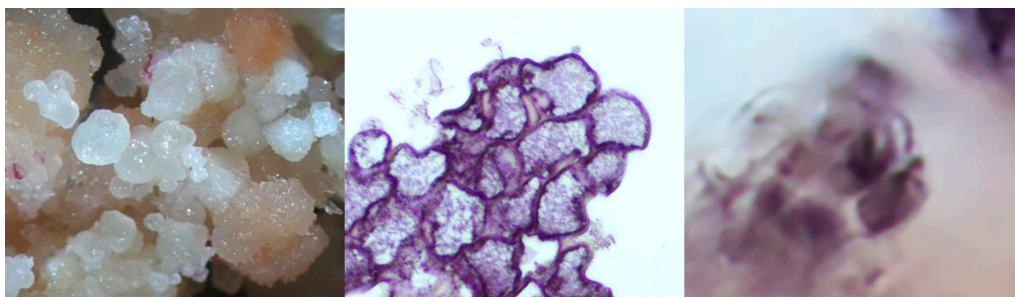


Metodologia para identificação rápida de regiões embriogênicas em culturas de células em suspensão de *Brachiaria brizantha* (A.Rich.) Stapf (syn. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A.Rich.) R.D. Webster)



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento  
375**

Andrea Dias Koehler  
Glauca Barbosa Cabral  
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes  
Vera Tavares de Campos Carneiro  
Adriana Pinheiro Martinelli  
Diva Maria de Alencar Dusi

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Brasília, DF  
2021**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Parque Estação Biológica  
PqEB, Av. W5 Norte (final)  
70970-717, Brasília, DF Fone:  
+55 (61) 3448-470  
Fax: +55 (61) 3340-3624

www.embrapa.br www.embrapa.br/fale-conosco/  
sac Comitê Local de Publicações da Unidade  
Responsável

Presidente  
*Wagner Alexandre Lucena*

Secretária-Executiva  
*Daniela Aguiar de Souza*

Membros  
*Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes; Andrielle  
Camara Amaral Lopes; Bruno Machado Teles Walter;  
Daniela Aguiar de Souza; Debora Pires Paula; Edson  
Junqueira Leite; Márcio Martinello Sanches; Marcos  
Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri  
Jose*

Supervisão editorial  
*Daniela Aguiar de Souza*

Revisão de texto  
*Jakcelia Costa da Silva*

Normalização bibliográfica  
*Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes*

Tratamento das ilustrações  
*Adilson Werneck*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Marcus Vinicius Pereira e Souza*

Foto da capa  
*Diva Maria de Alencar Dusi*

1ª edição  
1ª impressão (ano): tiragem

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Nome da unidade catalogadora

---

Metodologia para identificação rápida de regiões embriogênicas em culturas de células  
em suspensão de *Brachiaria brizantha* (A.Rich.) Stapf (Sin. *Urochloa brizantha*  
(Hochst. Ex A.Rich.) R.Webster). / Andrea Dias Koehler et al. – Brasília, DF:  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021.

21 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia, 375).

ISSN: 0102-0110

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader (PDF)

Modo de Acesso: World Wide Web

1. Hibridização in situ. 2. *Whole mount*. 3. Suspensão celular. 4. *Brachiaria*. I.  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. II. Série.

575.21 – CDD 21

## Sumário

---

Resumo .....	6
Abstract .....	7
Introdução.....	8
Material e Métodos .....	9
Resultados e Discussão .....	15
Conclusões.....	18
Referências .....	19



# Metodologia para identificação rápida de regiões embriogênicas em culturas de células em suspensão de *Brachiaria brizantha* (A.Rich.) Stapf (syn. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A.Rich.) R.D. Webster).

Andrea Dias Koehler<sup>1</sup>

Glauca Barbosa Cabral<sup>2</sup>

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes<sup>3</sup>

Vera Tavares de Campos Carneiro<sup>4</sup>

Adriana Pinheiro Martinelli<sup>5</sup>

Diva Maria de Alencar Dusi<sup>6</sup>

**Resumo** – A hibridização *in situ* é uma técnica utilizada no estudo da localização da expressão de genes em diversas espécies. Em plantas de *Brachiaria*, o gene *SERK* é considerado como marcador de embriogênese somática, uma vez que se expressa em células que apresentam potencial embriogênico. Este marcador pode ser muito útil no aperfeiçoamento de metodologias para o cultivo *in vitro* de *Brachiaria* spp., visando a transformação genética de espécies cultivadas. Pode também contribuir no desenvolvimento de processos mais rápidos de detecção do momento e local de aquisição do potencial embriogênico de culturas celulares de *Brachiaria brizantha*.

Nesse trabalho, apresentamos a utilização da metodologia de *whole mount* para a rápida confirmação e localização da expressão de *SERK* em agregados celulares e calos embriogênicos advindos de células em suspensão cultivadas *in vitro*, permitindo identificar células e regiões com potencial embriogênico em culturas celulares de *B. brizantha*.

Termos para indexação: hibridização *in situ*, *whole mount*, suspensão celular, *Brachiaria*.

---

<sup>1</sup> Bióloga, doutora em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, SP. +

<sup>2</sup> Engenheira agrônoma, doutora em Biologia na Agricultura, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>3</sup> Bióloga, mestre em Produção Vegetal, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>4</sup> Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular Vegetais, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>5</sup> Engenheira agrônoma, doutora em *Plant Sciences*, professora do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, SP.

<sup>6</sup> Engenheira agrônoma, doutora em *Plant Sciences*, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

## Methodology for rapid identification of embryogenic regions in cell suspension cultures of *Brachiaria brizantha* (A.Rich.) Stapf (syn. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A.Rich.) R.D. Webster.

**Abstract** - In situ hybridization has been used to study gene expression in many species. In *Brachiaria* plants, the *SERK* gene is used as an embryogenesis marker, being expressed in cells that acquire the embryogenic potential. This marker can be useful during the development of new in vitro tissue culture methodologies for *Brachiaria* spp. aiming at the genetic transformation of cultivars. It can also contribute to the development of quick processes to detect the moment and place of acquisition embryogenic potential in *Brachiaria brizantha* cell cultures. Here we present a *whole mount* in situ hybridization methodology for the rapid localization of *SERK* expression in cell aggregates and calluses from in vitro cell suspension cultures.

Keywords: In situ hybridization, whole mount, cell suspension, *Brachiaria*

# 1. Introdução

---

No estudo de função de genes envolvidos nos diversos processos biológicos são utilizadas várias estratégias como: sequenciamento de RNA, DNA em larga escala, análises de genomas e transcritomas por bioinformática, caracterização molecular dos genes, transformação genética de plantas, quantificação e localização da expressão dos genes e proteínas, entre outras. Para a localização da expressão de genes, de modo preciso, em células e tecidos, as metodologias de hibridização *in situ* são de grande importância. Dentre as várias técnicas de hibridização *in situ*, aquela que utiliza sonda de RNA marcada com digoxigenina tem sido a mais utilizada. Isto por ser esta uma marcação não radioativa, podendo ser utilizada em laboratórios que não possuem cadastro para uso de radioisótopos. Entretanto, para o uso dessa técnica, os laboratórios devem ter um mínimo de infraestrutura para desenvolvimento de experimentos utilizando cultura de tecidos, biologia molecular e microscopia ótica. É essencial, por exemplo, manter a integridade do RNA e, portanto, o trabalho deve ser realizado em condições livres de RNAses nas soluções e materiais a serem utilizados, incluindo o material biológico (Dusi, 2015).

Resumidamente, a técnica de hibridização *in situ* em secções semifinas inclui as seguintes etapas: - fixação do material vegetal; desidratação do material; infiltração em matriz como parafina, mistura de parafina com poli-isobutileno, Paraplast®, ou resina butil metil metacrilato (BMM); seccionamento; deposição e adesão das secções em lâminas de vidro para microscopia; remoção da matriz de infiltração. As lâminas são então submetidas ao processo de hibridização *in situ* (Dusi, 2015). Todo o processo que engloba da infiltração ao seccionamento é trabalhoso e consome considerável tempo.

A metodologia de *whole mount*, a qual não inclui etapas de infiltração do material em resina, polimerização, seccionamento e remoção da resina, é considerada uma alternativa mais rápida à metodologia de hibridização em material seccionado, podendo ser otimizada para localização da expressão de genes em embriões, raízes, hipocótilos, folhas e outros (Hejátko et al., 2006). De modo geral, essa técnica inclui a fixação de amostras e etapas de permeabilização do tecido, utilizando agentes que permitam o acesso da sonda ao mRNA retido nos tecidos. Entre esses agentes estão a proteinase K, que digere proteínas expondo os ácidos nucleicos, e é frequentemente utilizada até mesmo em secções de tecidos (Schmidt, 1996; Wójcik, 2018), os ácidos (Lewis; Wells, 1992), detergentes e álcoois (Schmidt, 1996).



A hibridização *in situ* tem sido utilizada para compreender o processo reprodutivo (Dusi, 2001; Alves et al., 2007, Ferreira et al., 2018) e a embriogênese somática de *Brachiaria* (Koehler et al., 2020). A embriogênese somática envolve o cultivo de células ou tecidos somáticos *in vitro*, a indução de competência embriogênica e a formação de embriões somáticos. O gene *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE, SERK*, vem sendo detectado em várias espécies (Hecht et al., 2001; Koehler et al., 2020; Oliveira et al., 2017; Rocha et al., 2016; Schmidt et al., 1997; Singla et al., 2009; Somleva et al., 2000) como um marcador do processo de embriogênese somática. A localização de transcritos de *SERK* por hibridização *in situ* permite identificar células com capacidade embriogênica e redirecionar o encaminhamento de etapas da cultura *in vitro*, visando à regeneração de plantas. Em *Brachiaria* a expressão de *SERK* foi observada por hibridização *in situ*, em algumas células específicas de ovários e anteras (Dusi, 2001; Koehler et al., 2020), em calos embriogênicos e embriões somáticos provenientes do cultivo *in vitro* de sementes maduras (Koehler et al., 2020).

Neste trabalho, visando estabelecer uma forma mais simples de rastreamento de células com potencial embriogênico, comparamos os resultados de experimentos de hibridização *in situ* de *BbrizSERK*, em agregados celulares embriogênicos e calos de *B. brizantha* vindos de cultura de células em suspensão, infiltrados em BMM e seccionados, com experimentos utilizando a técnica de hibridização do tipo *whole mount*. Os resultados da hibridização *in situ* são apresentados e mostram a viabilidade do uso da hibridização via *whole mount* nesse sistema.

## 2. Material e Métodos

---

### 2.1 Material Vegetal

---

Sementes maduras de *B. brizantha* (syn. *Urochloa brizantha*) cv. Marandu, BRA 000591 foram gentilmente cedidas pela Embrapa Gado de Corte, Campo Grande - MS, Brasil. Suspensões celulares foram obtidas a partir de calos advindos da inoculação de sementes descascadas em meio sólido de indução de embriogênese e cultivados *in vitro*, posteriormente transferidos para meio líquido segundo protocolo descrito por Cabral et al. (2015).

## 2.2 Infiltração em historesina

---

Com a finalidade de observar a morfologia dos agregados celulares e calos, amostras com 15 dias em meio de cultura foram coletados e fixados em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% e  $\text{CaCl}_2$  0,001 M em solução contendo cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2. Inicialmente, foi aplicado vácuo por 1 h e em seguida a solução fixadora foi trocada por nova solução e as amostras mantidas por aproximadamente 36 h a 4 °C. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica (de 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%) e infiltradas em Historesin, Leica. Secções histológicas de 5  $\mu\text{M}$  foram obtidas em micrótomo rotativo e coradas com azul de toluidina 0,05% para análise estrutural. As secções foram montadas em resina sintética Entellan ®(MER-CK), cobertas com lamínula e analisadas em microscópio óptico Zeiss Axioskop2 HBO 100 w/2.

## 2.3 Fixação do material vegetal para hibridização in situ

---

Agregados celulares, de células em suspensão com 15 dias em meio de cultura, foram coletados e imersos imediatamente em solução fixadora contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,25% em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0. As amostras foram mantidas sob vácuo por 1 h após cada troca à temperatura ambiente. A solução fixadora foi renovada e as amostras foram mantidas a 4 °C por 18 h. As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0 e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50% e 70%), por 1h após cada troca. Parte do material foi destinada à infiltração em resina e parte foi mantida a -20 °C para hibridização do tipo *whole mount*.

## 2.4 Infiltração em resina BMM e seccionamento

---

Os agregados celulares mantidos em etanol 70% foram desidratados em série etílica (80%, 85%, 90% e 95%), seguido por etanol puro por três períodos de 1 h cada. A infiltração ocorreu em séries crescentes de etanol:BMM por pelo menos 4 h cada etapa em cada proporção: 5:1, 5:2, 5:3, 5:4; 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5; v/v, seguida por 24 h em BMM puro, três trocas. As amostras foram colocadas em cápsulas plásticas contendo BMM, e polimerizadas por 48 h, a -20 °C, sob luz ultravioleta (15 watts) e em seguida mantidas a 4 °C. Secções de 4  $\mu\text{m}$  foram obtidas em ultramicrótomo Leica Ultracut-UCT e colocadas sobre gotas de água livre de RNAses, em lâminas de microscopia Probe On TM PLUS (Fischer Science Scientific). As secções foram esticadas com vapor de clorofórmio e as lâminas mantidas por 1 h a 60 °C. As lâminas foram guardadas a 4 °C até o momento do uso. Antes da hibridização o BMM foi removido por duas incubações de 15 min em acetona pura, seguido por 10 min em acetona: água tratada

com DEPC (1:1, v/v) e duas vezes em água tratada com DEPC (10 min).

## 2.5 Síntese da sonda de *SERK* marcada com digoxigenina

Um fragmento de 456 pb de uma região conservada que codifica o domínio Ser-Pro-Pro (SPP), específico de *SERK* e ausente nas demais proteínas LRR quinases, o domínio transmembrana e parte do domínio quinase foi utilizado como molde para a sonda. Iniciadores específicos flanqueando essas regiões, *SERK-F* (5'-CTC-TCAGGAGAGGTGCCATC-3) e *SERK-R* (5'-CACCGCCACCAATGAACCATCT-3'), foram desenhados utilizando o programa Primer 3 ([bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/)). A reação em cadeia da polimerase (PCR) ocorreu num volume final de 25 µL em solução contendo: 50 ng cDNA, 2,5 µL tampão Taq DNA polimerase (Phoneutria) (10x), 1 µL de dNTPs (1 mM ou seja, 0,25 mM cada); 1 µL de cada iniciador (200 nM de cada) e 0,5 µL (2,5 U) de Taq DNA polimerase (Phoneutria). O programa de amplificação usado foi: 94 °C por 1 min e 30 s, seguido por 31 ciclos de 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min e uma extensão final a 72 °C por 4 min. A reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X a 100 V, por 30 min. A região contendo o fragmento amplificado foi recortada do gel e o produto purificado com o kit *Wizard SV gel and PCR clean up* (Promega). O fragmento foi clonado no vetor pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) que foi utilizado para transformação em *E. coli* XL1 blue. A orientação do inserto no vetor, foi confirmada por sequenciamento utilizando os iniciadores universais T7 e SP6.

O plasmídeo contendo o inserto foi utilizado como molde para amplificação da sequência por PCR, utilizando as combinações de iniciadores T7 (*forward*) com iniciador específico *SERK-R* para a sonda senso, e SP6 (*reverse*) com o iniciador específico *SERK-F* para a sonda antisenso. Os produtos das reações de PCR foram purificados em filtros Microcon® (Merck Millipore), quantificados por eletroforese em gel de agarose 1% com o auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Para a síntese da sonda, 1 µg de cada um dos produtos purificados foi utilizado. As sondas de mRNA, senso e antisenso, foram sintetizadas por transcrição *in vitro*, utilizando o *DIG RNA Labeling kit (SP6/T7)* (Roche) de acordo com instruções do fabricante. A concentração da sonda marcada foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % utilizando como padrão de concentração o controle de RNA marcado com digoxigenina (*vial 5*), disponível no kit de marcação. A concentração da sonda foi então ajustada para 10 ng/mL em água, como solução estoque para o preparo da solução de hibridização.

## 2.6 Solução de hibridização

---

Para as duas metodologias de hibridização, 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRLâ) e 60 ng de sonda (senso ou antisense) foram desnaturados a 80 °C por 5 min, e adicionados a 100 µL de tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 300 mM, formamida 50%, EDTA 1 mM pH 8,0; solução de Denhardt 1X).

## 2.7 Hibridização em lâminas contendo secções histológicas

---

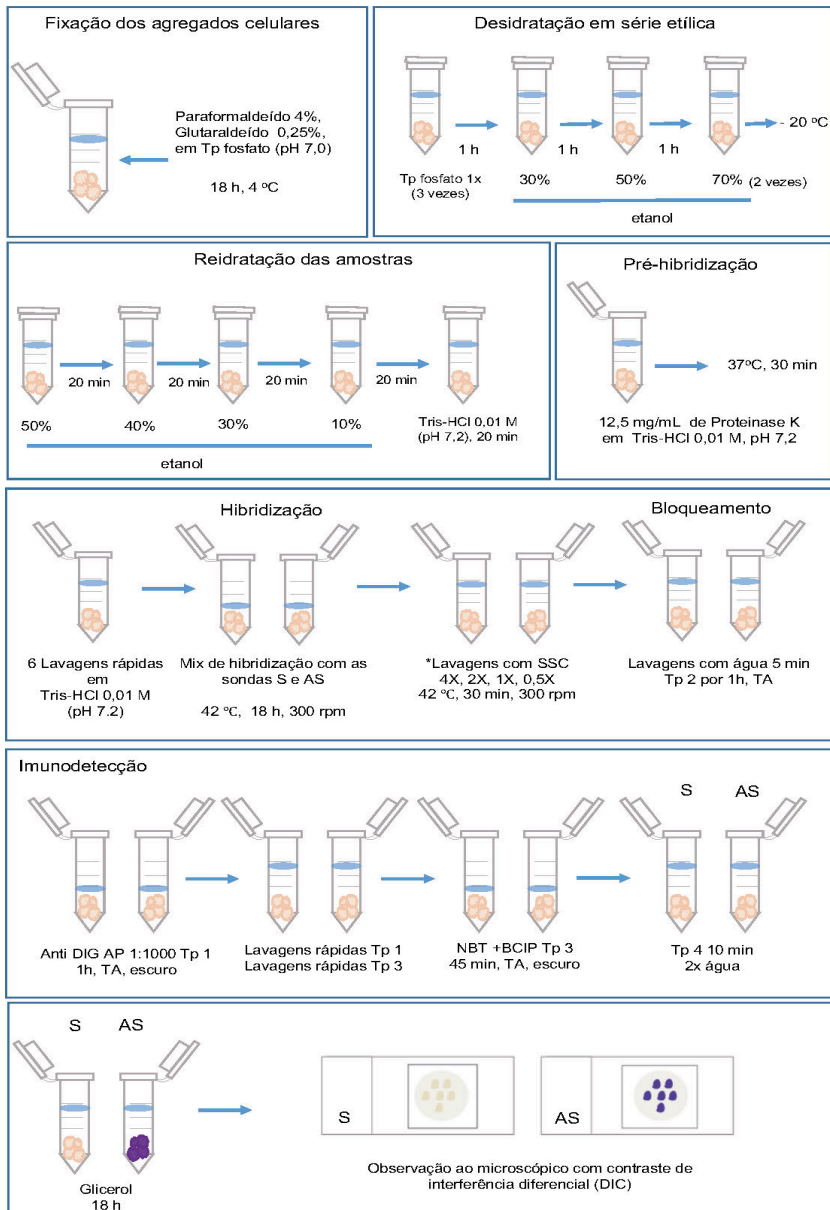
Para a hibridização, 100 µL de solução de tampão de hibridização foram colocados em cada lâmina contendo as secções e cobertas com Parafilm®. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 42 °C, no escuro, por um período de 15 horas. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em solução tampão SSC (Solução-estoque 20x: NaCl 3M; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O 300 mM; pH 7), em concentrações decrescentes de 4x, 2x, 1x e 0,5x, a 37 °C por 30 min cada a 42°C. Em seguida foram lavadas por 5 min em tampão 1 (Tris HCl 0,1M; NaCl 0,15 M, pH 7,5) e incubadas por 30 min em tampão 2 [*Blocking* reagente 1% (Roche), dissolvido em tampão 1] em temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas em tampão 1 por 5 min, e incubadas durante 1 h com anticorpo *Anti-Digoxigenin- AP- Fab Fragments* (Roche) diluído 1:1.000 em tampão 1. O anticorpo livre foi removido por duas lavagens seguidas, de 15 min cada em tampão 1 e uma lavagem de 5 min em tampão 3 (Tris HCl 0,1M; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M, pH 9,5). As secções foram incubadas em 200 µL de solução de coloração contendo 4,5 µL de BCIP (0,05 g/mL) e 4,5 µL de NBT (0,05 g/mL) diluídos em 1 mL de tampão 3, por 45 min, no escuro. Para inativar a reação, as lâminas foram imersas no tampão 4 (Tris-HCl 0,01M; EDTA 1mM, pH 8,0) por 10 min. As lâminas foram montadas em glicerol 50%, examinadas em microscópio de luz Axiophot (Zeiss) e fotodocumentadas com câmera digital (AxioCam lcc3 – Zeiss) e as imagens capturadas com o software Axiovision 4.7 (Zeiss).

## Hibridização in situ do tipo *whole mount*

---

Agregados celulares provenientes de suspensões celulares previamente fixados e armazenados em etanol 70% a -20 °C, foram utilizados. Todo o processo, até a observação ao microscópio, foi realizado em microtubos do tipo Eppendorf de 2,0 mL. As amostras foram reidratadas em série com concentração decrescente de etanol (50%, 40%, 30%, 10%) por 20 min cada e, em seguida, em tampão Tris-HCl (0,01 M, pH 7,0), por 20 min. Posteriormente, as amostras foram tratadas com proteinase K em tampão Tris-HCl pH 7,2 (12,5 mg/mL) a 37 °C, por 30 min. Após seis lavagens rápidas em tampão Tris-HCL (0,01M pH 7,2), 100 µL de solução de hibridização, contendo a

sonda senso ou a sonda antisenso, foram adicionados a cada microtubo. A reação de hibridização ocorreu a 42 °C em Thermomixer (Eppendorf) em rotação de 300 rpm, por 18 h. As amostras foram lavadas pela troca de solução SSC em concentrações decrescentes, 4x, 2x, 1x, 0,5x, por quatro vezes cada, sendo a última etapa de lavagem com cada concentração de 30 min, a 42 °C e, finalmente, imersas em água deionizada por duas vezes, por 5 min. Após as lavagens as amostras foram incubadas por 1 h em tampão 2 [Blocking reagent, (Roche), 1% dissolvido em tampão 1], em temperatura ambiente, e em seguida com anticorpo Anti-digoxigenin- AP- Fab Fragments (Roche) diluído a 1:1.000 em tampão 1, por 1h. Após várias lavagens em tampão 1, as amostras foram mantidas por 5 min em tampão 3 (Tris HCl 0,1M; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M, pH 9,5). A reação de coloração foi feita no escuro em solução contendo 4,5 µL de BCIP (0,05 g/mL) e 4,5 µL de NBT (0,05 g/L) diluídos em 1 mL de tampão 3 por 45 min, e em seguida o material foi incubado em tampão 4, por 10 min, e lavadas quatro vezes em água. As amostras foram imersas em glicerol 100% e mantidas a 4 °C, por 18 h. Os agregados celulares hibridizados foram colocados sobre lâminas com cavidades côncavas, cobertos com lamínulas e observados ao microscópio Zeiss Axiophot, utilizando-se contraste diferencial de interferência (DIC). O resultado foi documentado utilizando câmera digital colorida (AxioCam lcc3 – Zeiss) e as imagens capturadas com o software Axiovision 4.7 (Zeiss). Os passos da hibridização do tipo whole mount são apresentados na Figura 1.



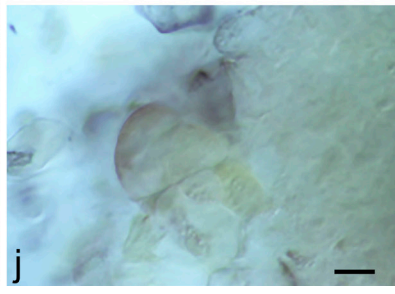
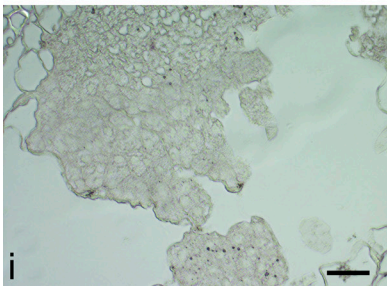
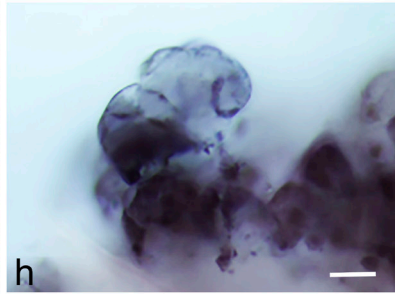
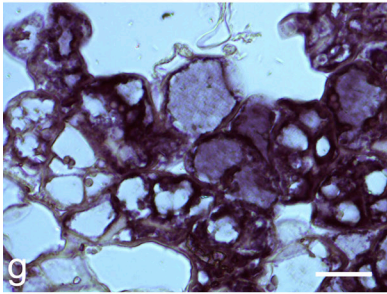
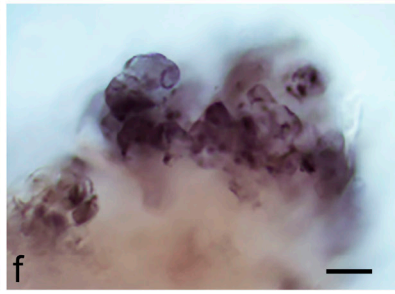
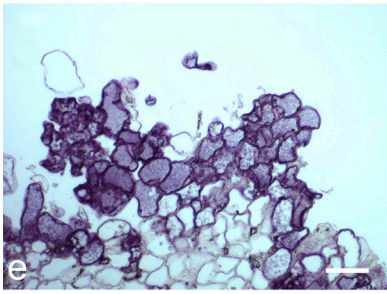
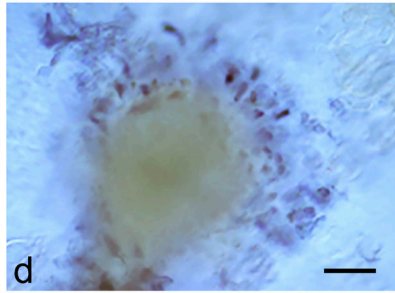
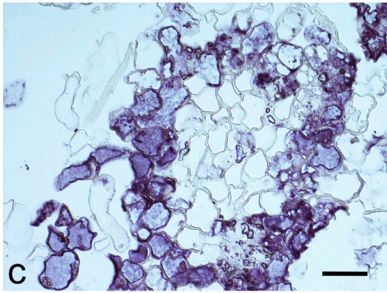
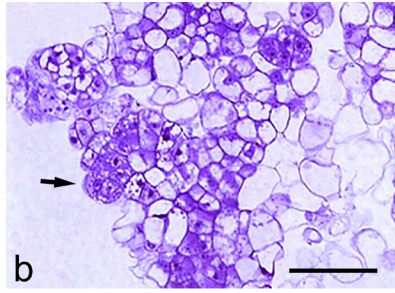
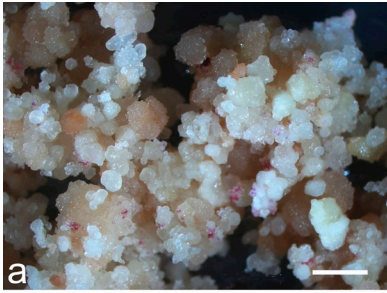
\* antes de cada lavagem de 20 min, é feita lavagem rápida utilizando a pipeta, com SSC na concentração correspondente por 4 vezes.

**Figura 1:** Representação esquemática da hibridização in situ do tipo *whole mount* em agregados celulares e calos embriogênicos. AS = antisense, S = senso, Tp= tampão, TA= temperatura ambiente.

### 3. Resultados e Discussão

---

Agregados celulares embriogênicos provenientes de células em suspensão cultivadas por 15 dias e plaqueados em meio sólido mostram desenvolvimento de massas embriogênicas (Figura 2a). Em secções histológicas coradas com azul de toluidina é possível observar que as massas embriogênicas são constituídas por células pequenas e de citoplasma denso e nucléolos proeminentes, e se apresentam localizadas nas camadas externas dos agregados (Figura 2b). A hibridização *in situ*, conforme descrita acima, com sonda para detecção de transcritos de *SERK* evidenciou, pela coloração azul-violeta, os locais onde as células em cultura foram induzidas à competência embriogênica. Foi feita a comparação entre as duas metodologias, hibridização em secções semifinas de tecido (Figura 2 c, e, g, i) e hibridização do tipo *whole mount* (Figura 2 d, f, h, j). A hibridização *in situ* mostrou que as células das camadas mais externas dos calos apresentaram forte sinal de hibridização, enquanto a região central não apresentou sinal (Figura 2c e 2d). É possível distinguir células com competência embriogênica em cor violeta (Figura 2 e-h). Após hibridizações com a sonda senso, controle negativo, não se detectou sinal de hibridização (Figura 2 i, j). Embora a hibridização em secções histológicas semifinas tenha apresentado maior detalhe dos tecidos e células (Figuras c, e, g, i), os resultados obtidos com a hibridização do tipo *whole mount* (Figuras d, f, h, j) foram muito semelhantes, validando a técnica para o rastreamento da embriogênese somática em *B. brizantha*.





**Figura 2** Hibridização in situ para a localização dos transcritos *BbrizSERK* em agregados celulares provenientes de células em suspensão de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. c, e, g, i) hibridização em secções histológicas semifinas. d, f, h, j) hibridização do tipo *whole mount*. a) Agregados celulares com 15 dias de cultivo e inoculados em meio sólido apresentando desenvolvimento de massas pró-embriogênicas. b) Secção histológica em historesina mostrando as massas pró-embriogênicas com células pequenas de citoplasma denso e nucléolos proeminentes (seta). c, d) Secção histológica (c) e *whole mount* (d) mostrando calos apresentando sinal de hibridização nas células periféricas, e ausência de hibridização nas células centrais dos calos. e, f) Detalhe da periferia dos calos com células marcadas, em secção (e) e *whole mount* (f). g, h) Detalhe das células marcadas em secção (g) e *whole mount* (h). i, j) secção (i) e *whole mount* (j) após hibridização com a sonda senso, sem sinais de hibridização. Barras a = 2 mm, b = 100  $\mu\text{m}$ , c-f, i = 40  $\mu\text{m}$ , g,h,j = 20  $\mu\text{m}$ .

Como esperado, o gene *SERK* também é expresso no início da embriogênese somática em células em suspensão de *Brachiaria*. Em relação à metodologia utilizada em secções de BMM, na metodologia de *whole mount* aqui apresentada introduzimos a proteinase K, em alta concentração, não tendo sido necessária a utilização de outros agentes permeabilizantes; incrementamos o tempo em solução de bloqueamento e estabelecemos a lavagem pós hibridização em temperatura igual à temperatura de hibridização.

Na hibridização do tipo *whole mount*, o manejo das amostras requer que se troquem as soluções e que, após a hibridização, sejam realizadas lavagens rápidas antes da imersão na solução por maior tempo. Esta metodologia, com obtenção de resultados semelhantes ao encontrado após a hibridização em secções semifinas, se mostrou apropriada para o monitoramento de cultura de células de *Brachiaria*, facilitando as decisões de etapas da cultura in vitro no estabelecimento de novos protocolos. O tempo utilizado com o uso da metodologia de *whole mount* é menor em pelo menos 10 dias do que o tempo utilizado em hibridizações em secções histológicas.

## 4. Conclusões

---

Neste trabalho, o procedimento de hibridização *in situ* utilizando *whole mount* aqui descrito poderá ser utilizado para a detecção do potencial embriogênico de suspensões de células de *Brachiaria*, sem necessidade de etapas de preparo de cortes histológicos, tornando a metodologia mais simples, prática e rápida. A metodologia poderá ser utilizada para acompanhar o estabelecimento de processos de embriogênese somática *in vitro* com potencial de uso em outras espécies e utilizando outras sondas.

## 5. Agradecimentos

---

As autoras agradecem a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, projeto 20.19.03.031.00.00), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Financiamento 001), apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, projeto 476332/2013-3) e bolsas de doutorado (141959/2006-1, ADK), e produtividade em pesquisa (305785/2008-7 e 312602/2019-7, APM).

## 6. Referências bibliográficas

---

ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D.M.A. *In situ* localization of three cDNA sequences associated with the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. **Protoplasma**, Wien, v.231, n.3/4, p. 161–17, 2007

CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; ROSSI, M. L.; SILVA, J. P.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. Plant regeneration from embryogenic callus and cell

suspensions of *Brachiaria brizantha*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 51, p. 369-377, 2015. DOI 10.1007/s11627-015-9690-0.

DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf**. Wageningen: University of Wageningen, 2001. 167 p. Tese Doutorado. Orientador: M.T.M. Willemse. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/174961/1/ID-18767-1.pdf>>. Acesso em: 07 de julho de 2020.

DUSI, D. M. de A. Hibridização in situ para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2.ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 304-327.

FERREIRA, L. G.; DUSI, D. M. A.; IRSIGLER, A. S. T.; GOMES, A.C. M. M.; MENDES, M. A.; COLOMBO, L.; CARNEIRO, V. T. C. *GID1* expression is associated with ovule development of sexual and apomictic plants. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 293–306, 2018. DOI: 10.1007/s00299-017-2230-0

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J. P.; HARTOG, M. V.; SCHMIDT, E. D. L.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S. C. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, n. 127, p. 803–816, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.010324>

HEJÁTKO, J.; BLILOU, I.; BREWER, P.B.; FRIML, J.; SCHERES, B.; BENKOVA, E. *In situ* hybridization technique for mRNA detection in whole mount *Arabidopsis* samples. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1939–1946, 2006. DOI: 10.1038/nprot.2006.333

KOEHLER, A. D.; IRSIGLER, A. S. T.; CARNEIRO, V. T. C.; CABRAL, G. B.; RODRIGUES, J. C. M.; GOMES, A. C. M. M.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. C.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. SERK genes identification and expression analysis during somatic embryogenesis and sporogenesis of sexual and apomictic *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*). **Planta**, Germany v. 252, n. 39, 2020. DOI: 10.1007/s00425-020-03443-w. PMID: 32797317.

LEWIS, F. A.; WELLS, M. Detection of virus in infected human tissue by in situ hybridization. In: WILKINSON, D. G. (Ed.). **In situ hybridization: a practical approach**. Oxford: IRL Press: Oxford University Press, 1992. p. 121-136.

OLIVEIRA, E. J.; KOEHLER, A. D.; ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; PINHEIRO, M. V. M.; MATOS, E. M.; CRUZ, A. C. F.; SILVA, T. C. R.; TANAKA, F. A. O.; NOGUEIRA, F. T. S.; OTONI, W. C. Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Protoplasma**, v. 254, n.5, p.2017–2034, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1089-9>.

ROCHA, D. I.; PINTO, D. L. P.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A.O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C. Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**, v. 253, p. 595–609, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0837-y>

SCHMIDT, E. D. L.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A. J.; DE VRIES, S. C. A Leucine rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v.124, p. 2049–2062, 1997.

SCHMIDT, E. D. L.; HENGEL, A. J. van; VRIES, S. C. de. A rapid method for localizing cell-specific transcripts in plant cell cultures. **Biochemica**, Wageningen, v. 4, p. 25-28, 1996.

SINGLA, B.; KHURANA, J. P.; KHURANA, P. Structural characterization and expression analysis of the SERK/SERL gene family in rice (*Oryza sativa*). **International Journal of Plant genomics**, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1155/2009/539402>

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, p.718–726, 2000.

WÓJCIK, A. M.; MOSIOLEK, M.; KARZ, J.; NODINE, M. D.; GAJ, M. D. Whole Mount in situ Localization of miRNAs and mRNAs During Somatic Embryogenesis in Arabidopsis. **Frontiers in plant science METHODS**, 2018. DOI: [10.3389/fpls.2018.01277](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01277)



---

*Recursos Genéticos e  
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL