressão do *SERK* compreende desde as fases de aquisição do potencial embriogênico até a fase

globular do embrião (Schmidt et al., 1997), coincidindo, de modo geral, com o requerimento de auxinas para a multiplicação celular indiferenciada na formação de calos (Nolan et al., 2003; Sharma et al., 2008; Singla et al., 2008) e com o requerimento da ausência do regulador para que ocorra o espessamento das paredes celulares (Vasil, 1988), que é um possível fator de formação da ectoderme do pré-embrião, necessária para que ocorram as divisões celulares periclinais que dirigem a organização tecidual do embrião em desenvolvimento (von Arnold, 2008).

A expressão de *SERK* foi identificada pela primeira vez em células somáticas individuais que formam embrião em suspensão de cenoura (Schmidt et al., 1997) e abrange desde a formação de massas pró-embriogênicas até o estágio globular de embriões em cenoura (Schmidt et al., 1997), *Dactylis glomerata* (Somleva et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001), *Helianthus annuus* (Thomas et al., 2004), *Medicago truncatula* (Nolan et al., 2003), *Ocotea glomerata* (Santa-Catarina et al., 2004), *Citrus unshiu* (Shimada et al., 2005), *Theobroma cacao* (de Oliveira Santos et al., 2005) e *Musa* spp (Huang et al., 2010). Em *Arabidopsis*, a superexpressão do *AtSERK1* ocasionou aumento na taxa de formação de embriões somáticos (Hecht et al., 2001) e mais da metade das RLKs encontradas nesta planta modelo contêm de 1 a 32 LRRs (Shiu e Bleecker, 2001), o que torna o *motif* extracelular exclusivo de plantas mais comumente encontrado nas interações proteína-proteína (Kobe e Deisenhofer, 1994; Diévar e Clark, 2004).

Neste trabalho, possíveis homólogos do *SERK* foram identificados *in silico* e quantitativamente expressos (RT-qPCR) em materiais histologicamente qualificados como calo embriogênico (CE), calo não embriogênico (CNE) e suspensão de células embriogênicas (ECS) de *C. arabica* cv. Catiguá, com o objetivo de avaliar o uso do *SERK* como marcador molecular do potencial

embriogênico de cultivos *in vitro* de cafeeiro, durante o desenvolvimento de protocolos para ECS dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Busca de sequências homólogas ao *SERK*

Sequências candidatas ao gene *SERK* foram obtidas no banco de ESTs (*Expression Sequences Tags*) gerado pelo Projeto Genoma Café Brasileiro (Vieira et al., 2006). Por meio da interface *Gene Project* desse projeto (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe>), foi possível buscar *reads* e formar *clusters* a partir da consulta com as palavras-chave “*SERK*” e “*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*” e do BLAST (*Basic Local Alignment Search*; Altschul et al., 1997) de oito sequências nucleotídicas (BLASTn) de *SERK* e suas respectivas sequências aminoácídicas (tBLASTn) (acessos: AJ863559.1; AY570507.1; EF370120.1; AB188249.1; AF485384.1; AF485385.1; AF485386.1; EF623824.1) depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dessa busca foram selecionados 866 *reads* que mostraram alinhamento significativo ($e\text{-value} > 10^{-4}$). Esses *reads* foram agrupados em *clusters*, formando 175 ESTs-*contigs* e 286 *singlets*. As sequências aminoácídicas desses ESTs-*contigs* foram deduzidas usando a interface ExPASy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) e a integridade do domínio Pkc presente no *SERK* foi verificada utilizando o programa NCBI *Conserved Domain Search*. Sequências com o domínio Pkc completo foram comparadas com as sequências de *SERK* usando o algoritmo BLASTx. Destes, 18 ESTs-*contigs* que apresentaram similaridade foram agrupados em um dendrograma com sequências de *SERK* e analisados quanto à expressão gênica *in silico* nas bibliotecas do Projeto Genoma Café Brasileiro.

Dendrograma de similaridade

As sequências dos 18 ESTs-*contigs* selecionados, similares ao *SERK* e/ou de kinases foram alinhadas (ClustalW; Thompson et al., 1994) e agrupadas (MEGA 4; Tamura et al., 2007), usando o modelo de comparação *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), pelo método de *p distance* e supressão *pair-wise*. A validade do dendrograma quanto à distância dos clusters foi dada pelo teste probabilístico de *bootstraps* (Sitnikova et al., 1995).

Expressão gênica *in silico* – Northern eletrônico

Para análise da expressão gênica *in silico*, as frequências dos *reads* formadores de cada ESTs-*contig* expresso nas bibliotecas foram normalizadas, já que as bibliotecas não possuíam o mesmo tamanho. A normalização consistiu em multiplicar a frequência de cada *read* pela razão entre o número total de *reads* de todas as bibliotecas e o número de *reads* da biblioteca na qual o dado *read* foi expresso. Com os resultados da normalização, uma matriz foi processada usando os programas *Cluster* e *TreeView* (Eisen et al., 1998), na qual se relacionaram bibliotecas e *clusters* de ESTs-*contigs*, agrupados por *hierachial clustering*. Dos resultados *in silico*, foram selecionados três ESTs-*contigs* para analisar quantitativamente a expressão dos genes candidatos em materiais vegetais.

Material Vegetal

Calos Embriogênicos (CE), Calos Não Embriogênicos (CNE) e Suspensão de Células Embriogênicas (ECS) constituíram os materiais vegetais utilizados para a obtenção de RNA. Estes materiais foram obtidos após o quinto mês de cultivo *in vitro* de explantes foliares de *C. arábica* cv. Catiguá, de acordo com Teixeira et al. (2004) e assim foram caracterizados a partir de análises histológicas. Os trabalhos foram realizados no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Caracterização histológica

Amostras dos materiais vegetais foram fixadas com FAA₅₀ (10% de formol a 40% + 5% de ácido acético + 50% de etanol, v/v) durante 48h sob temperatura ambiente, desidratadas em série etílica (60 a 100%) e incluídas em resina epoxi (Historesin[®], Leica) de acordo com protocolo do fabricante. Seções com 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotatório manual (Reichert-Jung, 1130), coradas com azul de toluidina a 0,05% e observadas sob microscópio de luz (Zeiss, Axioscope).

Quantificação da expressão gênica

A expressão dos genes candidatos foi quantificada mediante RT-qPCR com *primers* desenhados no programa *Primer Express 3.0* (*Applied Biosystem*) a partir das sequências dos três ESTs-*contigs* selecionados *in silico* e das sequências de *ACTIN* e de *GAPDH* de cafeeiro (Barsalobres-Cavallari et al., 2009), usadas como controle endógeno. Para os ensaios, foi extraído RNA total de CE, CNE e ECS em três repetições biológicas com o *Kit NucleoSpin[®]* (*Macherey-Nagel*), de acordo com o protocolo do fabricante. A verificação quanto à ausência de DNA foi feita mediante uma PCR com o controle endógeno *ACTIN*. A integridade do RNA extraído e a eliminação do DNA foram avaliadas em gel de agarose a 1,2% e as amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria (*NanoDrop 1000*). O grau de pureza das amostras foi determinado pela razão entre A260/A280 e A260/A230, considerada ideal dentro do intervalo entre 1,6 a 2,1. As soluções de RNA das repetições foram juntadas em um *pool* de RNA, na concentração final de 100 ng/µL. Em seguida, foram sintetizados cDNAs em reações de transcrição reversa usando o *Kit High-Capacity[®]* (*Applied Biosystems*), de acordo com protocolo do fabricante. Essas reações foram realizadas com 10 µL do mix de reação do *kit* + 10 µL do *pool* de RNA [1 µg] durante 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C e 5 min a 85 °C. Com os

cDNAs obtidos, foram realizadas amplificações [ABI PRISM 7500 Real-Time PCR; software versão 2.0.1 (Applied Biosystems)] com o SYBR[®] Green, de acordo com o protocolo do fabricante. As amplificações ocorreram com, aproximadamente, 10 ng de cDNA + 10 ng de *primer* durante 5 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e finalizadas durante 15 s a 95 °C. Os dados de expressão, resultantes das amplificações, foram normalizados [$\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{controle endógeno})$] e quantificados relativamente ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$) com base nos Cts (*Cycle Threshold*) da expressão dos controles endógenos (calibrador) [$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$] *ACTIN* e *GAPDH* presentes na mesma reação. A eficiência das reações foi aferida mediante a equação $(1+E) = 10^{(-1/\text{slope})}$ (Ramakers et al., 2003). Todos os pares de *primers* tiveram eficiência maior que 0,86.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão quantitativa de genes marcadores do processo embriogênico pode ser um fator chave para o aumento de eficiência metodológica durante o desenvolvimento de protocolos para a obtenção de ECS, com objetivos biotecnológicos. A expressão de três ESTs-*contigs* isolados a partir de bibliotecas de materiais embriogênicos e de calos não embriogênicos provenientes de cafeeiro (Vieira et al., 2006) foi quantificada em ECS, CE e CNE provenientes de *C. arabica* cv Catiguá. Um desses ESTs-*contigs* se agrupou *in silico* com o gene *SERK* e mostrou expressão *in vitro* em ECS. O *SERK* pertence a uma família multigênica que codifica um receptor de membrana kinase-símile específico de plantas cuja função tem sido associada à percepção de moléculas sinalizadoras que desencadeiam o processo embriogênico em células somáticas ou zigóticas (Schmidt et al., 1997; Thomas e Jimenés, 2005; Ikeda et al., 2006) e tem sido especificamente expresso desde as fases iniciais da embriogênese somática até a fase globular do embrião em várias

espécies (Schmidt et al., 1997; Somleva; et al., 2000; Hetch et al., 2001; Thomas et al., 2004; Nolan, et al., 2003; Santa-Catarina et al., 2004; Shimada et al., 2005; de Oliveira Santos et al., 2005; Huang et al., 2010).

Caracterização histológica

As suspensões celulares foram iniciadas a partir de calos embriogênicos. Esses calos, de coloração amarelo-creme e de estrutura granulosa e friável (Figura 1 A), são tidos como adequados ao estabelecimento de suspensões celulares, pois podem originar embriões somáticos numa frequência elevada em café (Teixeira et al., 2004) e banana (Georget et al., 2000; Strosse et al., 2003), enquanto que calos não embriogênicos, de estrutura cristalina e aquosa (Figura 1 A), apresentam grande quantidade de células vacuoladas, que, neste trabalho, aparentaram avançado processo de degeneração (Figura 1). O agrupamento de células embriogênicas, densamente coradas com azul de toluidina, tanto em ECS, quanto em CE (Figura 1), aparentemente representa a fase de proembrióide, que é a primeira etapa na formação de embriões somáticos (Bieysse et al., 1993). Embriões somáticos originam-se desses agrupamentos. Durante sua formação, se estabelece uma relação fonte dreno, morfologicamente estruturada por um subgrupo de poucas células com poucos amiloplastos (embrionárias); circundadas por uma grande quantidade de células embriogênicas, ricas em amiloplastos (Georget et al., 2000).

Análise *in silico* e expressão gênica das sequências dos possíveis homólogos

Das buscas *in silico* foram obtidos 175 ESTs-*contigs* com similaridade significativa ao *SERK* ($e\text{-value} > 10^{-4}$). Desses ESTs-*contigs*, 18 apresentaram o domínio Pkc completo (Figura 2) e/ou similaridade ao *SERK*, e foram submetidos ao *Northen* eletrônico em bibliotecas de cafeeiro (Vieira et al., 2006) (Figura 3). ESTs-*contigs* que foram expressos tanto em materiais embriogênicos, quanto em calos não embriogênicos e que não se agruparam com os homólogos de *SERK* foram descartados para a posterior análise *in vitro*, restando três ESTs-

contigs (C36, C166 e C170) escolhidos pelos fatos de (i) C166 ter mostrado maior expressão em três bibliotecas de materiais embriogênicos [células em suspensão tratadas com NaCl (CS1), calos embriogênicos primários (PA1) e calos embriogênicos (EA1, IA1, IA2) (Figura 3)] e ter apresentado os domínios LRR e SPP, em alta similaridade com *DcSERK* (Schmit et al., 1997), *AtSERK1* e *AtSERK3* (Hecht et al., 2001) (Figura 4), sendo o único dos três ESTs-*contigs* que formou um grupo distinto com os homólogos do *SERK* (Figura 5); (ii) C36 ter sido expresso somente na biblioteca de calos não embriogênicos tratados e não tratados com 2,4-D [CA1, IC1, PC1 (Figura 3)]; e (iii) C170 ter sido expresso somente em biblioteca de células em suspensão tratadas com acibenzolar-S-metil e brassinosteróides [BP1 e CB1 (Figura 3)].

Com base nesses resultados, foram desenhados *primers* para as sequências desses três ESTs-*contigs* para quantificar *in vitro* a expressão dos mesmos em ECS, CE e CNE de *C. arabica* cv. Catiguá. Os dados mostram (i) expressão variável de C166 em todos materiais, porém, mais expressiva em ECS; (ii) menor expressão de C170, praticamente restrita a ECS; e (iii) expressão praticamente basal de C36, em todos os materiais (Figura 6).

Embora C166 tenha sido expresso *in vitro* em todos materiais de *C. arabica* cv. Catiguá e homólogos do *SERK2* mostrem expressão constitutiva [*AtSERK2* (Baudino et al., 2001), *OsSERK* (Ito; et al., 2005), *ZmSERK2* (Baudino et al., 2001) e *VvSERK2* (Schellenbaum et al., 2008)], a maior expressão de C166 em ECS (Figura 6) indica que a expressão foi diferencial em cafeeiro. Além disso, C166 apresentou alta homologia com *AtSERK1*, *AtSERK3* e *DcSERK*, que foram expressos em materiais embriogênicos (Schmidt et al., 1997; Hecht et al., 2001). *VvSERK1* e *VvSERK3* também foram expressos em materiais embriogênicos e agrupados com *AtSERK* (Schellenbaum et al., 2008). Desse modo, é mais plausível considerar que a expressão de C166 em todos os materiais seja devido à heterogeneidade dos mesmos quanto às porções de

células embriogênicas e não embriogênicas, embora CNE pareça menos heterogêneo (Figura 1).

Portanto, considerando (i) a possibilidade dos dados de expressão *in vitro* terem refletido a heterogeneidade do material vegetal; (ii) a indicação de que o C166 funcione como um receptor de membrana do tipo LRR-RLK (Walker, 1994), devido à predição das estruturas LRR, SPP e Pkc de *SERK* (Hanks et al., 1988), em alta homologia com *AtSERK1*, *AtSERK3* e *DcSERK* (Figura 4); e (iii) sua expressão *in silico* em bibliotecas de materiais embriogênicos (Vieira et al., 2006) (Figura 3) e *in vitro* em ECS e CE de cafeeiro cv Catiguá (Figura 6), sugere-se que o ESTs-*contig* 166 seja o principal candidato a marcador molecular para a competência embriogênica de ECS de cafeeiro – ou, o ortólogo do *SERK* em *C. arabica* sendo denominado *CaSERK*.

Os ESTs-*contigs* 36 e 170 apresentaram o domínio completo das kinases, mas não se agruparam com o C166 e os homólogos de *SERK* (Figura 5). A expressão do C170 foi 3,6 vezes menor que a do C166 em ECS e não foi expresso em CE (Figura 6). Dada a heterogeneidade desses materiais vegetais, esperava-se que o C170 fosse expresso também em CE, assim como o C166, apesar da não expressão em CE estar de acordo com a expressão *in silico*, na qual o C170 foi expresso apenas na biblioteca de células em suspensão tratadas com acibenzolar-S-metil e brassinosteróides (Figura 3). O fato do C170 ter sido expresso nessa biblioteca o relaciona ao mecanismo de sinalização via brassinosteróides que controla a imunidade inata de genótipos resistentes à patógenos (Karlova et al., 2006, 2009). *SERK3* faz parte desse mecanismo, e esse membro da família *SERK*, também denominado *BAK1* [*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1) - ASSOCIATED KINASE1*], é um correceptor de *BRI1*. Em *Arabidopsis*, a função imunológica de *SERK3* é dependente de brassinosteróides exógenos e parcialmente redundante com *SERK1* (Albrecht et al., 2008). Em *Musa* spp, *MaSERK1* foi associado à

competência embriogênica de ECS, bem como à resistência contra *Fusarium*, num estudo entre uma cultivar resistente, que expressa *MaSERK1* em alto nível sob pressão de inóculo e outra suscetível, que não expressa (Huang et al., 2010). Como o C170 não pertence à família do *SERK*, ele representa uma kinase-símile que pode ou não estar envolvida como um cofator na provável função sinalizadora do C166 [*CaSERK* em alta homologia com *AtSERK1* e *AtSERK3* (Figura 4)], já que ambos foram expressos em ECS. Além dessa, permanece em aberto a questão da expressão do C170 em ECS, mas não em CE, ambos materiais heterogêneos quanto às quantidades de células embriogênicas e não embriogênicas.

De modo semelhante ao C170, esperava-se que o C36 fosse expresso de modo significativo em CNE, de acordo com a expressão *in silico* restrita a bibliotecas de calos não embriogênicos induzidos ou não com 2,4 D (CA1, IC1, PC1; Figura 3). No entanto, a expressão foi praticamente basal em todos os materiais vegetais (Figura 6). Dada a heterogeneidade dos mesmos, era esperado que o C36 fosse expresso em baixos níveis em ECS e CE. Porém, o nível mais baixo foi justamente em CNE (Figura 6). A explicação mais plausível para isso é que grande parte das células dos CNEs nesse trabalho aparentemente encontravam-se em avançado estágio de degradação, dado o alto grau de vacuolização e de desestruturação celular (Figura 1 D). O ESTs-*contig* 36 foi escolhido como um controle negativo do processo embriogênico, no entanto, a expressão praticamente basal e constante nos materiais heterogêneos de ECS e CE indicam que a expressão do C36, uma kinase-símile, pode ter sido constitutiva (Figura 6).

Os dados obtidos com os ESTs-*contigs* 36 e 170 não foram conclusivos quanto à função biológica, nem quanto ao uso proposto. No entanto, talvez as respostas de expressão desses ESTs-*contigs* sejam diferentes em materiais vegetais menos heterogêneos e/ou calos não embriogênicos viáveis, isso é, que

apresentem células viáveis independentemente da capacidade embriogênica. Por outro lado, na obtenção de ECS para fins biotecnológicos, os materiais vegetais sob desenvolvimento *in vitro* são sempre heterogêneos e, nessas condições, o ESTs-contig 166, provável ortólogo do *SERK* em *C. arabica* (*CaSERK*), mostrou que pode ser um bom parâmetro de avaliação do potencial embriogênico de materiais vegetais de cafeeiro sob desenvolvimento *in vitro*.

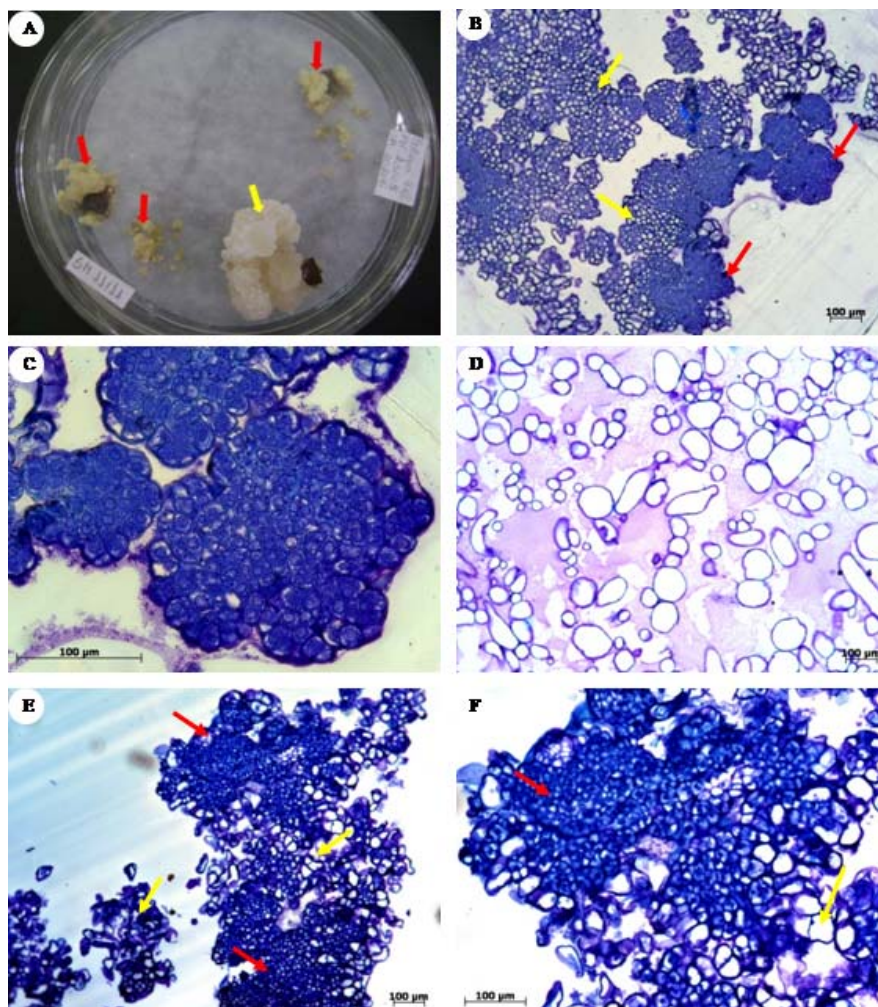


Figura 1 Morfologia de CE, CNE e ECS. [material embriogênico (**setas vermelhas**); material não embriogênico (**setas amarelas**)]. **A**: CE e CNE após 5 meses de cultivo. **B**, **C**, **D**, **E** e **F**: Cortes histológicos de (**B**), CE heterogêneo mostrando agrupamentos de células embriogênicas (densamente coradas) e não embriogênicas (vacuoladas); (**C**), detalhe de células embriogênicas em CE mostrando núcleo proeminente e citoplasma denso; (**D**), detalhe de células vacuoladas em CNE; (**E** e **F**) ECS heterogênea

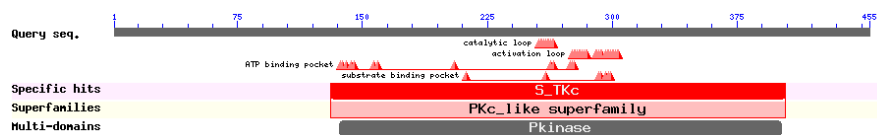


Figura 2 Domínio Pkc do C166 denominado *CaSERK*, identificado no programa NCBI *Conserved Domains Search*.

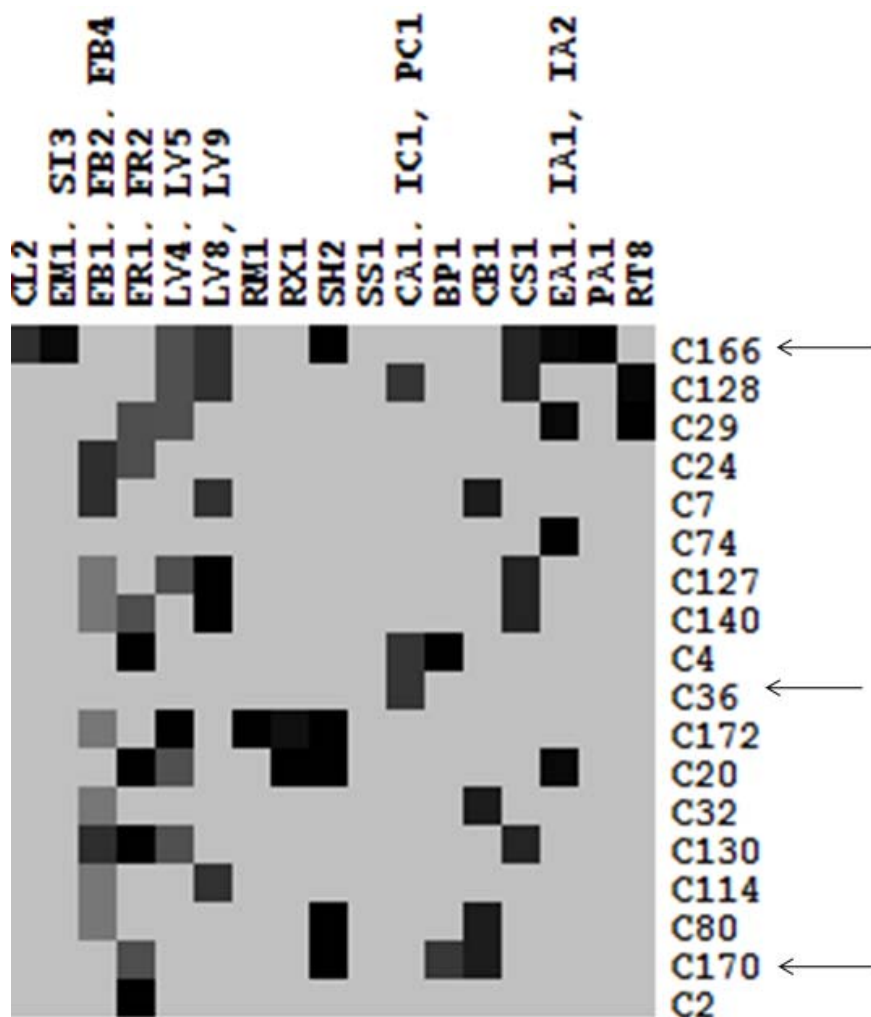


Figura 3 Northern eletrônico representando níveis de expressão dos ESTs-contigs nas bibliotecas de café (Vieira et al., 2006). [quanto mais escuros os tons de cinza, maior a expressão]. **BP1** – Células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil; **CB1** – Células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil e brassinosteroides; **CL2** – Hipocótilos tratados com acilbenzolar-S-metil; **CS1** – Células em suspensão tratadas com NaCl; **EA1, IA1, IA2** – Calo Embriogênico; **EM1, SI3** – Sementes Germinando (sementes inteiras e embriões zigóticos); **FB1, FB2, FB4** – Botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento; **FR1, FR2** – Botões florais + frutos chumbinho no 1º estágio + frutos em diferentes estágio; **FR4** – Fruto (*Coffea racemosa*); **CA1, IC1, PC1** – Calo não embriogênico com e sem 2,4-D; **LV4, LV5** - Folhas jovens de galhos

ortotrópicos; **LV8**, **LV9** – Folhas maduras de galhos plagiotrópicos; **PA1** – Calo embriogênico primário (*Coffea arabica* L.); **RM1** – Folhas infectadas com ferrugem e bicho mineiro; **RT8** – Raiz e células em suspensão na presença de alumínio; **RX1** – Ramos infectados com *Xylella* *ssp.*; **SH2** – Estresse hídrico no campo.

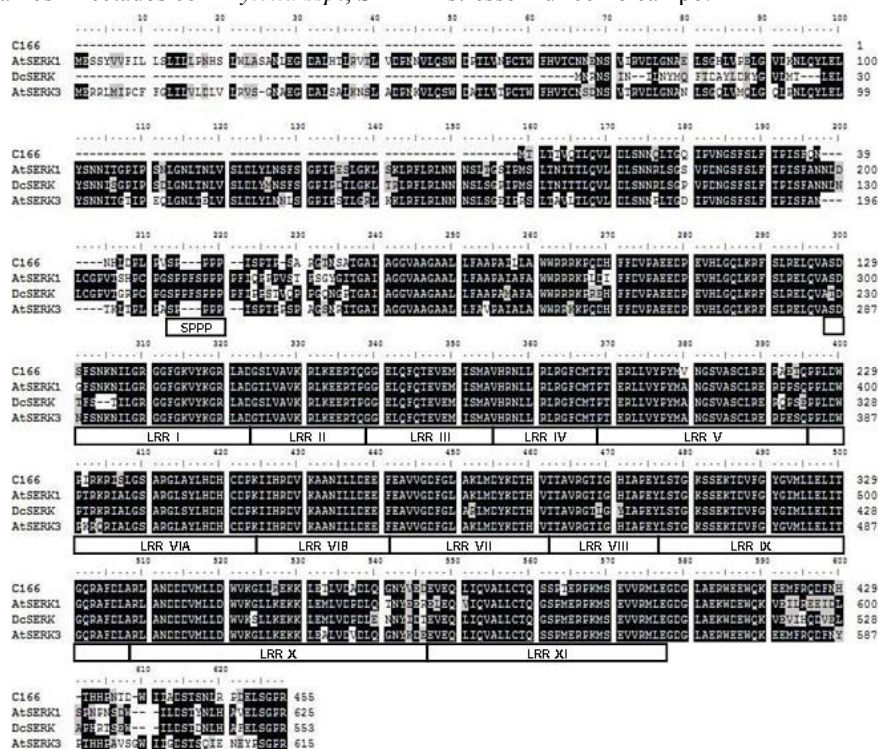


Figura 4 Alinhamento múltiplo das seqüências deduzidas de aminoácidos do C166 com os homólogos *AtSERK* 1, *AtSERK* 3 e *DcSERK* mostrando a alta homologia dos domínios conservados da proteína *SERK* (LRR e SPP). Os resíduos marcados em preto indicam 100% de similaridade.

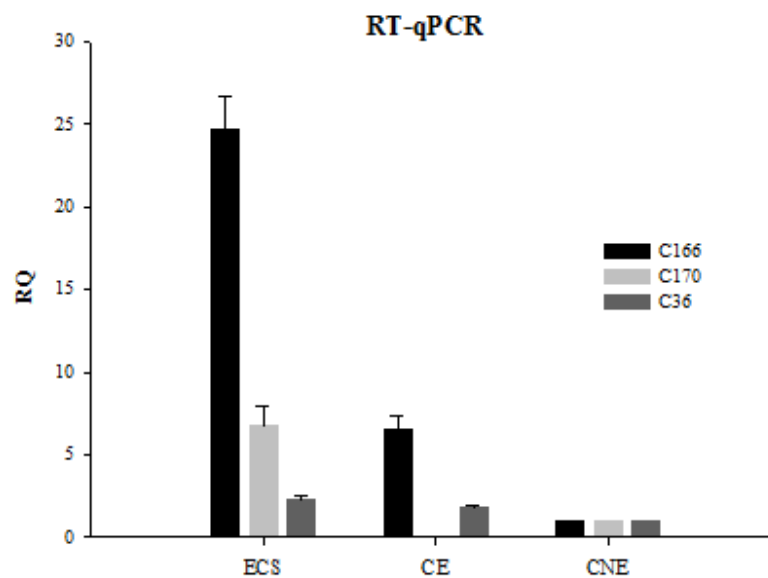


Figura 6 Perfil da expressão quantitativa relativa (**RQ**), obtido por RT-qPCR, dos ESTs-*contigs* (**C36**, **C166** e **C170**) identificados em bibliotecas de cafeeiro (Vieira et al., 2006). As colunas representam a expressão de transcritos gênicos em diferentes materiais embriogênicos (**ECS** – Suspensão de Células Embriogênicas; **CE** – Calos Embriogênicos e **CNE** – Calos Não Embriogênicos) de *C. arabica* cv. Catiguá. (valores de expressão = média de réplicas técnicas; controles endógenos = *ACTIN* e *GAPDH*; amostra de referência = CNE).

REFERÊNCIAS

- Albrecht, C., E. Russinova, B. Kemmerling, M. Kwaaitaal and S.C. de Vries, 2008. Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. *Plant Physiology*, 148(1): 611-619.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman, 1997. Gapped blast and psi-blast: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-3402.
- Barsalobres-Cavallari, C., F. Severino, M. Maluf and I. Maia, 2009. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology*, 10(1): 1.
- Baudino, S., S. Hansen, R. Brettschneider, V.F.G. Hecht, T. Dresselhaus, H. Lörz, C. Dumas and P.M. Rogowsky, 2001. Molecular characterisation of two novel maize lrr receptor-like kinases, which belong to the *serk* gene family. *Planta*, 213(1): 1-10.
- Becraft, P.W., 1998. Receptor kinases in plant development. *Trends in Plant Science*, 3(10): 384-388.
- Becraft, P.W., 2002. Receptor kinase signaling in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1): 163-192.
- Bieysse, D., A. Gofflot and N. Michaux-Ferrière, 1993. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Canadian Journal of Botany*, 71: 1496-1502.
- de Oliveira Santos, M., E. Romano, K.S.C. Yotoko, M.L.P. Tinoco, B.B.A. Dias and F.J.L. Aragão, 2005. Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (serk)* gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Science*, 168(3): 723-729.
- Diévert, A. and S.E. Clark, 2004. Lrr-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, 131(2): 251-261.
- Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown and D. Botstein, 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25): 14863-14868.
- Georget, F., R. Domergue, N. Ferrière and F.X. Côte, 2000. Morphohistological study of the different constituents of a banana (*musa aaa*, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports*, 19(8): 748-754.

- Guerra, M.P., A.C. Torres and J.B. Teixeira, 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Culturas de tecidos e transformação genética de plantas., A. C. Torres, L. S. Caldas and J. A. Buso (Eds.) Embrapa-CBAB, Brasília: pp: 533-568.
- Hanks, S., A. Quinn and T. Hunter, 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241(4861): 42-52.
- Hecht, V., J.-P. Vielle-Calzada, M.V. Hartog, E.D.L. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus and S.C. de Vries, 2001. The arabidopsis *somatic embryogenesis receptor kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127(3): 803-816.
- Huang, X., X.-Y. Lu, J.-T. Zhao, J.-K. Chen, X.-M. Dai, W. Xiao, Y.-P. Chen, Y.-F. Chen and X.-L. Huang, 2010. *Maserk1* gene expression associated with somatic embryogenic competence and disease resistance response in banana (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 28(2): 309-316.
- Ikeda, Y., H. Banno, Q.-W. Niu, S.H. Howell and N.-H. Chua, 2006. The enhancer of shoot regeneration 2 gene in arabidopsis regulates cup-shaped cotyledon 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant and Cell Physiology*, 47(11): 1443-1456.
- Ito, Y., K. Takaya and N. Kurata, 2005. Expression of serk family receptor-like protein kinase genes in rice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1730(3): 253-258.
- Karlova, R., S. Boeren, E. Russinova, J. Aker, J. Vervoort and S. de Vries, 2006. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *The Plant Cell Online*, 18(3): 626-638.
- Karlova, R., S. Boeren, W. van Dongen, M. Kwaaitaal, J. Aker, J. Vervoort and S. de Vries, 2009. Identification of in vitro phosphorylation sites in the arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor-like kinases. *Proteomics*, 9(2): 368-379.
- Kobe, B. and J. Deisenhofer, 1994. The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(10): 415-421.
- Namasivayam, P., 2007. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(1): 1-8.

- Nolan, K.E., R.R. Irwanto and R.J. Rose, 2003. Auxin up-regulates *mtserk1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology*, 133(1): 218-230.
- Quiroz-Figueroa, F., R. Rojas-Herrera, R. Galaz-Avalos and V. Loyola-Vargas, 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3): 285-301.
- Ramakers, C., J.M. Ruijter, R.H.L. Deprez and A.F.M. Moorman, 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (pcr) data. *Neuroscience Letters*, 339(1): 62-66.
- Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425.
- Santa-Catarina, C., L.R. Hanai, M.C. Dornelas, A.M. Viana and E.I.S. Floh, 2004. *Serk* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* mez. (lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79(1): 53-61.
- Schellenbaum, P., V. Mohler, G. Wenzel and B. Walter, 2008. Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, 8(1): 78.
- Schmidt, E.D., F. Guzzo, M.A. Toonen and S.C. de Vries, 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124(10): 2049-2062.
- Sharma, S., S. Millam, I. Hein and G. Bryan, 2008. Cloning and molecular characterisation of a potato *serk* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta*, 228(2): 319-330.
- Shimada, T., T. Endo, H. Fujii and M. Omura, 2005. Isolation and characterization of a new *d*-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* marc. *Scientia Horticulturae*, 105(4): 507-512.
- Shiu, S.-H. and A.B. Bleecker, 2001. Receptor-like kinases from arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19): 10763-10768.

- Singla, B., J. Khurana and P. Khurana, 2008. Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*, 27(5): 833-843.
- Sitnikova, T., A. Rzhetsky and M. Nei, 1995. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 12(2): 319-333.
- Somleva, M.N., E.D.L. Schmidt and S.C. de Vries, 2000. Embryogenic cells in *dactylis glomerata* L. (poaceae) explants identified by cell tracking and by *serk* expression. *Plant Cell Reports*, 19(7): 718-726.
- Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant and F. Côte, 2003. Banana and plantain embryogenic cell suspensions. In: *The International Network for the Improvement of Banana and Plantain - INIBAP*, A. Vézina and C. Picq (Eds.) Technical Guidelines, 8, Montpellier, France.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar, 2007. Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596-1599.
- Teixeira, J.B., C.S. Junqueira, A.J.d.C. Pereira, R.I.S. Mello, A.P.D. Silva and D.A. Mundim, 2004. Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. *EMBRAPA Documentos*, 121: 39.
- Thomas, C. and V. Jiménez, 2006. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: Molecular aspects. In: *Somatic embryogenesis*, A. Mujib and J. Šamaj (Eds.) Springer Berlin / Heidelberg: pp: 157-175.
- Thomas, C., D. Meyer, C. Himber and A. Steinmetz, 2004. Spatial expression of a sunflower *serk* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(1): 35-42.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson, 1994. Clustal w: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680.
- Vasil, I.K., 1988. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Nat Biotech*, 6(4): 397-402.
- Vieira, L.G.E., A.C. Andrade, C.A. Colombo, A.H.d.A. Moraes, Â. Metha, A.C.d. Oliveira, C.A. Labate, C.L. Marino, C.d.B. Monteiro-Vitorello, D.d.C. Monte, É. Giglioti, E.T. Kimura, E. Romano, E.E. Kuramae, E.G.M. Lemos, E.R.P.d. Almeida, É.C. Jorge, É.V.S. Albuquerque, F.R.d. Silva, F. Vinecky, H.E. Sawazaki, H.F.A. Dorry, H. Carrer, I.N. Abreu, J.A.N. Batista, J.B. Teixeira, J.P. Kitajima, K.G. Xavier, L.M.d.

- Lima, L.E.A.d. Camargo, L.F.P. Pereira, L.L. Coutinho, M.V.F. Lemos, M.R. Romano, M.A. Machado, M.M.d.C. Costa, M.F.G.d. Sá, M.H.S. Goldman, M.I.T. Ferro, M.L.P. Tinoco, M.C. Oliveira, M.-A. Van Sluys, M.M. Shimizu, M.P. Maluf, M.T.S.d. Eira, O. Guerreiro Filho, P. Arruda, P. Mazzafera, P.D.S.C. Mariani, R.L.B.C.d. Oliveira, R. Harakava, S.F. Balbao, S.M. Tsai, S.M.Z.d. Mauro, S.N. Santos, W.J. Siqueira, G.G.L. Costa, E.F. Formighieri, M.F. Carazzolle and G.A.G. Pereira, 2006. Brazilian coffee genome project: An est-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 95-108.
- von Arnold, S., 2008. Somatic embryogenesis. In: *Plant propagation by tissue culture* E. F. George, M. A. Hall and G.-J. D. Klerk (Eds.) Springer; Dordrecht, Netherlands: pp: 335-355.
- von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok and L. Filonova, 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3): 233-249.
- Walker, J.C., 1994. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 26(5): 1599-1609.

ARTIGO 2
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA *PLANT SCIENCE*
(VERSÃO PRELIMINAR)

ANÁLISE *IN SILICO* E EXPRESSÃO QUANTITATIVA *IN VITRO* DE UM POSSÍVEL ORTÓLOGO DE *BBM* EM CALOS EMBRIOGÊNICOS E SUSPENSÃO DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Coffea arabica* L. (*CaBBM*)

Anderson Tadeu Silva¹; Luciano Vilela Paiva^{1,2*}; Douglas Barduche¹; Kalynka Gabriella do Livramento¹

¹ Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil; ² Departamento de Química, UFLA, Brasil.

* **Autor correspondente:** luciano@dqi.ufla.br; fax: +55-35-3829-1624

RESUMO

A aquisição de suspensões de células embriogênicas [ECS (*Embryogenic Cell Suspension*)] tem sido um dos principais objetivos para maximizar a propagação clonal do cafeeiro. Porém, o desenvolvimento de protocolos é um processo quase empírico, pois os requerimentos de indução à embriogênese somática são genótipo dependentes. Análises histológicas das características diferenciadoras entre células somáticas e embriogênicas podem ser usadas para aumentar a eficiência metodológica, no entanto, não permitem identificar os eventos moleculares indutores da diferenciação da morfologia celular somática para a embriogênica. Portanto, o estudo e obtenção de marcadores moleculares ligados aos eventos de transição dessas características passam a ser extrema utilidade. Um desses marcadores é o gene *BBM* (*Baby Boom*), que é relacionado ao processo embriogênico e à proliferação celular. Nesse contexto, inicialmente foi realizada uma busca de sequências homólogas ao *BBM* no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), a partir de sequências candidatas obtidas no banco de ESTs (*Expression Sequences Tags*), gerado pelo Projeto Genoma Café Brasileiro. Dessa busca foram obtidos nove ESTs-*contigs*

que apresentaram um ou dois domínios AP2/ERF completos, presentes na sequência do *BBM*. A expressão *in vitro* de dois ESTs-*contigs* (C2 e C9), que mostraram expressão *in silico* em bibliotecas de calos embriogênicos e de suspensão celular do cafeeiro, foi quantificada via RT-qPCR em calos embriogênicos (CE), calos não embriogênicos (CNE) e suspensões celulares embriogênicas (ECS) de *Coffea arabica* cv. Catiguá. O ESTs-*contig* 9, que apresentou dois domínios AP2/ERF e alta similaridade com os homólogos *AtBBM*, *ANT* de *Arabidopsis thaliana*, *GmBBM1* de *Glycine max* e *MtBBM* de *Medicago truncatula*, foi expresso *in vitro* aproximadamente 2 vezes mais em ECS do que em CE e não foi expresso em CNE. O ESTs-*contig* 2, que apresentou um domínio AP2/ERF, foi expresso de modo basal em CNE e aproximadamente 66 e 311 vezes menos que C9 em ECS e CE, respectivamente. Esses dados sugerem que C9 seja o possível ortólogo de *BBM* em *C. arabica* (*CaBBM*) e indicam que o uso dele como marcador molecular pode aumentar ainda mais a eficiência metodológica durante a obtenção de materiais embriogênicos de cafeeiro.

Análise *in silico* e expressão quantitativa *in vitro* de um possível ortólogo de *BBM* em calos embriogênicos e suspensão de células embriogênicas de *Coffea arabica* L. (*CaBBM*)

INTRODUÇÃO

A embriogênese somática – formação do embrião a partir de células somáticas, é um mecanismo de reprodução assexuada natural em algumas espécies vegetais, mas que pode ser induzido *in vitro* de modo generalizado. Porém, as condições experimentais que induzem as células somáticas a adquirirem o potencial embriogênico são específicas ao genótipo, tecido e fase de desenvolvimento da planta da qual se obtém o explante, o que torna praticamente empírica a obtenção dos protocolos [1-4].

Células com potencial embriogênico se caracterizam por serem pequenas, isodiamétricas, possuem núcleo grande, nucléolo evidente, citoplasma denso, microvacúolos e ricas em amiloplastos [4-6], assemelhando-se às células meristemáticas [7]. De fato, em agrupamentos de células embriogênicas, contidos em suspensões celulares de banana, as células que estão formando o embrião (embriônicas) têm poucos amiloplastos, mas são circundadas pelas embriogênicas [5], de modo que se estabelece uma relação entre fonte e dreno dentro do agrupamento. Esses dados foram usados para classificar e avaliar a qualidade de ECS em banana, mas, obviamente, não permitem detectar os eventos moleculares que induzem à diferenciação morfológica associada ao potencial embriogênico, o que poderia ser fator ainda mais fundamental de eficiência.

De modo geral, o processo embriogênico é iniciado por auxinas ou citocininas, que promovem a proliferação de células indiferenciadas. Num segundo momento, auxinas devem ser retiradas para que ocorra a indução à

embriogênese e conseqüente desenvolvimento da protoderme para que as células embrionárias possam se dividir periclinalmente, resultando na invaginação tecidual e estabelecimento do eixo embrionário [8, 9]. Nesse processo, diferentes conjuntos de genes são expressos de modo coordenado para conduzir as mudanças do crescimento vegetativo para o desenvolvimento embriogênico. A expressão diferencial ou a superexpressão desses genes relacionam-se a um aumento da capacidade embriogênica pela célula somática. Esses genes possivelmente são regulados pelo gene *Baby Boom (BBM)* [10, 11].

O gene *BBM* codifica um fator de transcrição (denominado AP2/ERF), específico de plantas, que é relacionado ao processo embriogênico e à proliferação celular em regiões meristemáticas. Quando superexpresso em *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* [10] e *Glycine max* [12], induz à formação espontânea (sem adição de reguladores) de calos embriogênicos e de embriões somáticos. O *ANT* (membro da família *BBM*), produz o mesmo efeito quando superexpresso em *Arabidopsis* e, quando suprimido, provoca a redução do número de células dos calos [13, 14].

As proteínas AP2/ERF são assim denominadas por conterem o domínio AP2/ERF de ligação ao DNA, que foi identificado pela primeira vez em *APETALA2 (AP2)* e em *ERF (Ethylene-Responsive Factors)* [15-18]. Proteínas AP2/ERF são divididas em duas subfamílias, com base na presença de um (subfamília *ERF*) ou de dois domínios de ligação AP2/ERF (subfamília *AP2*) [19]. Proteínas do *BBM* pertencem à subfamília *AP2*, cujos membros incluem *APETALA2 - AP2* [15], *Indeterminate spikelet1- Ids1* [20], *AINTEGUMENTA - ANT* [13, 14], *Glossy15 - Gli5* [21] e *ZMMHCF1* [22]. Enquanto membros da subfamília *AP2* estão relacionados a processos embriogênicos, os membros da subfamília *ERF* se relacionam, em geral, a processos de estresses bióticos e abióticos [19, 23-25].

Neste trabalho, possíveis homólogos do *BBM* foram identificados *in silico* e quantitativamente expressos (RT-qPCR) em materiais histologicamente qualificados como calos embriogênicos, calos não embriogênicos e suspensão de células embriogênicas de *C. arabica* cv. Catiguá com o objetivo de avaliar o uso do *BBM* como marcador molecular da aquisição embriogênica de cultivos *in vitro* de cafeeiro durante o desenvolvimento de protocolos para calos embriogênicos e ECS dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Busca de sequências homólogas ao *BBM*

Sequências candidatas ao gene *BBM* foram obtidas no banco de ESTs (*Expression Sequences Tags*) gerado pelo Projeto Genoma Café Brasileiro [26]. Por meio da interface *Gene Project* desse projeto (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe>), foi possível buscar *reads* e formar *clusters* a partir da consulta com as palavras-chave “*BBM*”, “*Baby Boom*” e do BLAST (*Basic Local Alignment Search*; [27]) das sequências nucleotídicas (BLASTn) e aminoacídicas (tBLASTn) de 4 homólogos do *BBM* (acessos: EF687843.1; AY899909.1; AF317907 e AK065701.1) depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dessa busca foram selecionados 113 *reads* que mostraram alinhamento significativo ($e\text{-value} > 10^{-4}$). Esses *reads* foram agrupados em *clusters*, formando 19 ESTs-*contigs* e 24 *singlets*. As sequências aminoacídicas desses ESTs-*contigs* foram deduzidas usando a interface ExPASy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) e a integridade do domínio conservado AP2/ERF foi verificada utilizando-se o programa NCBI *Conserved Domain Search*. Sequências com o domínio AP2/ERF completo foram comparadas com as sequências de *BBM* usando o algoritmo BLASTx. Nove ESTs-*contigs*, que apresentaram similaridade, foram agrupados em um dendrograma com

sequências de *BBM* (subfamília AP2) e de membros da subfamília *ERF* e analisados quanto à expressão gênica *in silico*, nas bibliotecas do Projeto Genoma Café Brasileiro.

Dendrograma de similaridade

As sequências dos nove ESTs-*contigs* selecionados foram alinhadas (ClustalW; [28]) e agrupadas (MEGA 4; [29]) usando o modelo de comparação *Neighbor-joining* [30] pelo método de *p distance* e supressão *pair-wise*. A validade do dendrograma quanto à distância dos *clusters* foi dada pelo teste probabilístico de *bootstraps* [31].

Expressão gênica *in silico* – Northern eletrônico

Para análise da expressão gênica *in silico*, as frequências dos *reads* formadores de cada ESTs-*contig* expresso nas bibliotecas foram normalizadas, já que as bibliotecas não possuíam o mesmo tamanho. A normalização consistiu em multiplicar a frequência de cada *read* pela razão entre o número total de *reads* de todas as bibliotecas e o número de *reads* da biblioteca na qual o dado *read* foi expresso. Com os resultados da normalização, uma matriz foi processada usando os programas *Cluster* e *TreeView* [32], na qual se relacionou bibliotecas e *clusters* de ESTs-*contigs*, agrupados por *hierachial clustering*.

Dos resultados *in silico* (dendrograma de similaridade e Northern eletrônico), dois ESTs-*contigs* (C2 e C9), expressos *in silico* especificamente em materiais embriogênicos, foram analisados quantitativamente em materiais vegetais.

Material Vegetal

Calos embriogênicos (CE), calos não embriogênicos (CNE) e Suspensão de Células Embriogênicas (ECS) constituíram os materiais vegetais utilizados para a obtenção de RNA. Esses materiais foram obtidos após o quinto mês de cultivo *in vitro* de explantes foliares de *C. arabica* cv. Catiguá, de acordo com o protocolo estabelecido [33] e assim foram caracterizados a partir de análises

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

Caracterização histológica

Amostras dos materiais vegetais foram fixadas com FAA₅₀ (10% de formol a 40% + 5% de ácido acético + 50% de etanol, v/v) durante 48h sob temperatura ambiente, desidratadas em série etílica (60 a 100%) e incluídas em resina epoxi (Historesin[®], Leica) de acordo com protocolo do fabricante. Seções com 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotatório manual (Reichert-Jung, 1130), coradas com azul de toluidina a 0,05% e observadas sob microscópio de luz (Zeiss, Axioscope).

Quantificação da expressão gênica

A expressão dos genes candidatos foi quantificada mediante RT-qPCR com *primers* desenhados usando o programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystem) a partir das sequências dos ESTs-*contigs* C2 e C9 selecionados *in silico*. Como controle endógeno, foram usados primers para os genes da *ACTIN* e *GAPDH* de cafeeiro [34]. Para os ensaios, foi extraído RNA total de CE, CNE e ECS em três repetições biológicas usando o *Kit NucleoSpin[®]* (Macherey-Nagel) de acordo com o protocolo do fabricante. A verificação quanto à ausência de DNA foi feita mediante uma PCR com o controle endógeno *ACTIN*. A integridade do RNA extraído e a eliminação do DNA foram avaliadas em gel de agarose a 1,2% e as amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria (*NanoDrop 1000*). O grau de pureza das amostras foi determinado pela razão entre A260/A280 e A260/A230, considerada ideal dentro do intervalo 1,6 a 2,1. As soluções de RNA das repetições foram juntadas em um *pool* de RNA, na concentração final de 100 ng/µL. Em seguida, foram sintetizados cDNAs em reações de transcrição reversa usando o *Kit High-Capacity[®]* (Applied Biosystems) de acordo com protocolo do fabricante. Essas reações foram realizadas com 10 µL do mix de reação do *kit* + 10 µL do *pool* de

RNA [1 µg] durante 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C e 5 min a 85 °C. Com os cDNAs obtidos, foram realizadas amplificações [*ABI PRISM 7500 Real-Time PCR*; software versão 2.0.1 (*Applied Biosystems*)] usando o *SYBR® Green*, de acordo com o protocolo do fabricante. As amplificações ocorreram com, aproximadamente, 10 ng de cDNA + 10 ng de *primer*, durante 5 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e finalizadas durante 15 s a 95 °C. Os dados de expressão, resultantes das amplificações, foram normalizados [$\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{controle endógeno})$] e quantificados relativamente ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$) com base nos Cts (*Cycle Threshold*) da expressão dos controles endógenos (calibrador) [$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$] *ACTIN* e *GAPDH* presentes na mesma reação. A eficiência das reações foi aferida mediante a equação $(1+E) = 10^{(-1/\text{slope})}$ [35]. Todos os pares de *primers* tiveram eficiência maior que 0,86.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Análise da sequências dos possíveis homólogos

Das buscas *in silico* foram obtidos 19 ESTs-*contigs* com similaridade significativa (*e value* $>10^{-4}$) para o *BBM*. Desses, nove apresentaram o domínio AP2/ERF completo e foram expressos em bibliotecas de materiais embriogênicos do cafeeiro [26], sendo que dois deles (C2 e C9) mostraram expressão exclusiva nas bibliotecas de calos embriogênicos e de suspensão celular (Figura 1).

O C2, com 824 pb, é formado por seis ESTs [quatro da biblioteca EA1, IA1, IA2 (calo embriogênico) e dois da biblioteca CB1 (células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil e brassinosteroides)] (Figura 1) e apresentou um único domínio AP2/ERF (Figura 2A), de modo que se agrupou com a subfamília *ERF* (Figura 3); enquanto C9, com 1726 pb, é formado por quatro ESTs [três da biblioteca EA1, IA1, IA2 (calo embriogênico) e um da biblioteca

RT8 (células em suspensão na presença de alumínio)] e apresentou alta homologia com *AtBBM* [10], *GmBBM* [12], *MtBBM* [36] e *ANT* [13, 14] (Figura 4), incluindo os dois domínios AP2/ERF (Figura 2B), de modo que se agrupou com os membros da subfamília *AP2* (Figura 3).

Caracterização histológica

As suspensões celulares foram iniciadas a partir de calos embriogênicos. Esses calos, de coloração amarelo-creme e de estrutura granulosa e friável (Figura 5 A), são tidos como adequados ao estabelecimento de suspensões celulares, pois podem originar embriões somáticos numa frequência elevada em café [33] e banana [5, 37], enquanto que calos não embriogênicos, de estrutura cristalina e aquosa (Figura 5 A), apresentam grande quantidade de células vacuoladas, provavelmente em processo de degeneração (Figura 5). O agrupamento de células embriogênicas, densamente coradas com azul de toluidina (Figura 5), aparentemente representa a fase de proembrióide, que é a primeira etapa na formação de embriões somáticos [38].

Análise da expressão gênica – RT-qPCR

Com base nos dados *in silico*, foram desenhados *primers* para as sequências dos ESTs-*contigs* C2 e C9 para quantificar *in vitro* a expressão dos mesmos em ECS, CE e CNE. Os dados mostram: (i) expressão variável do C2 em todos os materiais, porém, mais expressiva em ECS (Figura 6); (ii) alta expressão do C9, exclusiva de materiais embriogênicos, sendo aproximadamente 2 vezes maior em CE do que em ECS e aproximadamente 66 e 311 vezes maior que C2 em ECS e CE, respectivamente (Figura 7).

O C2 apresentou um domínio AP2/ERF (subfamília *ERF*) (Figura 2 A) e 100% de similaridade com a sequência do AP2/ERF de um cDNA isolado de frutos de *Coffea canephora* [39] (Figura 2). As proteínas da subfamília *ERF* geralmente estão relacionadas a processos de estresse biótico e abiótico [40]. No entanto, o cDNA isolado de *C. canephora* foi agrupado com cDNAs expressos

em suspensão celular de *Solanum tuberosum* (AAC29516), semente de *Fagus sylvatica* (CAD21849) e frutos de *Lycopersicon esculentum* (AAO34703) e de *Prunus armenica* (AAC24587) [39]. Desse agrupamento, os autores discutiram que o cDNA de *C. canephora* está relacionado ao processo de diferenciação celular ou amadurecimento, mas não a processos de defesa da planta.

O C2 foi expresso *in silico* em bibliotecas de calos embriogênicos (4 ESTs) e de bibliotecas de suspensão celular de *Coffea arabica* tratadas com acilbenzolar-S-metil e brassinosteróides (2 ESTs), mas não em bibliotecas de frutos [26] (Figura 1). A via de sinalização celular por brassinosteróides é relacionada à defesa contra patógenos [41]. No entanto, não há uma relação clara entre essa via e a expressão *in vitro* de C2 nos materiais embriogênicos de *C. arabica* cv. Catiguá – materiais em diferentes fases de desenvolvimento (Figura 6). Portanto, é possível que AP2/ERF de cafeeiro, representado pelo ESTs-*contig 2* ou pelo cDNA de *C. canephora*, esteja relacionado com o processo de diferenciação celular e não com o do amadurecimento. Reforçando essa hipótese, *MtSERF1*, de *Medicago truncatula*, membro da superfamília AP2/ERF, é altamente expresso em tecidos embrionários e pouco expresso em calos não embriogênicos [42].

Por outro lado, o C9 parece que está relacionado mais diretamente ao processo embriogênico, pois apresenta (i) duas ligações do domínio AP2/ERF (subfamília AP2) (Figura 2 B), (ii) alta similaridade com os membros dessa subfamília que são relacionados à embriogênese: *AtBBM* [10], *GmBBM* [12], *MtBBM* [36] e *ANT* [13, 14] (Figura 4); e (iii) expressão *in silico* em bibliotecas de calos embriogênicos (EA1, IA1, IA2) e de suspensão celular (RT8) [26] (Figura 1) e *in vitro* em ECS e CE de *C. arabica* cv. Catiguá (Figura 7).

De modo semelhante ao C9, transcritos do *BBM* em *Brassica napus* foram detectados em cultivos embriogênicos e subsequentes embriões somáticos, mas não em cultivos não embriogênicos [10]. No entanto,

considerando que vários genes estejam ativos em materiais embriogênicos [11], não é surpreendente o alto nível de expressão de *C9* em CE, mas é estranho que não tenha sido equivalente em ECS – em ambos os casos, tanto *in silico* (Figura 1) quanto *in vitro* (Figura 7), já que a taxa de proliferação celular em ECS deve ser maior do que em calos e *BBM* é também associado à proliferação celular [11, 12].

Esses dados sugerem que o ESTs-*contig 9* seja o ortólogo do *BBM* em *C. arabica*, denominado *CaBBM* e, portanto, um marcador molecular do processo embriogênico *in vitro* do cafeeiro e um bom parâmetro para avaliar a aquisição da capacidade embriogênica de materiais sob desenvolvimento, auferindo, assim, maior eficiência metodológica para a obtenção de ECS de cafeeiro.

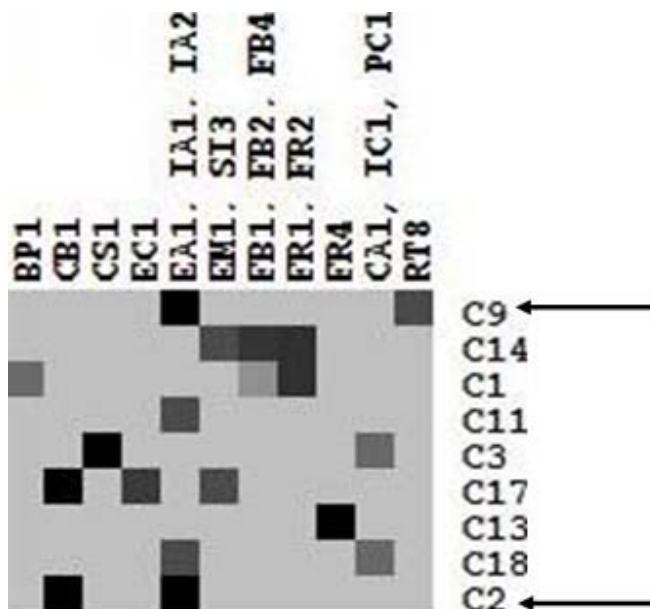


Figura 1. Northern eletrônico representando níveis de expressão dos *EST-contigs* nas bibliotecas de café (Vieira et al., 2006). [quanto mais escuros os tons de cinza, maior a expressão]. **BP1** – Células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil; **CB1** – Células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil e brassinosteroides; **CS1** – Células em suspensão tratadas com NaCl; **EC1** – Calo Embriogênico de *Coffea canephora*; **EA1, IA1, IA2** – Calo Embriogênico; **EM1, SI3** – Sementes Germinando (sementes inteiras e embriões zigóticos); **FB1, FB2, FB4** – Botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento; **FR1, FR2** – Botões florais + frutos chumbinho no 1º estágio + frutos em diferentes estágio; **FR4** – Fruto (*Coffea racemosa*); **CA1, IC1, PC1** – Calo não embriogênico com e sem 2,4-D; **RT8** – Raiz e células em suspensão na presença de alumínio.

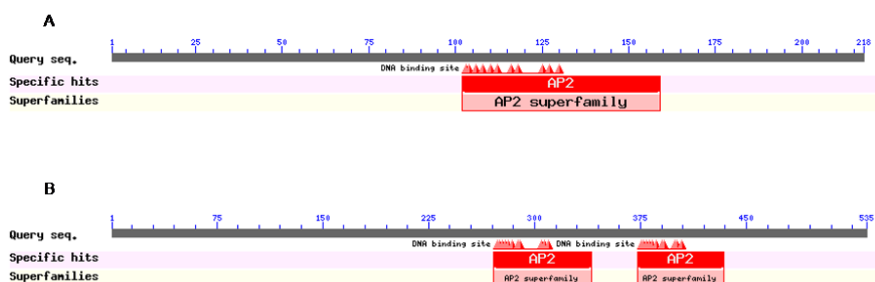


Figura 2 (A) a única ligação do domínio AP2/ERF à sequência do ESTs-*contig 2*, (B) as duas ligações do domínio AP2/ERF à sequência do ESTs-*contig 9*.

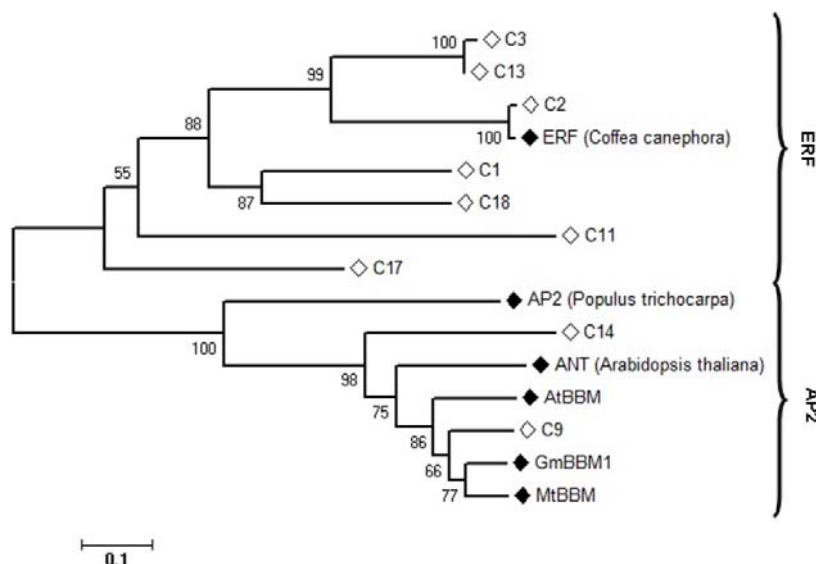


Figura 3 Dendrograma de similaridade entre sequências de aminoácidos candidatas para o *BBM* e as duas subfamílias *ERF* e *AP2*. [(◊) sequências ESTs-*contigs* (Vieira et al., 2006); (◆) sequências NCBI; valores de *bootstrap* menores que 50% foram omitidos].

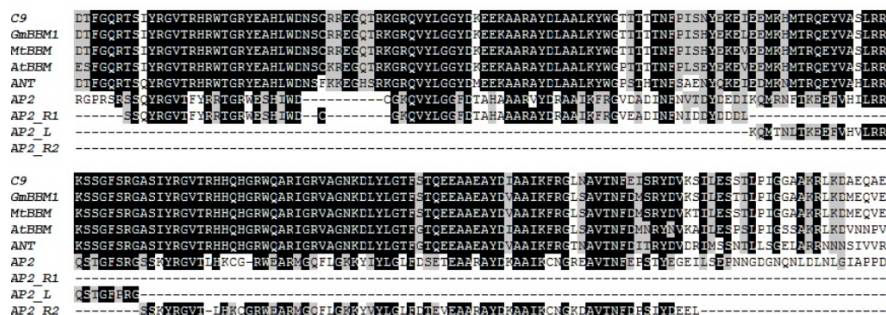


Figura 4 Alinhamento múltiplo das sequências deduzidas de aminoácidos do C9 com os homólogos *GmBBM1*, *MtBBM*, *AtBBM* e *ANT* mostrando a alta homologia com os dois domínios AP2/ERF (AP2_R1 e AP2_R2) e com a ligação entre eles (AP2_L). [resíduos marcados em preto indicam 100% de similaridade].

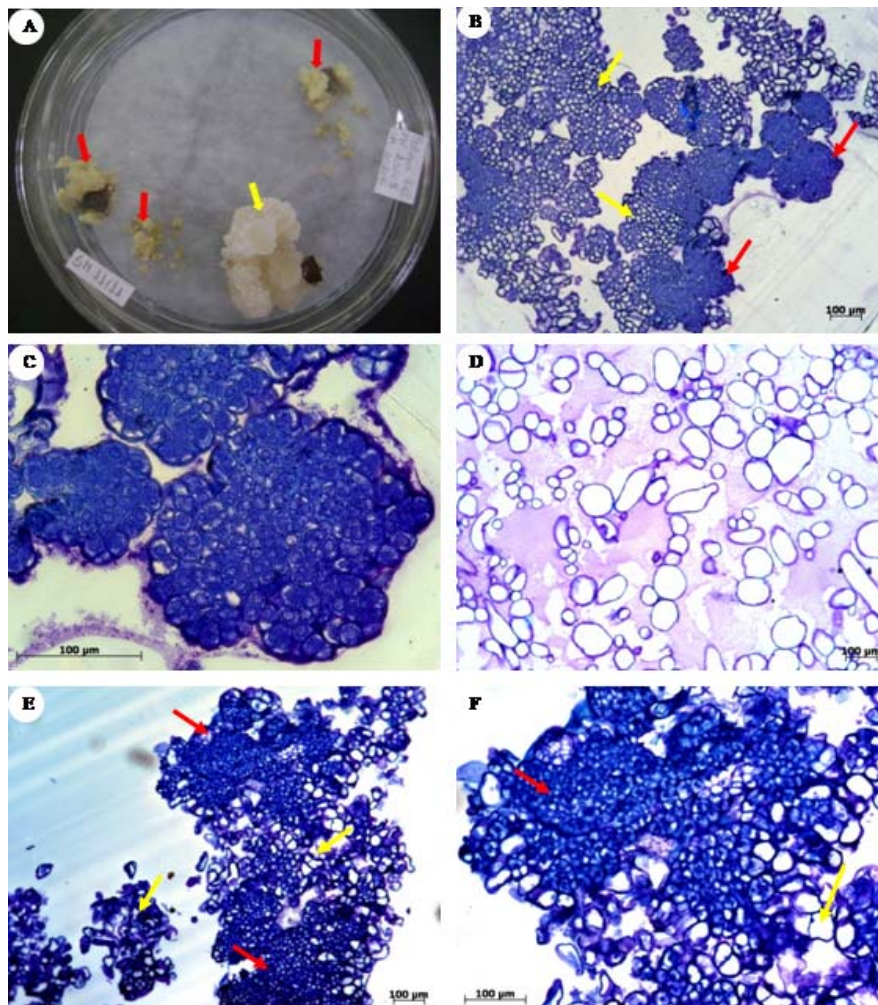


Figura 5 Morfologia de CE, CNE e ECS. [material embriogênico (**setas vermelhas**); material não embriogênico (**setas amarelas**)]. **A**: CE e CNE após 5 meses de cultivo. **B**, **C**, **D**, **E** e **F**: Cortes histológicos de **(B)**, CE heterogêneo mostrando agrupamentos de células embriogênicas (densamente coradas) e não embriogênicas (vacuoladas); **(C)**, detalhe de células embriogênicas em CE mostrando núcleo proeminente e citoplasma denso; **(D)**, detalhe de células vacuoladas em CNE; **(E e F)** ECS heterogênea.

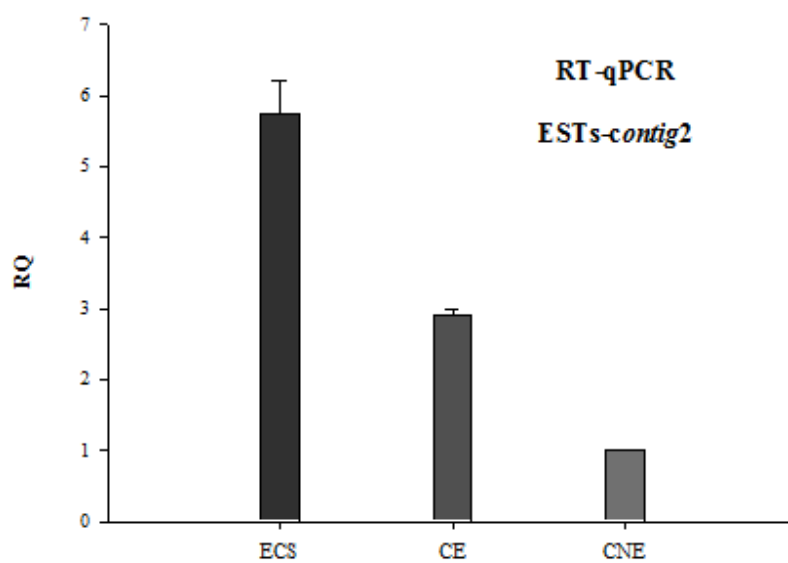


Figura 6 Expressão quantitativa relativa (**RQ**) do ESTs-contig 2 em Suspensão de Células Embriogênicas (**ECS**), Calos Embriogênicos (**CE**) e Calos Não Embriogênicos (**CNE**) de *C. arabica* cv. Catiguá. [valores de expressão = média de três réplicas técnicas; controles endógenos = *ACTIN* e *GAPDH*; amostra de referência = CNE].

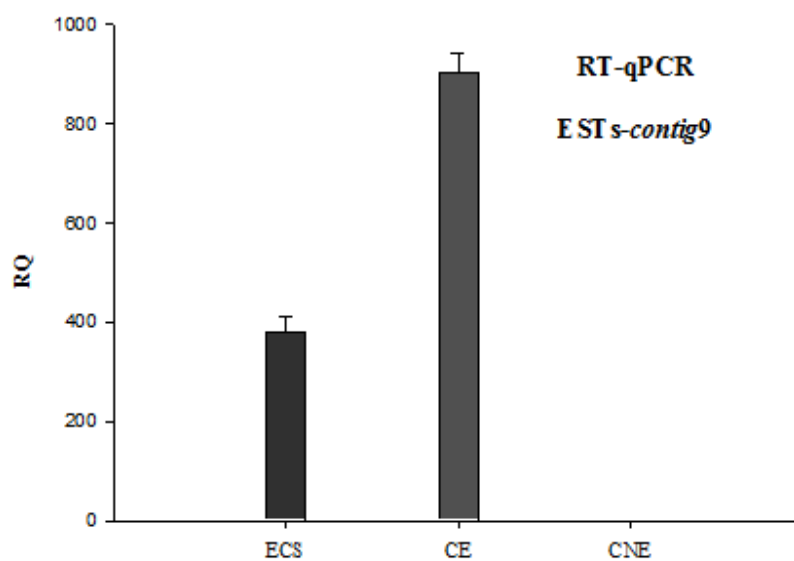


Figura 7 Expressão quantitativa relativa (RQ) do ESTs-contig 9 em Suspensão de Células Embriogênicas (ECS), Calos Embriogênicos (CE) e Calos Não Embriogênicos (CNE) de *C. arabica* cv. Catiguá. [valores de expressão = média de três réplicas técnicas; controles endógenos = *ACTIN* e *GAPDH*; amostra de referência = CNE].

REFERÊNCIAS

- [1] A. Fehér, The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't, *Acta Biologica Szegediensis*, 52 (2008) 53-56.
- [2] A. Fehér, T.P. Pasternak, D. Dudits, Transition of somatic plant cells to an embryogenic state, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74 (2003) 201-228.
- [3] V.M. Jiménez, Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13 (2001) 196-223.
- [4] P. Namasivayam, Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90 (2007) 1-8.
- [5] F. Georget, R. Domergue, N. Ferrière, F.X. Côte, Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa AAA*, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension, *Plant Cell Reports*, 19 (2000) 748-754.
- [6] F. Quiroz-Figueroa, R. Rojas-Herrera, R. Galaz-Avalos, V. Loyola-Vargas, Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86 (2006) 285-301.
- [7] M.P. Guerra, A.C. Torres, J.B. Teixeira, Embriogênese somática e sementes sintéticas., in: A.C. Torres, L.S. Caldas, J.A. Buso (Eds.) *Culturas de tecidos e transformação genética de plantas.*, Embrapa-CBAB, Brasília, 1999, pp. 533-568.
- [8] M.A.J. Toonen, T. Hendriks, E.D.L. Schmidt, H.A. Verhoeven, A. Kammen, S.C. Vries, Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking, *Planta*, 194 (1994) 565-572.
- [9] S. von Arnold, Somatic Embryogenesis, in: E.F. George, M.A. Hall, G.-J.D. Klerk (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture* Springer; Dordrecht, Netherlands, 2008, pp. 335-355.
- [10] K. Boutilier, R. Offringa, V.K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C.-M. Liu, A.A.M. van Lammeren, B.L.A. Miki, J.B.M. Custers, M.M. van Lookeren Campagne, Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth, *The Plant Cell Online*, 14 (2002) 1737-1749.
- [11] P. Passarinho, T. Ketelaar, M. Xing, J. van Arkel, C. Maliepaard, M. Hendriks, R. Joosen, M. Lammers, L. Herdies, B. den Boer, L. van der Geest, K. Boutilier, BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell

proliferation and cell growth pathways, *Plant Molecular Biology*, 68 (2008) 225-237.

[12] S. El Ouakfaoui, J. Schnell, A. Abdeen, A. Colville, H. Labbé, S. Han, B. Baum, S. Laberge, B. Miki, Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors, *Plant Molecular Biology*, 74 (2010) 313-326.

[13] R.C. Elliott, A.S. Betzner, E. Huttner, M.P. Oakes, W. Tucker, D. Gerentes, P. Perez, D.R. Smyth, AINTEGUMENTA, an APETALA2-like Gene of Arabidopsis with Pleiotropic Roles in Ovule Development and Floral Organ Growth, *The Plant Cell Online*, 8 (1996) 155-168.

[14] K.M. Klucher, H. Chow, L. Reiser, R.L. Fischer, The AINTEGUMENTA Gene of Arabidopsis Required for Ovule and Female Gametophyte Development Is Related to the Floral Homeotic Gene APETALA2, *The Plant Cell Online*, 8 (1996) 137-153.

[15] K.D. Jofuku, B. Boer, M.V. Montagu, J.K. Okamoto, Control of Arabidopsis Flower and Seed Development by the Homeotic Gene APETALA2, *The Plant Cell Online*, 6 (1994) 1211-1225.

[16] M. Ohme-Takagi, H. Shinshi, Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact with an Ethylene-Responsive Element, *The Plant Cell Online*, 7 (1995) 173-182.

[17] J.K. Okamoto, B. Caster, R. Villarroel, M. Van Montagu, K.D. Jofuku, The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (1997) 7076-7081.

[18] D. Weigel, The APETALA2 Domain Is Related to a Novel Type of DNA Binding Domain, *The Plant Cell Online*, 7 (1995) 388-389.

[19] J. Zhou, X. Tang, G.B. Martin, The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes, *EMBO J*, 16 (1997) 3207-3218.

[20] G. Chuck, R.B. Meeley, S. Hake, The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene *indeterminate spikelet1*, *Genes & Development*, 12 (1998) 1145-1154.

[21] S.P. Moose, P.H. Sisco, Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity, *Genes & Development*, 10 (1996) 3018-3027.

[22] T.J. Daniell, A.P. Fordham-Skelton, P. Vergani, R. Edwards, Isolation of a maize cDNA (accession n°. Z47554) (PGR 96-013) encoding APETALA-2-like

binding domains by complementation cloning of an l-isoaspartyl methyltransferase-deficient mutant of *Escherichia coli*, *Plant Physiology*, 110 (1996) 1435.

[23] Q. Liu, M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in *Arabidopsis*, *The Plant Cell Online*, 10 (1998) 1391-1406.

[24] F.L.H. Menke, A. Champion, J.W. Kijne, J. Memelink, A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, *ORCA2*, *EMBO J*, 18 (1999) 4455-4463.

[25] E.J. Stockinger, S.J. Gilmour, M.F. Thomashow, *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and \square water \square deficit, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (1997) 1035-1040.

[26] L.G.E. Vieira, A.C. Andrade, C.A. Colombo, A.H.d.A. Moraes, Â. Metha, A.C.d. Oliveira, C.A. Labate, C.L. Marino, C.d.B. Monteiro-Vitorello, D.d.C. Monte, É. Giglioti, E.T. Kimura, E. Romano, E.E. Kuramae, E.G.M. Lemos, E.R.P.d. Almeida, É.C. Jorge, É.V.S. Albuquerque, F.R.d. Silva, F. Vinecky, H.E. Sawazaki, H.F.A. Dorry, H. Carrer, I.N. Abreu, J.A.N. Batista, J.B. Teixeira, J.P. Kitajima, K.G. Xavier, L.M.d. Lima, L.E.A.d. Camargo, L.F.P. Pereira, L.L. Coutinho, M.V.F. Lemos, M.R. Romano, M.A. Machado, M.M.d.C. Costa, M.F.G.d. Sá, M.H.S. Goldman, M.I.T. Ferro, M.L.P. Tinoco, M.C. Oliveira, M.-A. Van Sluys, M.M. Shimizu, M.P. Maluf, M.T.S.d. Eira, O. Guerreiro Filho, P. Arruda, P. Mazzafera, P.D.S.C. Mariani, R.L.B.C.d. Oliveira, R. Harakava, S.F. Balbao, S.M. Tsai, S.M.Z.d. Mauro, S.N. Santos, W.J. Siqueira, G.G.L. Costa, E.F. Formighieri, M.F. Carazzolle, G.A.G. Pereira, Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18 (2006) 95-108.

[27] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25 (1997) 3389-3402.

[28] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 22 (1994) 4673-4680.

- [29] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0, *Molecular Biology and Evolution*, 24 (2007) 1596-1599.
- [30] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4 (1987) 406-425.
- [31] T. Sitnikova, A. Rzhetsky, M. Nei, Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 12 (1995) 319-333.
- [32] M.B. Eisen, P.T. Spellman, P.O. Brown, D. Botstein, Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (1998) 14863-14868.
- [33] J.B. Teixeira, C.S. Junqueira, A.J.d.C. Pereira, R.I.S. Mello, A.P.D. Silva, D.A. Mundim, Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática., *EMBRAPA Documentos*, 121 (2004) 39.
- [34] C. Barsalobres-Cavallari, F. Severino, M. Maluf, I. Maia, Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions, *BMC Molecular Biology*, 10 (2009) 1.
- [35] C. Ramakers, J.M. Ruijter, R.H.L. Deprez, A.F.M. Moorman, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, *Neuroscience Letters*, 339 (2003) 62-66.
- [36] N. Imin, M. Nizamidin, T. Wu, B.G. Rolfe, Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*, *Journal of Experimental Botany*, 58 (2007) 439-451.
- [37] H. Strosse, R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant, F. Côte, Banana and plantain embryogenic cell suspensions, in: A. Vézina, C. Picq (Eds.) *The International Network for the Improvement of Banana and Plantain - INIBAP, Technical Guidelines*, 8, Montpellier, France, 2003.
- [38] D. Bieysse, A. Gofflot, N. Michaux-Ferrière, Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*, *Canadian Journal of Botany*, 71 (1993) 1496-1502.
- [39] J. Bustamante-Porras, M. Noirot, C. Campa, S. Hamon, A.d. Kochko, Isolation and characterization of a *Coffea canephora* ERF-like c-DNA, *African Journal of Biotechnology* 4(2005) 157-159.
- [40] K.L.-C. Wang, H. Li, J.R. Ecker, Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks, *The Plant Cell Online*, 14 (2002) S131-S151.

[41] C. Albrecht, E. Russinova, B. Kemmerling, M. Kwaaitaal, S.C. de Vries, Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE Proteins Serve Brassinosteroid-Dependent and -Independent Signaling Pathways, *Plant Physiology*, 148 (2008) 611-619.

[42] F.R. Mantiri, S. Kurdyukov, D.P. Lohar, N. Sharopova, N.A. Saeed, X.-D. Wang, K.A. VandenBosch, R.J. Rose, The Transcription Factor MtSERF1 of the ERF Subfamily Identified by Transcriptional Profiling Is Required for Somatic Embryogenesis Induced by Auxin Plus Cytokinin in *Medicago truncatula*, *Plant Physiology*, 146 (2008) 1622-1636.

ARTIGO 3
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA *PLANT MOLECULAR BIOLOGY*
(VERSÃO PRELIMINAR)

RELAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA QUANTITATIVA DE *CaSERK* E *CaBBM* COM O CRESCIMENTO DE SUSPENSÕES CELULARES DE *COFFEA ARABICA* L.

Anderson Tadeu Silva¹; Luciano Vilela Paiva^{1,2*}; Douglas Barduche¹; Kalynka Gabriella do Livramento¹

¹ Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil; ² Departamento de Química, UFLA, Brasil.

* **Autor correspondente:** luciano@dqi.ufla.br; fax: +55-35-3829-1624

RESUMO

A obtenção de suspensões de células embriogênicas (ECS – *Embryogenic Cell Suspension*) tem grande valor biotecnológico, devido à maior eficiência das ECS como material vegetal para transformação genética, produção em larga escala ou criopreservação de germoplasma. No entanto, a metodologia para obtenção de ECS é quase empírica, devido aos protocolos experimentais serem genótipo-dependentes. Desse modo, o estudo e a obtenção de marcadores moleculares ligados aos eventos de aquisição da capacidade embriogênica de suspensões celulares passam a ser de extrema utilidade. Genes como o *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*) e o *BBM* (*Baby Boom*) têm sido caracterizados como marcadores do processo embriogênico. A expressão quantitativa de homólogos desses genes em *C. arabica* (*CaSERK* e *CaBBM*) foi relacionada ao crescimento de ECS de *C. arabica* cv Catiguá cultivadas durante 60 dias. Os resultados mostram que a expressão de *CaBBM* e de *CaSERK* foi crescente até os 20 e 30 dias, respectivamente, coincidindo com o crescimento exponencial e início da estabilização do crescimento das ECS. A expressão de *CaBBM* foi maior que a de *CaSERK*, durante os primeiros 20 dias. Aos 30 e 40 dias, coincidindo com a estabilização do cultivo, a expressão de *CaSERK*

alcançou valores máximos, enquanto que a de *CaBBM* caiu para níveis basais. Dos 40 dias em diante, o crescimento manteve-se constante, porém, numa taxa cada vez menor, provavelmente devido às condições experimentais (renovação parcial do volume do meio nutritivo). A expressão de ambos os genes declinaram com a taxa, mas tendeu a se recuperar aos 50-60 dias. Esses dados indicam uma relação transiente de indução e retroinibição entre *CaBBM* e *CaSERK*, na qual a expressão diametralmente opostas entre eles coincide com a estabilização da taxa de crescimento das ECS, sugerindo que essa relação possa ser usada como parâmetro bastante prático na avaliação de suspensões celulares sob desenvolvimento.

Palavras-chave: *SERK*, *BBM*, embriogênese somática, biotecnologia, cafeeiro.

Relações da expressão gênica quantitativa de *CaSERK* e *CaBBM* com o crescimento de suspensões celulares de *Coffea arabica* L.

INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos principais objetivos nos estudos sobre a embriogênese somática, voltados para fins biotecnológicos, é a obtenção de suspensão de células embriogênicas (ECS – *Embryogenic Cell Suspension*), pois ECS são mais eficientes na propagação *in vitro* em grande escala e em eventos de transformação genética, bem como são ideais para a criopreservação de germoplasma. Porém, os protocolos experimentais para indução à embriogênese somática e obtenção de ECS são desenvolvidos de modo quase empírico, pois os resultados são dependentes do genótipo, tecido e fase de desenvolvimento da planta matriz.

Na propagação *in vitro* e/ou na obtenção de ECS de cafeeiro o contexto não é diferente. Apesar de avanços no estabelecimento de materiais embriogênicos, o método ainda é limitado pela baixa frequência na indução de calos e posterior regeneração de embriões somáticos (Teixeira et al. 2004).

Por outro lado, células com potencial embriogênico possuem características morfológicas que as distinguem facilmente de células não embriogênicas, de modo que análises histológicas podem ser usadas para aumentar a eficiência metodológica (Georget et al. 2000). No entanto, obviamente essas análises não permitem identificar os eventos moleculares indutores que resultam na diferenciação celular associada à competência embriogênica. Portanto, o desenvolvimento de metodologias eficientes de propagação *in vitro* passa pela identificação e caracterização de genes relacionados ao processo embriogênico, pois a expressão gênica diferencial é

fundamental para o entendimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos em qualquer processo celular.

Um sistema viável de marcadores moleculares para a competência embriogênica reside em alguns genes já identificados e relacionados a esse processo. Genes como o *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*) e *BBM* (*Baby Boom*) têm sido caracterizados como marcadores da transição entre a fase somática para a embriogênica.

O *SERK* codifica um receptor transmembranar LRR-kinase, específico de plantas, que é associado aos eventos da transdução de sinais (Becraft 1998; Hecht et al. 2001; Becraft 2002; Albrecht et al. 2008). Essa associação possivelmente o relaciona com a intensa atividade mitótica em regiões de crescimento (Thomas et al. 2004) e com a função das auxinas nos meios de cultivo *in vitro*, pois, o padrão temporal de expressão do *SERK* coincide, de modo geral, com o requerimento de auxinas para a multiplicação celular indiferenciada na fase de indução de calos (Nolan et al. 2003; Sharma et al. 2008; Singla et al. 2008) e com o requerimento da ausência do regulador para que ocorra o espessamento das paredes celulares (Vasil 1988). Provavelmente, esse espessamento é fator de formação da ectoderme do pró-embrião. A ectoderme gera uma constricção na massa celular do pró-embrião que é necessária ao estabelecimento das divisões celulares periclinais, diretoras da organização morfológica do embrião (von Arnold 2008). Isso explica o fato de *SERK* ser expresso até a fase globular dos embriões: sua função vai cessando na medida em que a função da ectoderme ganha preponderância.

O *SERK* foi isolado pela primeira vez em cultivos embriogênicos de cenoura – *DcSERK*, de *Dacus carota* (Schmidt et al. 1997). Desde então, homólogos foram identificados em várias espécies (Somleva et al. 2000; Baudino et al. 2001; Hecht et al. 2001; Nolan et al. 2003; Santa-Catarina et al. 2004; Thomas et al. 2004; de Oliveira Santos et al., 2005; Shimada et al. 2005;

Péres-Núñez et al. 2008; Schellenbaum et al. 2008; Huang et al. 2010). Esses trabalhos caracterizaram *SERK* como marcador da embriogênese, devido sua expressão transiente desde a indução de massas pró-embriogênicas até o estágio globular de embriões.

O *BBM* codifica um fator de transcrição (denominado AP2/ERF), específico de plantas, que regula vários genes relacionados ao processo embriogênico e à proliferação celular em regiões meristemáticas (Passarinho et al. 2008). Quando superexpresso em *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (Boutilier et al. 2002) e *Glycine max* (El Ouakfaoui et al. 2010), induz à formação espontânea (sem adição de reguladores) de calos embriogênicos e de embriões somáticos. *AINTEGUMENTA*, um membro da família do *BBM*, produz o mesmo efeito quando superexpresso em *Arabidopsis* e, quando suprimido, provoca a redução do número de células dos calos (Elliott et al. 1996; Klucher et al. 1996). Em *Coffea arabica*, um ESTs-*contig* homólogo ao *BBM* foi expresso *in silico* e *in vitro* em materiais embriogênicos de cafeeiro (dados não publicados).

As proteínas AP2/ERF são assim denominadas por conterem o domínio de ligação gênico *AP2/ERF*, que foi identificado pela primeira vez em *AP2* (*APETALA2*) e em *ERF* (*Ethylene-Responsive Factors*) (Jofuku et al. 1994; Ohme-Takagi e Shinshi 1995; Weigel 1995; Okamura et al. 1997). Proteínas AP2/ERF são divididas em duas subfamílias, com base na presença de um (subfamília ERF) ou de dois domínios de ligação *AP2/ERF* (subfamília AP2) (Zhou et al. 1997). Proteínas do *BBM* pertencem à subfamília AP2, cujos membros incluem *APETALA2* (*AP2*; Jofuku et al. 1994), *Indeterminate spikelet1* (*Ids1*; Chuck et al. 1998), *AINTEGUMENTA* (*ANT*; Elliot et al. 1996; Klucher et al. 1996), *Glossy15* (*Gli5*; Moose e Sisco 1996) e *ZMMHCF1* (Daniell et al. 1996). Enquanto os membros de AP2 estão relacionados a processos embriogênicos, os membros de ERF se relacionam, geralmente, a respostas

contra estresses bióticos e abióticos (Stockinger et al. 1997; Zhou et al. 1997; Liu et al. 1998; Menke et al. 1999).

Recentemente, possíveis homólogos de *SERK* e *BBM* foram identificados em materiais embriogênicos de *Coffea arabica* – *CaSERK* e *CaBBM* (dados não publicados). No atual trabalho, esses homólogos foram relacionados ao crescimento de suspensões de células embriogênicas (ECS) de *C. arabica* cv. Catiguá.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Suspensão de Células Embriogênicas (ECS) de *Coffea arabica* cv Catiguá foram obtidas de acordo com protocolo de Teixeira et al. (2004) e assim foram caracterizadas a partir de análises morfológicas e histológicas (dados não publicados). ECS foram iniciadas usando como inóculo tecido de calos embriogênicos numa densidade de 16 g/L de meio nutritivo líquido MM (Teixeira et al. 2004). Os cultivos foram mantidos em volume de 6 mL sob rotação (100 rpm), 26 °C e escuro. Após 15 dias para estabilização do inóculo, coletas a cada 10 dias foram realizadas durante 60 dias. Em cada coleta, 1/6 do volume do meio MM foi renovado e amostras foram coletadas para extrair RNA e para estabelecer uma curva de crescimento, de acordo com o volume de células sedimentadas (SCV – *Sedimented Cell Volume*) (Strosse et al. 2003). Dessa curva, foram obtidos dados de crescimento (CR) e taxa porcentual de crescimento (TCR) entre coletas subsequentes.

Quantificação da expressão gênica

A expressão gênica de *CaSERK* e *CaBBM* foi quantificada mediante RT-qPCR. Os *primers* foram desenhados no programa *Primer Express 3.0* (*Applied Biosystem*). Como controle endógeno, foram usados os *primers* para *ACTIN* e *GAPDH* de cafeeiro (Barsalobres-Cavallari et al. 2009). Para os ensaios, foi

extraído RNA total de calos embriogênicos (tempo 0), usados como amostra de referência (RQ=1) e de ECS (10 a 60 dias) em três repetições biológicas usando o *Kit NucleoSpin®* (Macherey-Nagel) de acordo com o protocolo do fabricante. A verificação da ausência de DNA foi feita mediante PCR com o controle endógeno *ACTIN*. A integridade do RNA extraído e a eliminação do DNA foram avaliadas em gel de agarose a 1,2% e as amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria (*NanoDrop 1000*). O grau de pureza das amostras foi determinado pela razão entre A260/A280 e A260/A230, considerada ideal dentro do intervalo entre 1,6 e 2,1. As soluções de RNA das repetições foram juntadas em um *pool* de RNA na concentração final de 50 ng/μL. Em seguida, foram sintetizados cDNAs em reações de transcrição reversa usando o *Kit High-Capacity®* (*Applied Biosystems*) de acordo com protocolo do fabricante. Essas reações foram realizadas com 10 μL do mix de reação do *kit* + 10 μL do *pool* de RNA [500 ng] durante 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C e 5 min a 85 °C. Com os cDNAs obtidos, foram realizadas amplificações [ABI PRISM 7500 *Real-Time* PCR; *software* versão 2.0.1 (*Applied Biosystems*)] usando o sistema *SYBR® Green*, de acordo com o protocolo do fabricante. As amplificações ocorreram com, aproximadamente, 10 ng de cDNA + 10 ng de *primer* durante 5 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e finalizadas durante 15 s a 95 °C. Os dados de expressão, resultantes das amplificações, foram normalizados [$\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{controle endógeno})$] e quantificados relativamente ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$) com base nos CTs (*Cycle Threshold*) da expressão dos controles endógenos (calibrador) [$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$] *ACTIN* e *GAPDH* presentes na mesma reação. A eficiência das reações foi aferida mediante a equação $(1+E) = 10^{(-1/\text{slope})}$ (Ramakers et al. 2003). Todos os pares de *primers* tiveram eficiência maior que 0,86.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão quantitativa de genes marcadores do processo embriogênico pode ser um fator-chave para o aumento de eficiência metodológica durante o desenvolvimento de protocolos para a obtenção de ECS com objetivos biotecnológicos. Neste trabalho, a expressão quantitativa de *CaSERK* e *CaBBM* (dados não mostrados) foi relacionada com uma curva de crescimento de ECS de *C. arabica* cv Catiguá. *SERK* codifica um receptor de membrana kinase-símile específico de plantas cuja função é associada à percepção de moléculas sinalizadoras que desencadeiam o processo embriogênico em células somáticas ou zigóticas (Schmidt et al. 1997; Ikeda et al. 2006). Um dos processos associados ao *SERK* é a intensa atividade mitótica em regiões de crescimento (Thomas et al. 2004). O *SERK* foi identificado pela primeira vez em suspensões celulares de cenoura (Schmidt et al. 1997) e, desde então, tem sido expresso em materiais embriogênicos de várias espécies (Somleva et al. 2000; Hetch et al. 2001; Thomas et al. 2004; Nolan et al. 2003; Santa-Catarina et al. 2004; de Oliveira Santos et al. 2005; Shimada et al. 2005; Huang et al. 2010). O *BBM* codifica um fator de transcrição que regula vários genes expressos durante a embriogênese (Passarinho et al. 2008) e se associa à proliferação e organização celulares em regiões de crescimento (Elliott et al. 1996; Klucher et al. 1996; Boutilier et al. 2002).

Relação entre a expressão gênica de *CaSERK* e *CaBBM* com a curva de crescimento de ECS.

As ECS tiveram crescimento (CR) constante durante os 60 dias, numa taxa porcentual (TCR) crescente até os 30 dias, que se estabilizou entre 30 e 40 dias; começou a diminuir até os 50 dias e diminuiu bruscamente após os 50 dias (Figura 1). Essa curva de crescimento indica que, a partir dos 30-40 dias, a

renovação de 1/6 do volume do meio nutritivo não foi suficiente para suprir a crescente necessidade nutricional dada pelo CR constante.

A expressão de *CaSERK* acompanhou o CR e a TCR até os 30 dias, quando alcançou o pico máximo; diminuiu até os 50 dias, acompanhando a tendência de queda da TCR; e voltou a aumentar aos 60 dias, de modo inverso e desproporcional à TCR (Figuras 1 e 2). A expressão de *CaBBM* acompanhou o CR e a TCR até os 20 dias, num nível maior que *CaSERK*; diminuiu para níveis de aproximadamente 1/3 da expressão de *CaSERK* entre 30 e 40 dias, acompanhando a estabilização da TCR; depois, de modo inverso à TCR, aumentou para os níveis de *CaSERK* aos 50 dias e novamente diminuiu para um nível de aproximadamente 1/2 da expressão de *CaSERK* aos 60 dias (Figuras 1 e 2).

O declínio na expressão de *CaSERK* e *CaBBM* provavelmente se deve à crescente depleção de nutrientes e, pelo menos no caso de *CaSERK*, também depleção de auxina, que faz parte do meio MM. *SERK* foi induzido por 2,4D em *Arabidopsis* (Hecht et al. 2001) e *Medicago* (Nolan et al. 2003). De modo geral, a expressão do *SERK* coincide com o requerimento de auxinas para a multiplicação celular indiferenciada que caracteriza os calos (Schmidt et al. 1997; Nolan et al. 2003; Sharma et al. 2008; Singla et al. 2008).

Por outro lado, a tendência de recuperação da expressão de ambos talvez seja devida ao estresse nutricional crescente, mais rigoroso aos 60 dias. Condições estressantes são, em si, suficientes para induzir a embriogênese somática (von Arnold et al. 2002) e, portanto, os genes relacionados. Reguladores de crescimento são fatores de estresse. Auxina, por exemplo, provoca acidificação da parede celular e induz à metilação do DNA (von Arnold et al. 2002). Em *Musa* spp, *SERK* é expresso tanto em associação à embriogênese somática quanto à pressão de inóculo por *Fusarium* (Huang et al. 2010).

O perfil de recuperação de expressão de ambos os genes (50 e 60 dias), coincidente com a queda na TCR, é semelhante, numa menor proporção de expressão, ao perfil dos mesmos durante a fase exponencial e a de estabilização da TCR (10-30 e 30-40 dias, respectivamente) (Figuras 1 e 2), indicando que, talvez, um segundo ciclo de crescimento fosse iniciado com influxo suficiente de nutrientes. Em *Arabidopsis*, depois de muitos subcultivos de ECS, durante os quais as células foram reinoculadas em meio nutritivo fresco, o CR e a TCR foram mantidos altos, porém, o potencial embriogênico das células foi perdido (Ikeda et al. 2006). Von Arnold et al. (2002) revisaram o mesmo fato com outras espécies. Isso implica que, apesar do declínio da expressão de *CaSERK* e *CaBBM* se relacionar com a depleção de nutrientes, outros fatores devem interferir na expressão desses genes durante prolongados períodos de subcultivos, já que *SERK* e *BBM* são associados à capacidade embriogênica de uma suspensão celular.

A maior expressão de *CaBBM*, em relação à expressão de *CaSERK*, durante o início da fase exponencial de crescimento (10-20 dias); e seu declínio, para níveis de aproximadamente 1/3 de *CaSERK*, quando a TCR alcançou o máximo e estabilizou (30-40 dias), coincidindo com os maiores picos na expressão de *CaSERK* (Figuras 1 e 2), mostra uma relação transiente de indução e retroinibição entre esses genes durante o crescimento da suspensão celular. Nessa relação, supõem-se que *CaBBM* funcionou como indutor da expressão de *CaSERK* e do CR, enquanto *CaSERK* funcionou como indutor da TCR e sua manutenção. Essas indicações estão de acordo com o fato de *BBM* codificar um fator de transcrição que induz a expressão de genes associados à embriogênese (Passarinho et al. 2008), bem como se associa à proliferação e organização celulares em regiões de crescimento (Boutilier et al. 2002), assim como *SERK*, que se associa à alta taxa mitótica nessas regiões (Thomas et al. 2004).

Pela hipótese dessa relação indução-repressão, a recuperação de ambos os genes durante o declínio da TCR pode ser explicada de outro modo. A expressão de *CaBBM* já era baixa aos 30 dias, quando a depleção de nutrientes era menor. Com o aumento da depleção, e também de auxina, a expressão de *CaSERK* diminui, provocando um estado metabólico que induz à expressão de *CaBBM* (50 dias). Com o aumento do fator AP2/ERF, a expressão de *CaSERK* é induzida (60 dias) e com o aumento da LRR-kinase e da ativação do mecanismo de transdução de sinais, um novo estado metabólico é constituído e condiciona a queda na expressão de *CaBBM* (60 dias).

As ECS usadas neste trabalho compõem parte do material *in vitro*, sob desenvolvimento, que vem sendo obtido em nosso laboratório. O potencial embriogênico dessas suspensões, em termos de capacidade de regeneração de embriões somáticos, ainda não foi analisado de modo sistematizado. Dados preliminares (não mostrados) indicam um aumento linear, em taxa aritmética, da frequência de embriões somáticos, máxima aos 30 dias (indução à regeneração posterior a esse período ainda não foi realizada).

Apesar da preliminaridade, esses dados indicam que as ECS se multiplicam mais rápido do que amadurecem. Se esse comportamento for confirmado, implicará que o amadurecimento ocorre, de modo geral, quando a multiplicação se estabiliza e que a expressão de *CaSERK* reflete o potencial embriogênico de uma suspensão celular mais em relação à TCR do que em relação à maturação do embrião, apesar dos picos de expressão e de regeneração supostamente também se relacionarem.

O parâmetro efetivo da capacidade embriogênica de uma suspensão celular é a frequência de regeneração de embriões somáticos. Mas, no caso do cafeeiro, essa resposta demora em torno de 60 dias. Caso as relações acima supostas sejam confirmadas em futuros experimentos de regeneração e que suspensões de alta qualidade sejam obtidas como referência, a quantificação

relativa de *CaSERK* e *CaBBM* constituirá um parâmetro de avaliação do desenvolvimento de suspensões celulares muito importante para os objetivos biotecnológicos: quanto mais diametralmente opostas as expressões de *CaSERK* e *CaBBM*, tomadas numa rápida análise quantitativa, maior deverá ser a frequência de regeneração de embriões somáticos da suspensão celular.

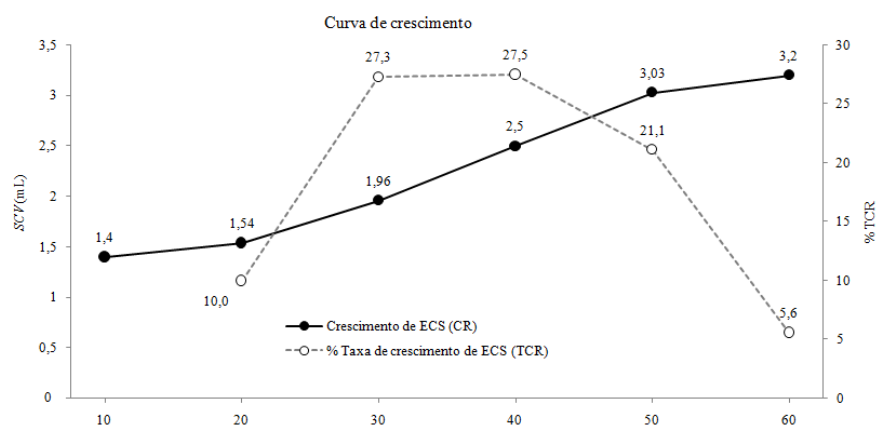


Figura 1 Curva de crescimento (CR e TCR) em ECS de *C. arabica* cv. Catiguá baseada no volume de células sedimentadas (SCV). [volumes (em mL) de ECS obtidos por média simples de 7 repetições de cada tempo de cultivo (10 a 60 dias)].

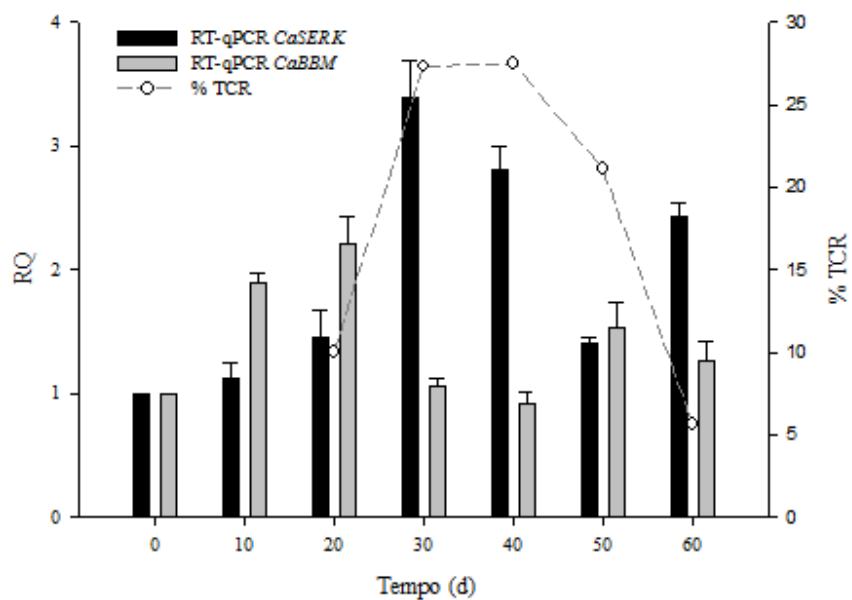


Figura 2 Expressão quantitativa relativa (RQ) de *CaSERK* e *CaBBM* em ECS de *C. arabica* cv. Catiguá cultivadas durante 60 dias; Taxa percentual de crescimento de ECS (%TCR). [valores de RQ = média de réplicas técnicas; controles endógenos = *ACTIN* e *GAPDH*; tempo 0 (calos embriogênicos) = amostra de referência (RQ = 1)].

REFERÊNCIAS

- Albrecht C, Russinova E, Kemmerling B, Kwaaitaal M, de Vries SC (2008) Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE Proteins Serve Brassinosteroid-Dependent and -Independent Signaling Pathways. *Plant Physiology* 148: 611-619
- Barsalobres-Cavallari C, Severino F, Maluf M, Maia I (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology* 10: 1
- Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht VFG, Dresselhaus T, Lörz H, Dumas C, Rogowsky PM (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213: 1-10
- Becraft PW (1998) Receptor kinases in plant development. *Trends in Plant Science* 3: 384-388
- Becraft PW (2002) RECEPTOR KINASE SIGNALING IN PLANT DEVELOPMENT. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18: 163-192
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C-M, van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, van Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell Online* 14: 1737-1749
- Chuck G, Meeley RB, Hake S (1998) The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene *indeterminate spikelet1*. *Genes & Development* 12: 1145-1154
- Daniell TJ, Fordham-Skelton AP, Vergani P, Edwards R (1996) Isolation of a maize cDNA (accession n°. Z47554) (PGR 96-013) encoding APETALA-2-like binding domains by complementation cloning of an l-isoaspartyl methyltransferase-deficient mutant of *Escherichia coli*. *Plant Physiology* 110: 1435
- de Oliveira Santos M, Romano E, Yotoko KSC, Tinoco MLP, Dias BBA, Aragão FJL (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Science* 168: 723-729
- El Ouakfaoui S, Schnell J, Abdeen A, Colville A, Labbé H, Han S, Baum B, Laberge S, Miki B (2010) Control of somatic embryogenesis and embryo

- development by AP2 transcription factors. *Plant Molecular Biology* 74: 313-326
- Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker W, Gerentes D, Perez P, Smyth DR (1996) AINTEGUMENTA, an APETALA2-like Gene of Arabidopsis with Pleiotropic Roles in Ovule Development and Floral Organ Growth. *The Plant Cell Online* 8: 155-168
- Georget F, Domergue R, Ferrière N, Côte FX (2000) Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa AAA*, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports* 19: 748-754
- Hecht V, Vielle-Calzada J-P, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC (2001) The Arabidopsis *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence in Culture. *Plant Physiology* 127: 803-816
- Huang X, Lu X-Y, Zhao J-T, Chen J-K, Dai X-M, Xiao W, Chen Y-P, Chen Y-F, Huang X-L (2010) *MaSERK1* Gene Expression Associated with Somatic Embryogenic Competence and Disease Resistance Response in Banana (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 309-316
- Ikeda Y, Banno H, Niu Q-W, Howell SH, Chua N-H (2006) The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in Arabidopsis Regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the Transcriptional Level and Controls Cotyledon Development. *Plant and Cell Physiology* 47: 1443-1456
- Jofuku KD, Boer B, Montagu MV, Okamoto JK (1994) Control of Arabidopsis Flower and Seed Development by the Homeotic Gene APETALA2. *The Plant Cell Online* 6: 1211-1225
- Klucher KM, Chow H, Reiser L, Fischer RL (1996) The AINTEGUMENTA Gene of Arabidopsis Required for Ovule and Female Gametophyte Development Is Related to the Floral Homeotic Gene APETALA2. *The Plant Cell Online* 8: 137-153
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 10: 1391-1406
- Menke FLH, Champion A, Kijne JW, Memelink J (1999) A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite

- biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J* 18: 4455-4463
- Moose SP, Sisco PH (1996) Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes & Development* 10: 3018-3027
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003) Auxin Up-Regulates *MtSERK1* Expression in Both *Medicago truncatula* Root-Forming and Embryogenic Cultures. *Plant Physiology* 133: 218-230
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact with an Ethylene-Responsive Element. *The Plant Cell Online* 7: 173-182
- Okamoto JK, Caster B, Villarroel R, Van Montagu M, Jofuku KD (1997) The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 7076-7081
- Passarinho P, Ketelaar T, Xing M, van Arkel J, Maliepaard C, Hendriks M, Joosen R, Lammers M, Herdies L, den Boer B, van der Geest L, Boutilier K (2008) BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. *Plant Molecular Biology* 68: 225-237
- Pérez-Núñez M, Souza R, Sáenz L, Chan J, Zúñiga-Aguilar J, Oropeza C (2009) Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Reports* 28: 11-19
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 339: 62-66
- Santa-Catarina C, Hanai LR, Dornelas MC, Viana AM, Floh EIS (2004) *SERK* Gene Homolog Expression, Polyamines and Amino Acids Associated with Somatic Embryogenic Competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 53-61
- Schellenbaum P, Mohler V, Wenzel G, Walter B (2008) Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology* 8: 78
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049-2062

- Sharma S, Millam S, Hein I, Bryan G (2008) Cloning and molecular characterisation of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta* 228: 319-330
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Omura M (2005) Isolation and characterization of a new *d*-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc. *Scientia Horticulturae* 105: 507-512
- Singla B, Khurana J, Khurana P (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports* 27: 833-843
- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries SC (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports* 19: 718-726
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and \square water \square deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 1035-1040
- Strosse H, Domergue R, Panis B, Escalant JV, Côte F (2003) Banana and plantain embryogenic cell suspensions. In: Vézina A, Picq C (eds) *The International Network for the Improvement of Banana and Plantain - INIBAP. Technical Guidelines*, 8, Montpellier, France
- Teixeira JB, Junqueira CS, Pereira AJdC, Mello RIS, Silva APD, Mundim DA (2004) Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. *EMBRAPA Documentos* 121: 39
- Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 35-42
- Vasil IK (1988) Progress in the Regeneration and Genetic Manipulation of Cereal Crops. *Nat Biotech* 6: 397-402
- von Arnold S (2008) Somatic Embryogenesis. In: George EF, Hall MA, Klerk G-JD (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture* Springer; Dordrecht, Netherlands, pp 335-355
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249
- Weigel D (1995) The APETALA2 Domain Is Related to a Novel Type of DNA Binding Domain. *The Plant Cell Online* 7: 388-389

Zhou J, Tang X, Martin GB (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. EMBO J 16: 3207-3218

ARTIGO 4
NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA *GENETICS AND MOLECULAR*
RESEARCH
(VERSÃO PRELIMINAR)

IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS NO GENOMA DO CAFÉ POTENCIALMENTE ASSOCIADAS À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Anderson Tadeu Silva¹; Luciano Vilela Paiva^{1,2*}; Alan Carvalho de Andrade³

¹ Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil; ² Departamento de Química, UFLA, Brasil;

³ Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cernagen)

* **Autor correspondente:** luciano@dqi.ufla.br; fax: +55-35-3829-1624

RESUMO

O Brasil possui a mais moderna e produtiva cafeicultura do mundo, porém ela não acompanha a crescente demanda mundial. Para aumentar a produtividade da cafeicultura brasileira, é importante a produção em larga escala de clones com genótipo superior, que podem ser obtidos com as técnicas da propagação *in vitro*, ou da cultura de tecidos. Nessas técnicas, massas celulares (calos) obtidas a partir de partes da planta (explantes), podem ser multiplicadas e depois induzidas a produzirem embriões somáticos que, por sua vez, serão induzidos a regenerarem plântulas. Esse procedimento pode gerar milhares de clones. Porém, as metodologias para o cultivo *in vitro* são genótipo-dependentes, o que leva a um desenvolvimento quase empírico de protocolos específicos para cada espécie. Portanto, o estudo e obtenção de marcadores moleculares ligados aos eventos bioquímicos da embriogênese somática, podem ser de extrema importância para o desenvolvimento desses protocolos. Nesse contexto, sequências potencialmente envolvidas no processo da embriogênese do cafeeiro foram identificadas *in silico*, a partir das bibliotecas geradas pelo Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC). Através das análises *in silico*, foi possível

identificar 15 ESTs-*contigs* relacionados ao processo da embriogênese no cafeeiro. Desses, apenas cinco ESTs-*contigs* (3605, 9850, 13686, 17240 e 17265) possivelmente estão relacionados a esse processo. O ESTs-*contig* 3605 apresentou similaridade com a poligalacturonase, o 9850 apresentou similaridade com uma cisteíno proteinase, o 17265 apresentou similaridade a alergenina e o 17265 apresentou similaridade com a expansina. O ESTs-*contig* 17240 apresentou similaridade com uma proteína de função desconhecida, mas se agrupou no dendrograma de similaridade com o fator de transcrição *WUSCHEL*. Esses dados sugerem que esses ESTs-*contig* estejam relacionados ao processo embriogênico, de modo que poderiam ser usados como marcadores moleculares e aumentar a eficiência metodológica na obtenção de materiais embriogênicos de cafeeiro.

Identificação de sequências expressas no genoma do café potencialmente associadas com a embriogênese somática

INTRODUÇÃO

O sequenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) é um método que apresenta uma boa relação de custo benefício na obtenção de dados genômicos de interesse. Em plantas-modelo, tais como *Arabidopsis thaliana* (Höfte et al., 1993) e *Oryza sativa* (Yamamoto e Sasaki, 1997) o sequenciamento de ESTs contribuiu para a rápida identificação de genes responsáveis por características de interesse agrônômico, possibilitando assim, a manipulação desses genes por meio de ferramentas biotecnológicas.

A cultura do cafeeiro está sendo beneficiada com o Projeto Brasileiro de Genoma Café (PBGC), em que foram identificados aproximadamente 33.000 unigenes a partir de 214.964 *ESTs* de 37 bibliotecas de tecidos, em diferentes estádios fisiológicos de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea racemosa*. Essas *ESTs* foram agrupadas, resultando em 17.982 *contigs* e 32.155 *singlets* (Vieira et al., 2006).

O grande número de dados gerados em Projetos Genoma de várias espécies é analisado mediante ferramentas de bioinformática. Dentre os diferentes algoritmos, o “Teste Exato de Fisher”, disponibilizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), possibilita a comparação *in silico* entre os grupos formados por diferentes bibliotecas.

O objetivo maior em um trabalho de genômica é identificar genes responsáveis por características relevantes. Os genes relacionados com os tecidos embriogênicos estão entre as classes de genes importantes para o cultivo *in vitro* das espécies, pelo fato de serem responsáveis por respostas que aumentam a competência embriogênica.

Objetivou-se, neste trabalho identificar, por meio de análise *in silico*, sequências do banco de dados do PBGC diferencialmente expressas entre os grupos formados por bibliotecas de calos embriogênicos, calos não embriogênicos e suspensão celular. Os *contigs* identificados serão úteis para o possível desenvolvimento de novos e eficientes marcadores moleculares, para assistirem os processos da embriogênese somática do cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Busca de sequências diferencialmente expressas

Para a busca das sequências potencialmente envolvidas com a embriogênese do cafeeiro, foram analisados os ESTs do PBGC por meio da plataforma de bioinformática da EMBRAPA (Cernagem), a partir da comparação entre os grupos formados por bibliotecas de calos embriogênicos, calos não embriogênicos e suspensão celular. Essa estratégia foi baseada nos dados fornecidos pelo Teste Exato de Fisher.

Todos os ESTs (16703 do grupo de calos embriogênicos, 8558 do grupo de calos não embriogênicos e 15908 do grupo de suspensão celular), provenientes de dez bibliotecas de cDNA (Tabela 1), foram confrontados para analisar a expressão diferencial *in silico*. As combinações de comparação foram: (i) calos embriogênicos *versus* calos não embriogênicos, (ii) calos embriogênicos *versus* suspensão celular e (iii) suspensão celular *versus* calos não embriogênicos.

Expressão gênica *in silico* – Northern eletrônico

Para análise da expressão gênica *in silico*, as frequências dos *reads* formadores de cada ESTs-*contig* expresso nas bibliotecas foram normalizadas, já que as bibliotecas não possuíam o mesmo tamanho. A normalização consistiu em multiplicar a frequência de cada *read* pela razão entre o número total de *reads* de todas as bibliotecas e o número de *reads* da biblioteca na qual o dado

read foi expresso Com os resultados da normalização, uma matriz foi processada usando os programas *Cluster* e *TreeView* (Eisen et al., 1998), na qual se relacionaram bibliotecas e clusters de EST-*contigs*, agrupados por *hierachial clustering*. Dos resultados *in silico*, foram selecionados 15 EST-*contigs* para analisar seu envolvimento na embriogênese somática do cafeeiro.

Dendrograma de similaridade

As sequências dos 15 ESTs-*contigs* diferencialmente expressos em bibliotecas de cafeeiro (Vieira et al., 2006) foram alinhadas (*ClustalW*; Thompson et al., 1994) e agrupadas (MEGA 4; Tamura et al., 2007) usando o modelo de comparação *Neighbor-joining* (Saitou; Nei, 1987) pelo método de *p distance* e supressão *pair-wise*, com sequências de genes descritos como importantes na embriogênese: *BBM* (Boutilier et al., 2002), *PSK* (Igasaki et al., 2003), *LEC* (Lotan et al., 1998, Stone et al., 2001), *AGLI* (Heck et al., 1995), *PKL* (Rider et al., 2003), *WUS* (Zuo et al., 2002) e *SERK* (Schmidt et al., 1997). A validade do dendrograma quanto à distância dos *clusters* foi dada pelo teste probabilístico de *bootstraps* (Sitnikova et al., 1995). Dos resultados *in silico*, foram selecionados quatro ESTs-*contigs*. As sequências aminoacídicas desses ESTs-*contigs* foram deduzidas usando a interface ExPASy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) e a integridade dos respectivos domínios foram verificadas utilizando-se o programa NCBI *Conserved Domain Search*.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Sequências potencialmente envolvidas no processo da embriogênese do cafeeiro foram identificadas *in silico*, por meio do Teste Exato de Fisher, a partir da busca por sequências diferencialmente expressas em bibliotecas de materiais embriogênicos.

Das buscas *in silico* foram selecionados 15 ESTs-*contigs* com maior expressão nas bibliotecas de calos embriogênicos e/ou de suspensão celular (Tabela 2). Os ESTs-*contigs* que apresentaram expressão *in silico* em bibliotecas de materiais embriogênicos (calos embriogênicos e suspensão celular) e, simultaneamente, em calos não embriogênicos, foram descartadas das análises posteriores (Figura 1). Embora o *Northen* eletrônico seja uma normalização dos ESTs-*contigs* expressos nas bibliotecas do cafeeiro, sequências com baixas expressões não são possíveis de visualizar no gráfico. O programa do Teste Exato de Fisher fornece gráficos em que observa a expressão relativa do ESTs-*contig* em cada biblioteca. Nesse contexto, ESTs-*contigs* que apresentaram expressões basais em calos não embriogênicos, de modo similar ao ESTs-*contig* 7474 (Figura 2), também foram descartados.

Dentre esses ESTs-*contigs*, o 3997 apresentou o domínio (Glo_EDI_BRP_like) (Figura 3) que está estruturalmente relacionado a metaloproteínas, incluindo dioxigenases, glioxalase e um grupo de proteínas relativo à resistência a antibióticos (Marchler-Bauer et al., 2009). Essas proteínas estão envolvidas em processos de estresses, tais como o estresse salino (Yadav et al., 2005; vander Jagt et al., 2001). Visto que a indução da embriogênese somática é um processo estressante (Nolan et al., 2006), existe a possibilidade que esse ESTs-*contig* tenha alguma função no processo de defesa da planta contra estresses.

Dos 14 ESTs-*contigs* restantes, nove foram expressos *in silico* exclusivamente em materiais embriogênicos (Figura 1) e não apresentaram

similaridade com qualquer gene presente nos bancos de dados do NCBI (Tabela 2). Isso indica que essas sequências podem ser únicas de cafeeiro ou que podem ser relativas a genes ainda não descritos. Portanto, são sequências que devem ser analisadas com mais minúcia.

Entretanto, cinco ESTs-*contigs* (3605, 9850, 13686, 17240 e 17265) foram expressas *in silico* em bibliotecas de materiais embriogênicos (Vieira et al., 2006) (Figura 1) e mostraram homologia com sequências que podem estar relacionadas ao processo embriogênico (Tabela 2):

ESTs-*contig* 3605

O *contig* 3605 apresenta o domínio Glyco_hydro_28, que é estruturalmente relacionado com a poligalacturonase de *Arabidopsis thaliana* (*At3g15720*) (Marchler-Bauer et al., 2009) (Figura 3) e sua sequência apresenta similaridade com a poligalacturonase de *Lycopersicon esculentum* (Tabela 2).

A poligalacturonase é responsável pela solubilização de pectinas durante o amadurecimento dos frutos de diversas espécies (Pressey, Avants, 1982; Huber, 1983), incluindo *Coffea arabica* L. (Pimenta, Chagas, Costa, 2000). No entanto, em *Hordeum vulgare* L., o gene da poligalacturonase (*HvPG1*) mostrou expressão após a divisão dos micrósporos durante a gametogênese (Pulido et al., 2009) e, em sementes de *Lycopersicon esculentum* Mill, a poligalacturonase (*LeXPG1*) está envolvida no desenvolvimento embrionário e também no afrouxamento da parede celular das células do endosperma durante a protrusão da radícula e posterior crescimento da plântula (Sitrit et al., 1999).

Por outro lado, o *contig* 3605 não foi expresso *in silico* nas bibliotecas de frutos (FR1, FR2 e FR4) e de sementes germinando [sementes inteiras e embriões zigóticos (EM1, SI3)] (Vieira et al., 2006), mas apenas nas bibliotecas de células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil e brassinosteroides (CB1) e células em suspensão tratadas com NaCl (CS1) (Figura 2). Portanto, considerando a expressão *in silico* do *contig* 3605 e a expressão da

poligalacturonase durante o desenvolvimento embrionário em tomate (Sitrit et al., 1999) e durante a gametogênese em *Hordeum vulgare* L (Pulido et al., 2009), é possível que o *contig* 3605 esteja relacionado com o processo da embriogênese somática do cafeeiro, já que esse processo é muito semelhante ao zigótico (Zimmerman, 1993).

ESTs-*contig* 9850

O *contig* 9850 apresenta parte do domínio GRP (*Glycine rich protein*) (Figura 3) presente em proteínas induzidas em resposta a estresses (Marchler-Bauer et al., 2004; Marchler-Bauer et al., 2009, 2011) e sua sequência apresenta similaridade com uma cisteíno-peptidase de *Lycopersicon esculentum* (Tabela 2).

As cisteíno-peptidases participam diretamente no processamento das globulinas de reserva de sementes, principalmente de dicotiledôneas, tanto no acúmulo durante as fases tardias da embriogênese, quanto na mobilização, durante a germinação (Bewley, 1997; Fischer et al, 2000; Muntz; Blattner; Shutov, 2002; Nonogaki; Bassel; Bewley, 2010; Zakharov et al, 2004). O *contig* 9850 foi expresso *in silico* nas biblioteca de *pool* de tecidos em condições normais no campo (SS1), de calos (CL2 e PA1) e de suspensões celulares (CB1 e CS1) (Figura 2). Em *Medicago truncatula*, a expressão transiente de GUS mediante o promotor de uma cisteíno-peptidase (*PsCys15a*) foi detectada durante a organogênese em calos embrionários (Vicent et al., 2000) e, em *Elaeis guineensis* Jacq., cisteíno-peptidases foram detectadas em embriões somáticos (Aberlenc-Bertossi et al., 2008). Portanto, é possível que o *contig* 9850 esteja relacionado com o processo da embriogênese somática no cafeeiro.

ESTs-*contigs* 13686

O *contig* 13686 apresenta o domínio *major allergen* (Bet_v1_like) (Figura 3) e similaridade com a sequência *major allergen* de *Malus domestica* (Tabela 2).

Esse domínio inclui proteínas relacionadas com a patogênese em plantas (PR 10) (Marchler-Bauer et al., 2004; Marchler-Bauer et al., 2009, 2011). Essas proteínas foram inicialmente consideradas como sendo induzidas por diferentes estresses bióticos e abióticos, mas posteriormente foram detectadas em diferentes órgãos da planta durante o crescimento, sendo expressas de forma constitutiva (van Loon et al., 2006).

Muitas PR 10 são expressas de forma constitutiva em diferentes estádios de desenvolvimento e/ou em diferentes tecidos e órgãos, como nas sementes, raízes (Sikorski et al., 1999), flores e folhas (Breiteneder et al., 1989; Crowell et al., 1992; Barrat e Clark, 1993; Sikorski et al., 1999). Por outro lado, em *Arachis hypogaea*, três genes da alergénina (*ara h1*, *ara h2* e *ara h3*) foram expressos exclusivamente durante o desenvolvimento da semente (Kang et al., 2007) e, em *Dacus carota*, dois homólogos ao *major allergen* foram altamente expressos nos estágios iniciais da embriogênese e em suspensão celular (Sano et al., 2004).

Portanto, considerando que o *contig* 13686 foi expresso *in silico* de forma não constitutiva, em menor intensidade, nas bibliotecas de folhas, plântulas, hipocótilos e raiz (AR1,LP1; CL2; FR4; RT5 e RT8) e, em maior intensidade, nas bibliotecas de calos embriogênicos e de suspensão celular (CB1; CS1; PA1 e RT8), é possível que esse *contig* esteja envolvido no processo da embriogênese do cafeeiro.

ESTs-*contigs* 17240

O *contig* 17240 mostra expressão apenas nas bibliotecas de calos embriogênico de *Coffea canephora* (EC1) e de *Coffea arabica* (EA1, IA1, IA2) (Vieira et al., 2006) (Figura 2), homologia com uma proteína de *Oryza sativa* de funções desconhecidas (Tabela 2), com o domínio (DUF674) (Figura 3) e se agrupa com a sequência do *WUSCHEL* (*WUS*) (Laux et al., 1996) [valor de *bootstrap* < 50% (Figura 4)].

O *WUS* é um fator de transcrição da família *WOX* (*WUSCHEL – RELATED HOMEBOX*), que é expresso durante a embriogênese (Haecker et al., 2004; Chandler et al., 2008), mais especificamente nas duas células centrais do embrião de 16 células, durante a reprodução vegetativa (Laux et al., 1996, Mayer et al., 1998). Em *C. canephora*, um heterólogo do *WUS* foi capaz de promover a transição do estado vegetativo para o embriogênico em células somáticas e, eventualmente a formação de embriões somáticos (Arroyo-Herrera et al., 2008).

O *contig* 17240 apresentou uma expressão *in silico* de, aproximadamente, 480 vezes na biblioteca de calos embriogênicos de *C. canephora* (EC1). Portanto, como o *contig* 17240 não apresentou expressão *in silico* em bibliotecas de crescimento meristemático (Figura 2), é mais plausível considerar que o *contig* 17240 esteja relacionado com o processo da embriogênese do cafeeiro, pois em *Arabidopsis thaliana* o *WUS* tem sua expressão delimitada às regiões que darão origem aos novos meristemas (Gordon et al., 2007). Porém, em plantas transgênicas de *C. canephora*, a expressão do gene heterólogo do *WUS* aumentou a indução de embriões somáticos em 400% (Arroyo-Herrera et al., 2008), resultado semelhante ao encontrado nas análises *in silico* deste trabalho.

ESTs-*contig* 17265

O *contig* 17265 apresenta o domínio da expansina (PLN00050) (Figura 3) e similaridade com a sequência da expansina de *Mangifera indica* (Tabela 2).

As expansinas tem a função de promover o relaxamento da parede celular no início do amadurecimento do fruto de diversas espécies (Harrison; Mcqueen-Mason; Manning, 2001; Hiwasa et al., 2003). Em *C. arabica* foi observado que dois genes da expansina (*CaEXPA1* e *CaEXP3*), estavam diretamente relacionados com o tamanho do fruto (Budzinski et al., 2010).

No entanto, em *Lycopersicon esculentum*, genes da expansina (*LeEXP4*, *LeEXP8* e *LeEXP10*) estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e também na germinação (Chen e Bradford, 2000).

Portanto, considerando que o *contig* 17265 foi aproximadamente 57 vezes mais expresso *in silico* na biblioteca de calos embriogênicos de *C. canephora* (EC1) do que na biblioteca de fruto. É possível que esse *contig* esteja mais envolvido no processo da embriogênese do cafeeiro, do que com o aumento do tamanho do fruto, como descrito em *C. canephora* (Budzinski et al., 2010).

Embora os ESTs-*contigs* analisados indiquem envolvimento na embriogênese somática do cafeeiro, análises de genômica funcional serão necessárias para avaliar a possibilidade de esses genes serem usados como marcadores do processo de aquisição embriogênica no cafeeiro.

Tabela 1 Grupos formados pelas bibliotecas do Projeto Brasileiro do Genoma Café com os respectivos números de *clusters*

Grupo de calos embriogênicos		
Biblioteca	Descrição	Clusters
EA1	Calos embriogênicos - <i>Coffea arabica</i>	3919
EC1	Calos embriogênicos – <i>Coffea canephora</i>	4616
IA1	Calos embriogênicos - <i>Coffea arabica</i>	72
IA2	Linhagem embriogênica (folha) com indução de 2,4D - <i>Coffea arabica</i>	1889
PA1	Linhagem embriogênica (calos primários) – <i>Coffea arabica</i>	1534
Grupo de calos não embriogênicos		
Biblioteca	Descrição	Clusters
CA1	Calo – <i>Coffea arabica</i>	3416
IC1	Linhagem não embriogênica (folha) sem indução de 2,4D – <i>Coffea arabica</i>	1552
PC1	Linhagem não embriogênica (folhas) com indução de 2,4D – <i>Coffea arabica</i>	1422
Grupo de suspensão celular		
Biblioteca	Descrição	Clusters
CB1	Células em suspensão com bion e brassinosteróides – <i>Coffea arabica</i>	5409
CS1	Células em suspensão com sais – <i>Coffea arabica</i>	4921

Tabela 2 *Contigs* diferencialmente expressos *in silico* em materiais embriogênicos do cafeeiro

Contig	Homologia	Reads
1661	No Hits Found	172
1671	No Hits Found	204
2021	No Hits Found	71
3022	No Hits Found	19
3231	No Hits Found	62
3605	gb AAC70951.1	19
	Polygalacturonase [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	
3642	No Hits Found	58
3688	No Hits Found	102
3997	gb AAO43000.1	48
	Early tobacco anther 1 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	
8969	No Hits Found	154
9221	No Hits Found	86
9850	CAA88629.1	66
	Cysteine proteinase [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	
13686	gb AAX18296.1	78
	Major allergen [<i>Malus domestica</i>]	
17240	ref XP_550180.1	25
	Hypothetical protein [<i>Oryza sativa</i>]	
17265	gb AAT11859.2	39
	Expansin 1 [<i>Mangifera indica</i>]	

Figura 1 Northern eletrônico representando níveis de expressão dos ESTs-*contigs* nas bibliotecas de café (VIEIRA et al., 2006). [quanto mais escuros os tons de cinza, maior a expressão] **AR1, LP1** – Folhas e plântulas com tratamento de ácido araquidônico; **BP1** – Células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil; **CB1** – Células em suspensão tratadas com acilbenzolar-S-metil e brassinosteroides; **CL2** – Hipocótilos tratados com acilbenzolar-S-metil; **CS1** – Células em suspensão tratadas com NaCl; **EA1, IA1, IA2** – Calo Embriogênico; **EC1** – Calos embriogênicos de *Coffea canephora*; **EM1, SI3** – Sementes Germinando (sementes inteiras e embriões zigóticos); **FB1, FB2, FB4** – Botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento; **FR1, FR2** – Botões florais + frutos chumbinho no 1º estágio + frutos em diferentes estágios; **FR4** – Fruto (*Coffea racemosa*); **FV2** – Fruto verde nos 1º, 2º e 3º estágio de *Coffea racemosa*; **CA1, IC1, PC1** – Calo não embriogênico com e sem 2,4-D; **LV4, LV5** - Folhas jovens de galhos ortotrópicos; **LV8, LV9** – Folhas maduras de galhos plagiotrópicos; **PA1** – Calo embriogênico primário (*Coffea arabica* L.); **RM1** – Folhas infectadas com ferrugem e bicho mineiro; **RT3** - Raiz sem bion; **RT5** - Raiz com bion; **RT8** – Raiz e células em suspensão na presença de alumínio; **RX1** – Ramos infectados com *Xylella ssp.*; **SH1** - Folhas de *Coffea canephora* sob estresse hídrico **SH2** – Estresse hídrico no campo. **SS1** - *Pool* de tecidos em condições normais

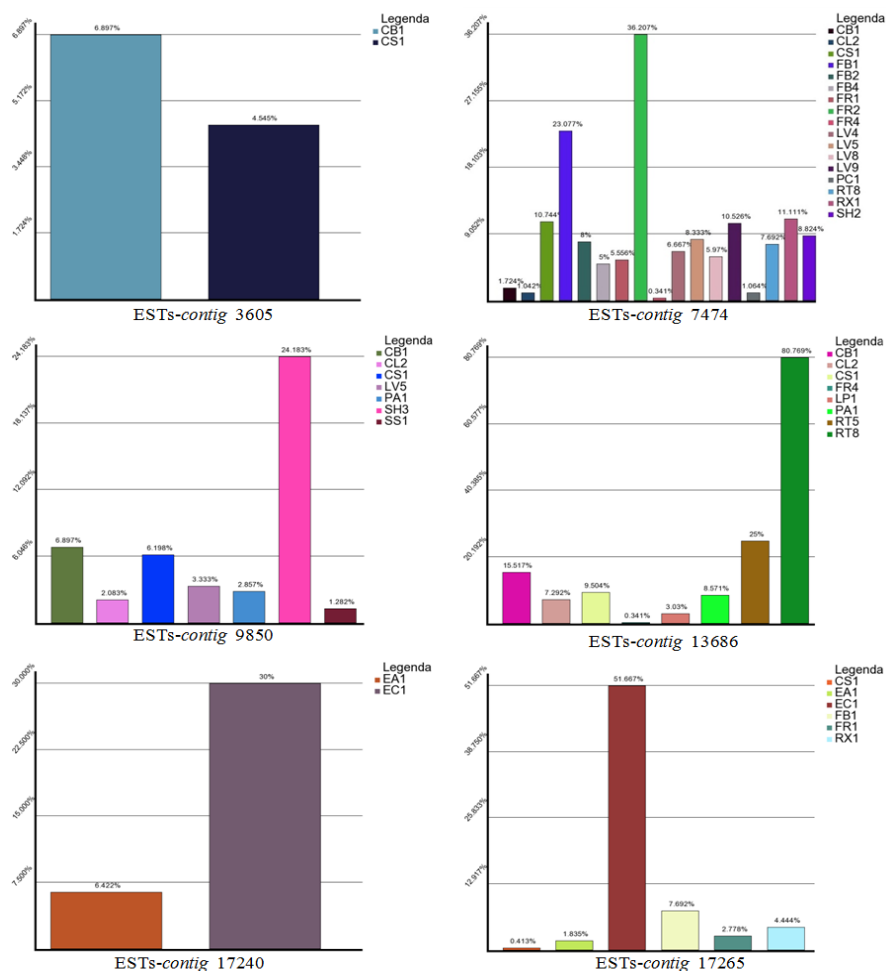


Figura 2 Expressão relativa em relação aos ESTs-contigs mais expressos em cada biblioteca. [CB1 Células em suspensão de *Coffea arabica* com bion e brassinosteróides; CL2 – Hipocótilos tratados com acilbenzolar-S-metil; CS1 - Células em suspensão com sais; FB1, FB2, FB4 – Botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento de *Coffea arabica*; FR1, FR2 – Botões florais + frutos chumbinho no 1º estágio + frutos em diferentes estágios de *Coffea arabica*; FR4 – Fruto (*Coffea racemosa*); LP1 - Plântulas com tratamento de ácido araquidônico ; LV4, LV5 - Folhas jovens de galhos ortotrópicos de *Coffea arabica* sem bion LV8, LV9 – Folhas maduras de galhos plagiotrópicos; PC1 - Linhagem não embriogênica (folhas) com indução de 2,4D de *Coffea arabica* (calos primários); PA1 – Calo embriogênico primário (*Coffea arabica* L.); RT5 - Raiz com bion; RT8 – Raiz e células em suspensão na presença de alumínio; RX1 - Ramos de *Coffea arabica* infectados com *Xylella*; SH2 – Pool estresse hídrico no campo]

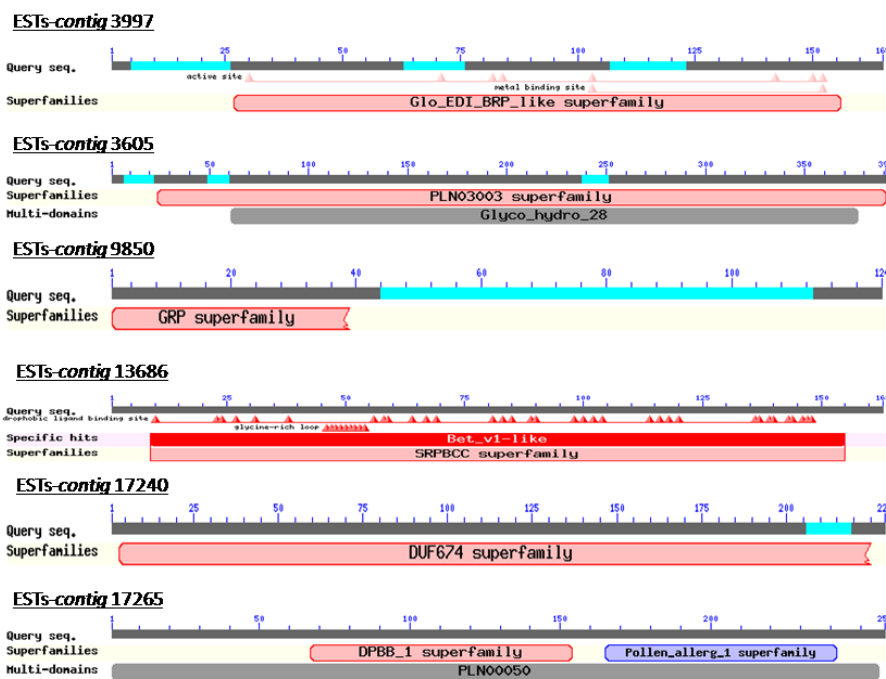


Figura 3 Domínios identificados no programa NCBI *Conserved Domains Search*.

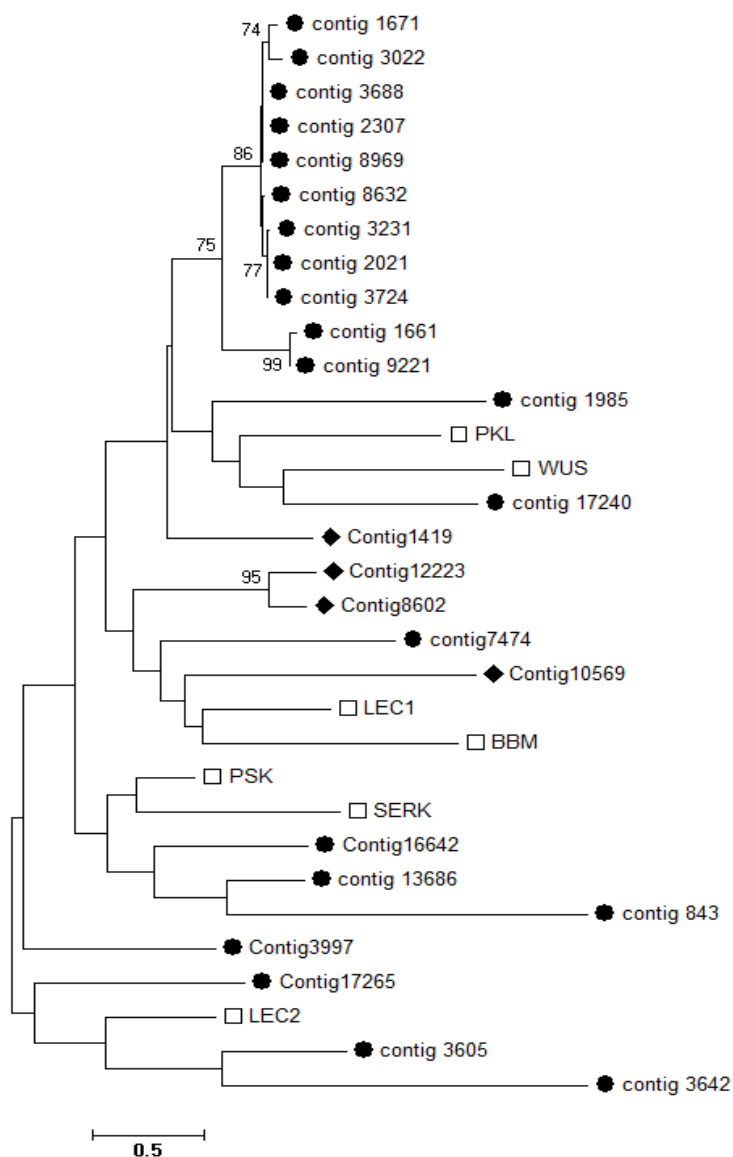


Figura 4 Dendrograma de similaridade relacionando seqüências de nucleotídeos dos ESTs-contigs. [(●) seqüências ESTs-contigs mais expressos em materiais embriogênicos; (◆) seqüências ESTs-contigs mais expressos em calos não embriogênicos (Vieira et al., 2006); (□) seqüências envolvidas no processo embriogênico; valores de *bootstrap* menores que 50% foram omitidos].

REFERÊNCIAS

- Aberlenc-Bertossi F, Chabrilange N, Duval Y and Tregear J 2008 Contrasting globulin and cysteine proteinase gene expression patterns reveal fundamental developmental differences between zygotic and somatic embryos of oil palm; *Tree Physiol.* 28 1157–1167
- Arroyo-Herrera A, Gonzalez AK, Canche Moo R, Quirez-Figueroa FR, Loyola-Vargas VM, Rodriguez-Zapata LC, Burgeff D'Hondt C, Suárez-Solis VM, Castaño E. 2008. Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94, 171–180.
- Barrat DHP, Clark JA (1993) Proteins arising during the late stages of embryogenesis in *Pisum sativum* L. *Planta* 184: 14–23.
- Boutilier K, Offringa R, Sharma V, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C, Van Lammeren A, Miki B, Custers J, Campagne M.(2002) Ecotopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737-1749.
- Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O. and Breitenbach, M. 1989. The gene coding for the major birch pollen allergen Betv 1 is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8: 1935–1938.
- Budzinski, I. G. F., Santos, T. B., Sera, T., Pot, D., Vieira, L. G. E. and Pereira, L. F. P. (2011), Expression patterns of three α -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. *Plant Biology*, 13: no. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00400.x
- Chandler J, Nardmann J, Werr W (2008) Plant development revolves around axes. *Trends Plant Sci* 13: 78–84
- Chen F, Bradford KJ (2000) Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol* 124: 1265–1274
- Crowell, D.N., Maliyakal, E.J., Russell, D. and Amasino, R.M. 1992. Characterization of a stress-induced, developmentally regulated gene family from soybean. *Plant Mol. Biol.* 18: 459–466.
- Eisen, MB, Spellman, PT, Brown, PO, Botstein, D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Washington, v. 95, n.25, p.14863-8 Fischer et al, 2000 The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from

embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis *Plant Molecular Biology* 43: 83–101, 2000.

Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM (2007) Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* 134:3539–3548.

Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T. 2004. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131, 657–668

Harrison EP, McQueen-Mason SJ, Manning K (2001) Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *J Exp Bot* 52: 1437–1446

Heck, G.R., Perry, S.E., Nichols, K.W. & Fernandez, D.E. 1995 AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. *Plant Cell*, 7, 1271–1282.

Hiwasa K, Kinugasa Y, Amano S, Hashimoto A, Nakano R, Inaba A, Kubo Y (2003) Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J Exp Bot* 54: 771–779

Hofte H, Desprez T, Amselem J, Chiapello H, Rouze P, Caboche M, Moisan A, Jourjon MF, Charpentreau JL, Berthomieu P, 1993. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4(6):1051-1061.

Huber, D.J. (1983). Polyuronide degradation and hemicelluloses modifications in ripening tomato fruit. *J. Am. SOC. Hort. Sci.* 108, 405-409.

Igasaki, T., Sato, T., Akashi, N., Mohri, T., Maruyama, E., Kinoshita, I., Walter, C. and Shinohara, K. (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Plant Cell Rep.* 22: 239–243.

Il-Ho Kang, Pratibha Srivastava, Peggy Ozias-Akins, and Maria Gallo. Temporal and Spatial Expression of the Major Allergens in Developing and Germinating Peanut Seed *Plant Physiol.* 2007 144: 836-845.

Laux, T., Mayer, K. F. X., Berger, J. and Jürgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 87-96

Lotan T, Ohto M, Matsudaira Yee K, West MAL, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998) *Arabidopsis* LEAFY

COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195–1205

Marchler-Bauer Aron and Stephen H. Bryant CD-Search: protein domain annotations on the fly *Nucl. Acids Res.* (2004).

Marchler-Bauer Aron, John B. Anderson, Farideh Chitsaz, Myra K. Derbyshire, Carol DeWeese-Scott, Jessica H. Fong, Lewis Y. Geer, Renata C. Geer, Noreen R. Gonzales, Marc Gwadz, Siqian He, David I. Hurwitz, John D. Jackson, Zhaoxi Ke, Christopher J. Lanczycki, Cynthia A. Liebert, Chunlei Liu, Fu Lu, Shennan Lu, Gabriele H. Marchler, Mikhail Mullokandov, James S. Song, Asba Tasneem, Narmada Thanki, Roxanne A. Yamashita, Dachuan Zhang, Naigong Zhang, and Stephen H. Bryant CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database *Nucl. Acids Res.* (2009).

Marchler-Bauer Aron, Shennan Lu, John B. Anderson, Farideh Chitsaz, Myra K. Derbyshire, Carol DeWeese-Scott, Jessica H. Fong, Lewis Y. Geer, Renata C. Geer, Noreen R. Gonzales, Marc Gwadz, David I. Hurwitz, John D. Jackson, Zhaoxi Ke, Christopher J. Lanczycki, Fu Lu, Gabriele H. Marchler, Mikhail Mullokandov, Marina V. Omelchenko, Cynthia L. Robertson, James S. Song, Narmada Thanki, Roxanne A. Yamashita, Dachuan Zhang, Naigong Zhang, Chanjuan Zheng, and Stephen H. Bryant CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins *Nucl. Acids Res.* (2011).

Mayer, K.F., H. Schoof, A. Haecker, M. Lenhard, G. Jurgens and T. Laux (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* 95: 805-815.

Muntz; Blattner; Shutov, 2002 Muntz K, Blattner FR, Shutov AD. Legumains - a family of asparagine-specific cysteine endopeptidases involved in propolypeptide processing and protein breakdown in plants. *J Plant Physiol* 2002;159:1281–93.

Nolan KE, Saeed NA, Rose RJ (2006) The stress kinase gene MtSK1 in *Medicago truncatula* with particular reference to somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 25: 711–722

Nonogaki; Bassel; Bewley, 2010 Hiroyuki Nonogaki, George W. Bassel, J. Derek Bewley / Germination - Still a mystery / *Plant Science* 179 (2010) 574–581

Pimenta C. J., Chagas, S. J. R., Costa L. (2000) Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica* L.) colhido em quatro estádios de maturação. *Ciênc. Tecnol.* 24: 1079-183.

Pressey, R., and Avants, J.K. (1982). Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonases: Effects of pectinesterases. *J. Food Biochem.* 6,57-74.

Pulido, A., Bakos, F., Devic, M., Barnabás, B. and Olmedilla, A. (2009) HvPG1 and ECA1: two genes activated transcriptionally in the transition of barley microspores from the gametophytic to the embryogenic pathway. *Plant Cell Rep.* 28, 551–559.

Rider, S.D., Henderson, J.T., Jerome, R.E., Edenberg, H.J., RomeroSeverson, J. and Ogas, J. (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *Plant J.* 35, 33–43

Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Schmidt, ED, Guzzo, F, Toonen, MA; de Vries, SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124, 2049–2062.

Sikorski MM, Biesiadka J, Kasperska AE, Kopcinska J, Lotocka B, Golinowski W, Legocki AB (1999) Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. *Plant Sci* 149: 125-137

Sitnikova T, Rzhetsky A, Nei M (1995) Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 12:319–333

Sitrit Y, Hadfield KA, Bennett AB, Bradford KJ, Downie AB (1999) Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol* 121: 419–42.

Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11806–11811

Takuma Sano, Mamoru Nishimoto, Wataru Saburi, Atsuo Kimura, Hiroshi Yasuda, Masahiro Uchibatake, Takuji Ohwada; Hiroshi Masuda. Isolation and characterization of cDNA encoding P-19.5 protein accumulated preferentially at early stage of carrot somatic embryogenesis. 2004. 167:1211-1217. *Plant Science*

Tamura K, Nei M, Kumar S (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method. *Proc Natl Acad Sci USA*;101:11030-11035.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J.(1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 22, p.4673–4680.

VAN LOON LC; REP M; PIETERSE CMJ. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.

Vander Jagt DL, Hassebrook RK, Hunsaker LA, Brown WM, and Royer RE (2001) Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chem Biol Interact* 130 –132:549 –562

Vieira, L. G. E.; Andrade, A. C.; Colombo, C. A.; Moraes, A. H. A.; Metha, A.; Oliveira, A. C.; Labate, C. A.; Marino, C. L.; Monteiro-Vitorello C. B.; Monte, D. C.; Giglioti, E.; Kimura, E. T.; Romano, E.; Kuramae, E. E.; Lemos, E. G. M.; Almeida, E. R. P.; Jorge, E. C.; Albuquerque, E. V. S.; Silva, F. R.; Vinecky, F.; Sawazaki, H. E.; Dorry, H. F. A.; Carrer, H.; Abreu, I. N.; Batista, J. A. N.; Teixeira, J. B.; Kitajima, J. P.; Xavier, K. G.; Lima, L.M.; Camargo, L. E. A.; Pereira, L. F. P.; Coutinho, L. H.; Lemos, M. V. F.; Romano, M. R.; Machado, M. A.; Costa, M. M. C.; Sá, M. F. G.; Goldman, M. H. S., Ferro, M. I. T.; Tinoco, M. L. P.; Oliveira, M. V.; Sluys, M. V.; Shimizu, M. M.; Maluf, M. P.; Eira, M. T. S.; Filho, O. G.; Arruda, P.; Mazzafera, P.; Mariani, P. D. S. C.; Oliveira, R. L. B. C.; Harakava, R.; Balbao, S. F.; Tsai, S. M.; Mauro, S. M. Z.; Santos, S. N.; Siqueira, W. J.; Costa, G. G. L.; Formighieri, E. F.; Carazzolle, M. F.; Pereira, G. A. G. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.18, n.1, p.95-108. 2006

Vincent, J. L.; Knox, M. R.; Ellis, T. H. N.; Kaló, P.; Kiss, G. B.; Brewin, N. J. Nodule-expressed Cyp15a cysteine protease genes map to syntenic genome regions in *Pisum* and *Medicago* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2000 Vol. 13 No. 7 pp. 715-723

Yadav SK, Singla-Pareek SL, Ray M, Reddy MK, Sopory SK. 2005. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337, 61–67

Yamamoto K, Sasaki T. 1997. Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Mol Biol*. 35(1-2):135- 144.

Zakharov et al, 2004 A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, No. 406, pp. 2241–2249, October 2004

Zimmerman, L. J. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411–1423.

Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G. and Chua, N.H. (2002) The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant J.* 30, 349–359