



FABIANA COUTO ZANIN

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE MEMBROS DA
FAMÍLIA SAUR DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
DE *Coffea arabica***

LAVRAS – MG

2017

FABIANA COUTO ZANIN

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE MEMBROS DA FAMÍLIA SAUR
DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Coffea arabica***

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.

Prof. Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Co-orientador

LAVRAS – MG

2017

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

Zanin, Fabiana Couto.

Análise de expressão gênica de membros da família SAUR durante a embriogênese somática de *Coffea arabica*. / Fabiana Couto Zanin. - 2017.

45 p. : il.

Orientador(a): Leandro Eugenio Cardamone Diniz.

Coorientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Small auxin-up RNA. 2. Café. 3. RT-qPCR. I. Diniz, Leandro Eugenio Cardamone. II. Paiva, Luciano Vilela. III. Título.

FABIANA COUTO ZANIN

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE MEMBROS DA FAMÍLIA *SAUR*
DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Coffea arabica***

**GENE EXPRESSION ANALYSIS OF MEMBERS OF THE *SAUR* FAMILY DURING
THE SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Coffea arabica***

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

APROVADA em 17 de Abril de 2017

Dr. Horllys Gomes Barreto

UFT

Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

EMBRAPA

Prof. Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Co-orientador

LAVRAS –MG

2017

Aos meus pais, Cláudia Helena e Fernando, por nunca medirem esforços para que meus sonhos se tornassem realidade, por me darem força para levantar quando eu caía e pelo exemplo diário de determinação, honra e amor.

DEDICO

RESUMO

Tendo em vista a importância do processo de embriogênese somática para a obtenção em larga escala de embriões produtivos selecionados e para pesquisas de melhoramento genético, o presente trabalho objetivou-se por caracterizar os genes *SAUR* em *Coffea canephora* e analisar a expressão gênica de alguns membros da família durante a embriogênese somática, além de especular suas possíveis funções. A análise *in silico* da família gênica foi realizada a partir da comparação de proteínas *SAUR* já caracterizadas em outras espécies com sequências de café distribuídas no banco de dados Coffee Genome Hub, que passaram por análise de redundância e presença do domínio conservado característico dos genes. Foi construída uma biblioteca de transcritos de *C. arabica* a partir de amostras de cDNA de calos não embriogênicos (CNE), calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (ECS) sequenciadas, onde foram identificados genes *SAUR* diferencialmente expressos. O perfil de expressão foi então analisado por RT-qPCR em amostras de *C. arabica*. Em *C. canephora* foram encontrados 31 membros da família *SAUR*, destes, 8 encontraram-se diferencialmente expressos nas bibliotecas sequenciadas e o perfil dos genes *SAUR5*, *12*, *13*, *18* e *20* foram analisados *in vivo* no presente trabalho. Ainda são necessários estudos mais aprofundados para determinar as funções de cada um dos genes analisados durante a embriogênese somática, mas os resultados obtidos parecem estar de acordo com outros estudos de que os genes *SAUR* são induzidos por auxina e estão, em grande parte, envolvidos com expansão e alongação celular.

Palavras chave: Small auxin-up RNA. Café. RT-qPCR. RNA-seq.

ABSTRACT

Considering the importance of the somatic embryogenic process for a large-scale production of selected embryos and for genetic improvement research, the present work aimed to characterize the SAUR genes in *Coffea canephora* and to analyze the transcriptomic profile of some of its members during somatic embryogenesis, additionally to speculate their functions. A *in silico* analysis of the genic family was performed by comparison of protein data of previously characterized SAURs in other species with the Coffee Genome Hub database, the sequences obtained went through redundancy and conserved domains analysis. A library of *C. arabica* transcripts was constructed from non-embryogenic callus (CNE), embryogenic callus (EC) and cell suspensions (ECS) cDNA sequenced samples, where differentially expressed SAUR genes were identified. The expression profile was analyzed by RT-qPCR in samples of *C. arabica*. 31 members of the SAUR family were found in coffee, of which, 8 were found to be differentially expressed in the sequenced libraries. The profile of SAUR5, 12, 13, 18 and 20 genes were analyzed *in vivo* in the present work. Further studies are needed to determine the functions of each of the genes analyzed during somatic embryogenesis, but the results seem to be in agreement with other studies, where SAUR genes are auxin-induced and are largely involved with expansion and cell elongation.

Keywords: Small auxin-up RNA. Coffee. RT-qPCR. RNA-seq.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	6
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1.	Aspectos econômicos do cafeeiro	7
2.2.	Cultura de tecidos vegetais e a embriogênese somática (ES).....	9
2.3.	Genes SAUR (<i>Small auxin-up RNA</i>).....	13
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1.	Análises <i>in silico</i> da família SAUR em <i>C. canephora</i>	15
3.2.	Construção de bibliotecas RNA-Seq, sequenciamento e análise de dados	16
3.3.	Embriogênese somática	16
3.4.	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	17
3.5.	RT-qPCR	18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1.	Caracterização <i>in silico</i> de genes da família SAUR em <i>Coffea canephora</i>	19
4.2.	Perfil de expressão gênica	24
4.2.1.	Perfil de expressão do gene <i>CcSAUR5</i>	25
4.2.2.	Expressão do gene <i>CcSAUR13</i>	28
4.2.3.	Expressão do gene <i>CcSAUR20</i>	29
4.2.4.	Expressão dos genes <i>CcSAUR12</i> e <i>CcSAUR18</i>	32
5.	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS	35
	APÊNDICE A – Dados Suplementares	41

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das principais *commodities* no âmbito mundial, tendo, atualmente, o Brasil como maior produtor e exportador do grão. Apesar de existirem mais de 100 espécies catalogadas, duas são consideradas as principais para a produção: *Coffea canephora* e *Coffea arabica* (LOYOLA-VARGAS et al., 2016).

No ano de 2016 o Brasil produziu mais de 50 milhões de sacas (60kg) de café, apesar de os agricultores enfrentarem dificuldades que causam perdas na produção como seca, geadas, toxicidade química do solo, pragas e doenças (DE CARVALHO et al., 2013). Tais fatores poderiam ser minimizados pelo desenvolvimento e uso de genótipos de café resistentes aos mesmos.

Por ser uma cultura perene, a seleção de cafeeiros mais produtivos ou tolerantes a diferentes estresses pode levar de 30-35 anos, tempo correspondente a seis ou sete ciclos de autopolinização, além do tempo necessário para a produção em massa de tais genótipos selecionados (LOYOLA-VARGAS et al., 2016). Porém, com a associação de técnicas biotecnológicas, como a indução e multiplicação de embriões *in vitro*, esse período pode ser reduzido e o rendimento aumentado.

Uma das técnicas utilizadas para produção em massa de plantas resistentes e pré-selecionadas é a embriogênese somática, realizada em condições controladas (*in vitro*) e com grande potencial de multiplicação (PRIYONO et al., 2010). Embriões podem ser obtidos pelas vias direta e indireta da embriogênese, muito estudadas também para aplicação de melhoramento de plantas por engenharia genética.

O estudo mais aprofundado dos fatores bioquímicos, físicos e moleculares que determinam a embriogênese somática de diferentes espécies pode auxiliar a obtenção de embriões em períodos mais curtos, tornando a técnica ainda mais vantajosa.

O potencial embriogênico de células vegetais envolve a expressão de diversos genes, entre eles, os genes *SERK*, *BBM*, *WUS*, por exemplo, e *SAUR* que foram identificados pela primeira vez em soja por McClure e Guilfoyle (1989) e, desde então, genes homólogos têm sido caracterizados em outras espécies.

Compreender melhor a função dos genes *SAUR*, conhecidamente induzidos por auxina na produção de embriões *in vitro* de café em larga escala, pode auxiliar a otimização do processo tanto pela manipulação da expressão do gene de forma a favorecer a indução

quanto pelo estabelecimento de marcadores moleculares que auxiliem na seleção de materiais com maior potencial embriogênico.

Com esse trabalho, objetivou-se caracterizar essa família gênica em *C. canephora* e, então, analisar a expressão gênica de alguns membros durante a embriogênese somática de *C. arabica* por técnicas de RT-qPCR, visando melhor compreender o envolvimento dos mesmos no processo de embriogênese somática na espécie.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos econômicos do cafeeiro

Atualmente, o café apresenta-se como uma das principais commodities no mercado mundial tendo valor agregado inferior apenas ao do petróleo. Apesar de existirem mais de 100 espécies já descobertas da família Rubiaceae, a produção global de grãos de café está restrita a duas espécies: *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (LOYOLA-VARGAS et al., 2016).

A primeira caracteriza-se por ser a única tetraploide ($2n=44$) e autógama do gênero, oriunda do cruzamento entre *C. canephora* e *C. eugenoides*, além de apresentar grãos com características mais favoráveis para a qualidade de bebida e menores teores de cafeína comparada a variedades da espécie *C. canephora*, que é diploide ($2n=22$) e alógama (BERTHOULY; ETIENNE, 1999).

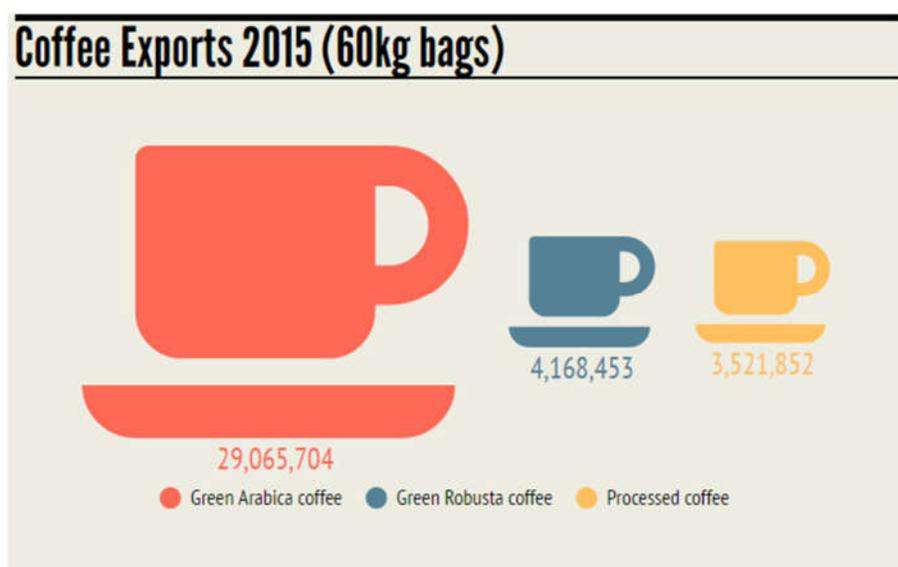
O Brasil é considerado o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2016). Apesar de a produção e a comercialização do café arábica, como é popularmente conhecido, ainda ser predominante, as variedades de *C. canephora*, Robusta e Conilon, vêm ganhando espaço no mercado, sendo utilizados para a produção de café solúvel e blends com variedades de arábica (PRIYONO et al., 2010).

No cenário atual, o Brasil possui mais de 2 milhões de hectares plantados com café, sendo a maioria em produção e uma menor parcela em formação (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016). Nessa área foram produzidas em 2016 cerca de 51 milhões de sacas (60 kg) de grãos de café, correspondendo a quase um terço da produção mundial do mesmo ano. Na safra anterior, foram exportadas mais de 27 milhões

de sacas (60 kg) de café, entre grãos verdes e processados (Figura 1) (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2016).

Mesmo com a produção elevada de café, grandes perdas podem ocorrer devido a fatores abióticos que afetam a cultura como deficiência nutricional, toxicidade química, salinidade, bem como déficit hídrico e temperaturas extremas, que são os fatores que mais prejudicam a produção dos grãos em algumas regiões (DE CARVALHO et al., 2013).

Figura 1 - Exportação brasileira de café arábica e robusta em sacas (60 kg) no ano de 2016.



Fonte: International Coffee Organization (2017).

Em anos com períodos de secas maiores que 3-4 meses, em áreas sem irrigação, pode haver até 80% de perda da produção, pois essa afeta a floração, havendo aborto de frutos em desenvolvimento e até morte da planta (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

Além dos fatores climáticos, fatores bióticos como pragas e doenças afetam o cafeeiro em diferentes níveis. No Brasil, há uma grande preocupação com várias desses fatores como: broca-do-café, bicho-mineiro, ferrugem, cercosporiose, dentre outros. O controle, geralmente, é feito com a utilização de compostos químicos na fase inicial do dano ou pelo plantio de genótipos resistentes (COSTA, 2000; ZAMBOLIM, 1997; ZAMBOLIM, 2016).

Pesquisas com genótipos resistentes surgem com base no estudo e validação de genes de interesse que possam ser utilizados em transformações genéticas a partir da combinação de

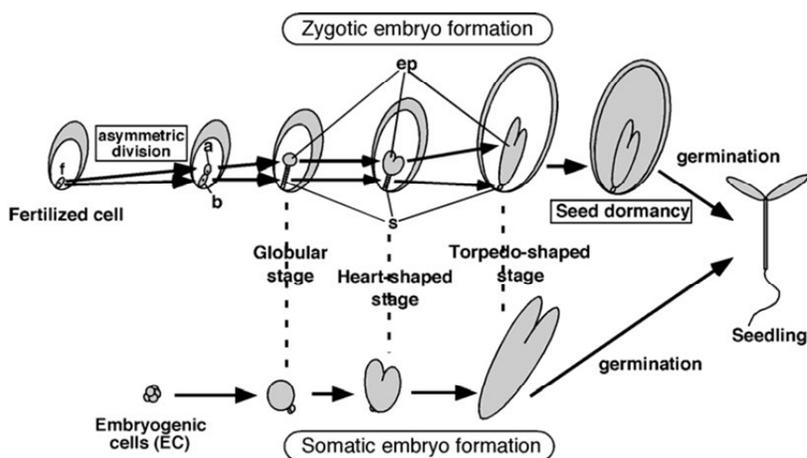
conhecimentos em engenharia genética e multiplicação clonal *in vitro* como a embriogênese somática (ES).

2.2. Cultura de tecidos vegetais e a embriogênese somática (ES)

Os primeiros estudos com embriogênese somática (ES) em cafeeiro foram realizados já na década de 1970 com Staritsky (1970) que obteve embriões de *C. canephora* a partir de segmentos nodais ortotrópicos e plagiotrópicos, e depois com Söndahl e Sharp (1977) os quais desenvolveram um protocolo experimental obtendo calos embriogênicos a partir de explantes foliares de *C. arabica* cv. Bourbon. Desde então, muitos estudos foram realizados na área, porém ainda existem dúvidas a respeito do início do processo.

A ES em cafeeiro pode ocorrer por duas vias diferentes: direta e indireta. Na primeira, os embriões originam-se diretamente dos explantes a partir de um processo de rediferenciação celular (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2002). Na segunda, a partir do explante, origina-se um aglomerado de células desdiferenciadas, de coloração amarela característica, denominadas calos embriogênicos, que se multiplicam até serem estimuladas a se rediferenciar em embriões somáticos (SANTANA-BUZZY et al., 2007), que são considerados similares aos embriões zigóticos quanto à sua morfologia e desenvolvimento (Figura 2)(UMEHARA, et al, 2007).

Figura 2 – Modelo esquemático da formação de embriões zigóticos e somáticos



Fonte: UMEHARA (2007).

Esse processo é baseado no conceito de totipotencialidade, ou seja, na capacidade de uma única célula se multiplicar e formar uma planta completa (ZIMMERMAN, 1993). É importante salientar que nem todas as células são totipotentes, mas sim capazes de tornarem-se totipotentes a partir de estímulos externos e então regenerarem embriões (LOYOLA-VARGAS; OCHOA-ALEJO, 2016).

Dois estágios caracterizam a indução da ES, o de reorganização das células somáticas em diferentes níveis para adquirir características embriogênicas, seguido da expressão da competência, decorrendo na diferenciação em embriões. A segunda fase pode ainda ser subdividida em outras duas, englobando a primeira desde o momento da indução do estímulo até as primeiras mudanças observadas, enquanto a segunda corresponde ao desenvolvimento do embrião (JIMÉNEZ, 2005).

Nos últimos 60 anos, inúmeros estudos auxiliaram o melhor entendimento de fatores que induzem a embriogênese somática por ambas as vias em diversas espécies, mostrando que o uso de reguladores de crescimento em meios de cultura de indução de ES são apenas “a ponta do iceberg”, já que o nível de hormônios endógenos de cada planta deve ser levado em consideração como um fator indispensável para a determinação do potencial embriogênico das células (FEHÉR et al., 2003; GAJ, 2004; JIMÉNEZ, 2005).

Quiroz-Figueroa et al. (2006) desenvolveram um protocolo rápido e eficiente de embriogênese somática direta em *C. canephora* em explantes foliares de plântulas *in vitro*. Segundo o estudo, a carga hormonal da planta é essencial para a resposta e pode ser obtida pelo cultivo de embriões zigóticos em meios de cultura específicos.

Atualmente, sabe-se que há mais de um fator capaz de influenciar a indução da embriogênese somática. O genótipo assim como o estado fisiológico da planta e o tecido usado como explante são de extrema importância e, conseqüentemente, devem ser considerados para a formulação do meio de cultura a ser utilizado (LOPEZ-GOMEZ et al., 2010; NIC-CAN, et al. 2015; PRIYONO, et al. 2010; QUIROZ-FIGUEROA et al, 2001; UMEHARA, et al. 2007).

Além dos reguladores hormonais endógenos e exógenos como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, entre outros, variados estresses como temperaturas extremas, metais pesados, choque osmótico, injúria, radiação UV e déficit nutricional e/ou hídrico também podem ser incorporados ao processo (IKEDA-IWAI et al., 2003; LOYOLA-VARGAS; OCHOA-ALEJO, 2016).

De acordo com Trewavas (1981), a sensibilidade de percepção do tecido vegetal a uma mudança na concentração de um regulador de crescimento é tão importante quanto a própria

concentração. Uma vez que este estímulo é identificado por uma célula somática diferenciada e especializada, será iniciada a transdução do sinal para o núcleo, ativando genes específicos envolvidos na diferenciação que, conseqüentemente, irá desenvolver um novo embrião (LOYOLA-VARGAS; OCHOA-ALEJO, 2016).

Como abordado anteriormente, diferentes fatores são capazes de induzir a ES em diferentes organismos, porém a auxina é considerada o regulador de crescimento mais importante. É suposto que o uso de auxinas exógenas desencadeie a síntese de auxina endógena em tecidos responsivos e o transporte polar de auxina, estabelecendo um gradiente essencial para a iniciação da simetria bilateral (COOKE et al., 1993; FEHÉR, 2008).

Associado ao conhecimento da importância das auxinas nos primeiros estudos de embriogênese somática, surgiu o “paradoxo da auxina”, observou-se que a exposição de calos embriogênicos a concentrações altas de 2,4-D impediu a formação de embriões. Logo, a presença do regulador é necessária para a indução, mas em demasia impede a diferenciação das células somáticas (ALTAMURA et al., 2016; HALPERIN, 1964; HALPERIN; WETHERELL, 1965; LOYOLA-VARGAS; OCHOA-ALEJO, 2016).

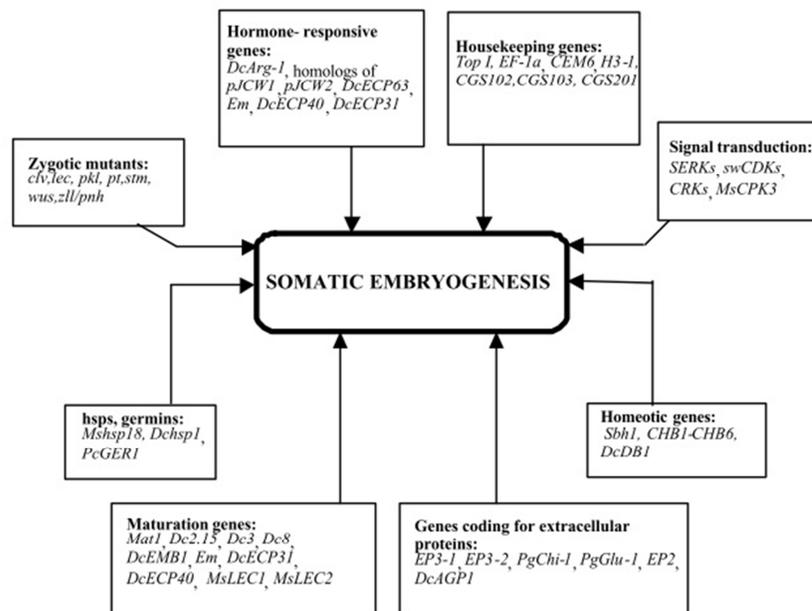
Ao reforçar a influência do genótipo e da relação de hormônios de crescimento, Hatanaka et al. (1991) avaliaram a influência de diferentes citocininas e auxinas na formação de embriões somáticos em *C. canephora*. A partir de explantes inoculados em meio MS modificado, concluíram que as citocininas em uma concentração de 5 μ M foram o fator essencial para a embriogênese direta e que as auxinas não eram necessárias.

Ayil-Gutiérrez et al. (2013) obtiveram embriões somáticos de *C. canephora* ao pré-condicionar plântulas *in vitro* em meio de cultura MS acrescido de NAA e cinetina, em seguida, inocularam explantes foliares em meio contendo BAP. Foi feito o acompanhamento das concentrações de ácido indoleacético (AIA) de amostras no início da pré-incubação até 21 dias após a indução. Os autores identificaram um aumento significativo de AIA, parte pela síntese *de novo*, seguido de um decréscimo rápido causado pela transferência dos explantes para o meio de indução, logo, foi possível concluir que o processo é dependente tanto de auxinas endógenas quanto exógenas. No estudo também foi detectado um aumento de 56 vezes na expressão do gene YUC1, que codifica uma enzima fundamental para a síntese de auxina durante o período de pré-incubação.

Finalmente, para que uma célula somática readquirira a característica de totipotencialidade, são necessárias mudanças ambientais drásticas, gerando mudanças a nível bioquímico, fisiológico, morfológico e molecular. A cada dia mais estudos vêm sendo realizados a fim de se compreender a regulação genética em volta do processo de

embriogênese somática e a resposta gerada pelos efeitos das condições da cultura *in vitro* (Figura 3) (CHUGH; KHURANA, 2002; ELHITI et al., 2013; FEHÉR, 2008; XU et al., 2013; YANG, et al., 2013; YANG, XIYAN et al., 2012; ZENG et al., 2007).

Figura 3 – Representação esquemática de genes identificados e envolvidos no processo de embriogênese somática.



Fonte: CHUNG, A.; KHURANA. P. (2002).

O potencial embriogênico de células vegetais envolve a reprogramação de expressão genética e de diversos fatores de transcrição em diferentes rotas, alguns dos 86 genes já identificados por Yang et al. (2013) em algodão que foram associados ao processo de síntese, transporte, metabolismo e sinalização de auxina, são: *PIN3*, *AUX-LIKE1*, *AUX/IAA*, *ARF*, *YUC*, *SMALL AUXIN UP RNA (SAUR)* e *GH3.17*. Outras famílias gênicas como *SERK*, *GST*, *WUS*, *ECP*, *GLP*, *PKL*, *WRKY*, *CLV*, *MAPK*, *AP2*, *AGP*, *LEA* e *ANT* são conhecidamente envolvidos com a embriogênese somática (RAJESH et al., 2016; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2013; TORRES et al., 2015).

2.3. Genes SAUR (*Small auxin-up RNA*)

A auxina participa de forma significativa na sinalização de diversos processos biológicos de plantas como dominância apical, desenvolvimento de embriões, iniciação e desenvolvimento de raiz, desenvolvimento de frutos e fototropismo, regulando a expressão de muitos genes (NEMHAUSER et al., 2006). Dentre esses, principalmente, famílias de genes de resposta precoce à auxina, que podem ser divididos em três grandes classes: *auxin/indoleacetic acid* (AUX/IAAs), *Gretchen Hagen3* (GH3s) e *SMALL AUXIN UP RNAs* (SAURs) (PARK et al., 2007; WU, J. et al., 2012).

Os genes SAUR foram identificados pela primeira vez em soja por McClure e Guilfoyle (1989) e, desde então, genes homólogos têm sido caracterizados em outras espécies como arroz, *Arabidopsis*, algodão, amora, batata, cânhamo, coco, milho, tomate, rami, sorgo e pepino (CHEN et al., 2014; HUANG et al., 2016; JAIN et al., 2006; MARKAKIS et al., 2013; PARK et al., 2007; RAJESH et al., 2016; WANG et al., 2010; WU, et al., 2014; WU, et al., 2012; XU et al., 2013; YANG, et al., 2012).

Esta família caracteriza-se pela presença de um domínio conservado específico SSD (SAUR specific domain) (CDD superfamília cl03633) de aproximadamente 60 resíduos na região central das proteínas (PARK et al., 2007), pela falta de íntrons na maioria dos genes e por sua resposta rápida, afirma-se que são induzidos de 2 a 5 minutos após o contato com auxina (CHEN et al., 2014). Muitos genes SAUR possuem um elemento conservado (DST) localizado aproximadamente de 30 a 100 pares de bases (pb) downstream à região 3' da UTR composto por três elementos conservados, separados por bases não conservadas de tamanhos variados: (GGA(N)_xATAGAT(N)_xGTA). Acredita-se que esse elemento funcione como um determinante de instabilidade de mRNA em vários membros da família, mas seu modo de ação permanece incerto. Em soja e em milho a meia vida dos transcritos SAUR foi estimada em torno de 10-50 minutos e 7 minutos, respectivamente (KNAUSS et al., 2003; MCCLURE; GUILFOYLE, 1989; NEWMAN et al., 1993; REN; GRAY, 2015; SULLIVAN; GREEN, 1996).

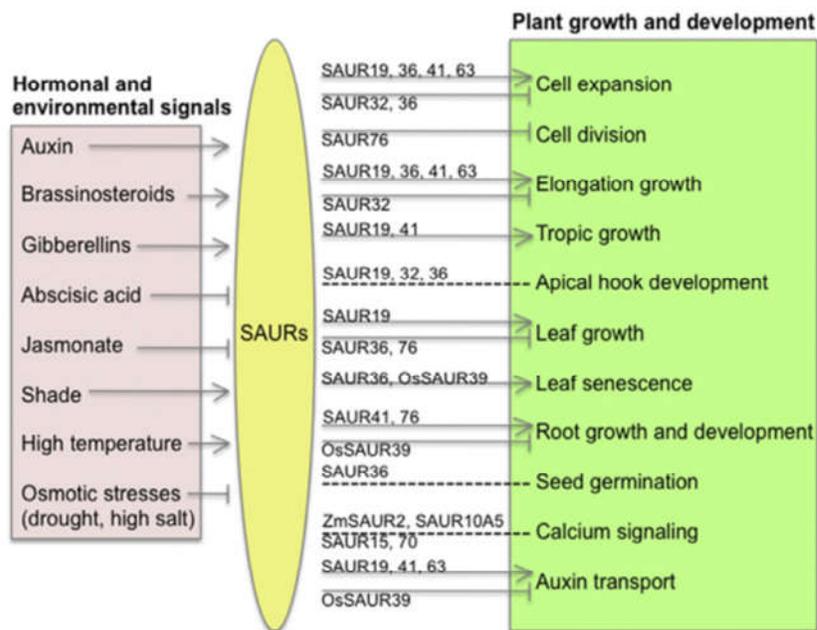
Outra característica encontrada em parte dos genes da família SAUR em espécies distintas foi a presença de elementos responsivos à auxina (AuxREs) na região promotora. Tais elementos estariam presentes em uma ou mais cópia de motifs conservados TGTCTC e/ou GGTCCCAT ou suas variações, com resposta relacionada à auxina (GUILFOYLE;

HAGEN, 2007; JAIN et al., 2006). Em tomate e milho também foram encontrados elementos cis responsivos à Ca^{2+} e de ligação à calmodulina (CGCC) na região promotora, sugerindo que esses genes podem estar envolvidos também com respostas a estresses abióticos (KNAUSS et al., 2003; WU, et al., 2012).

Estudos recentes demonstram que os genes SAUR podem responder a outros reguladores de crescimento como brassinosteroides, giberelinas, jasmonato, ácido abscísico e etileno (Figura 4). Goda et al. (2004) analisaram o perfil de expressão em amostras de *Arabidopsis* tratadas com ambos os reguladores auxina e giberelina e concluíram que das três famílias com resposta precoce à auxina, os genes SAUR tiveram a maior resposta ao tratamento com giberelinas, confirmando a existência de uma interação entre os dois reguladores.

Além da regulação dos genes SAUR por estímulo de outros hormônios, existem cada vez mais evidências do envolvimento destes na resposta a estresses como seca, altas temperaturas, salinidade e patógenos (SHIBASAKI et al., 2009; SOOD; CHAUHAN, 2017; WU, et al., 2012).

Figura 4 – Esquema representativo da integração de sinais hormonais e ambientais para a regulação do desenvolvimento vegetal medida por genes da família SAUR.



Legenda - Setas indicam regulação positiva; linhas indicam regulação negativa e linhas pontilhadas indicam regulação positiva ou negativa.
 Fonte: REN, H.; GRAY, W. (2015)

Apesar de já terem sido caracterizados em diversas espécies, poucos estudos foram realizados quanto à determinação da função de membros dessa família, teoriza-se que a maioria dos membros da família estejam mais intimamente relacionados com alongação e expansão celular (REN; GRAY, 2015). Em *Arabidopsis* as proteínas subfamília SAUR19 (SAUR19-24) atuam como efetores positivos de expansão celular (SPARTZ et al., 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises *in silico* da família SAUR em *C. canephora*

A partir de seqüências de proteínas da família SAUR de *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* e *Oryza sativa* foi efetuada uma análise de *blastp* contra o proteoma de *C.*

canephora. As sequências resultantes foram filtradas quanto à redundância e presença de domínio conservado característico da família.

Com isso, os membros de *C. canephora* foram alinhados por meio do programa ClustalW (THOMPSON, 1994), no software MEGA TAMURA *et al.*, 2013) (<http://www.megasoftware.net/>), para construção de relações filogenéticas por meio do método *Neighbor-joining* (SAITOU e NEI, 1987), com 1.000 replicatas de *bootstrap*.

3.2. Construção de bibliotecas RNA-Seq, sequenciamento e análise de dados

A construção da biblioteca de RNA-Seq single-end das amostras de calos não embriogênicos (CNE), calos embriogênicos (CE) e suspensões celulares (ECS) foi realizada utilizando o kit TruSeq RNA Sample Prep v2 Low Throughput (LT) (Illumina).

Antes do mapeamento, as sequências (*reads*) brutas foram avaliadas quanto à qualidade pelo programa FastQC (ANDREWS *et al.*, 2010). As que exibiram sequências adaptadoras e/ou sequências de baixa qualidade foram removidas utilizando o programa Trimmomatic (BOLGER *et al.*, 2014) com um Phred score de 28. As *reads* com tamanho abaixo de 36 pb também foram removidas após a trimagem. O mapeamento de leitura foi realizado usando o software STAR (DOBIN *et al.*, 2012) e a montagem das reads em transcritos foi feita com auxílio do programa Cufflinks (versão 2.1.1) (TRAPNELL *et al.*, 2012).

Utilizou-se o software Cuffdiff para comparações par a par entre diferentes bibliotecas para identificação de genes diferencialmente expressos (GDE). O programa CummeRbund presente no software estatístico R (R core team, 2014) foi utilizado para a plotagem dos gráficos.

3.3. Embriogênese somática

Calos embriogênicos e não embriogênicos foram obtidos segundo o protocolo de Teixeira *et al.* (2004) a partir de plantas matrizes da cv. Catuaí Amarelo IAC 62 cultivadas em casa de vegetação. As suspensões celulares foram obtidas cultivando calos embriogênicos em frascos de Erlenmeyer contendo meio líquido de multiplicação T3 (VAN BOXTEL;

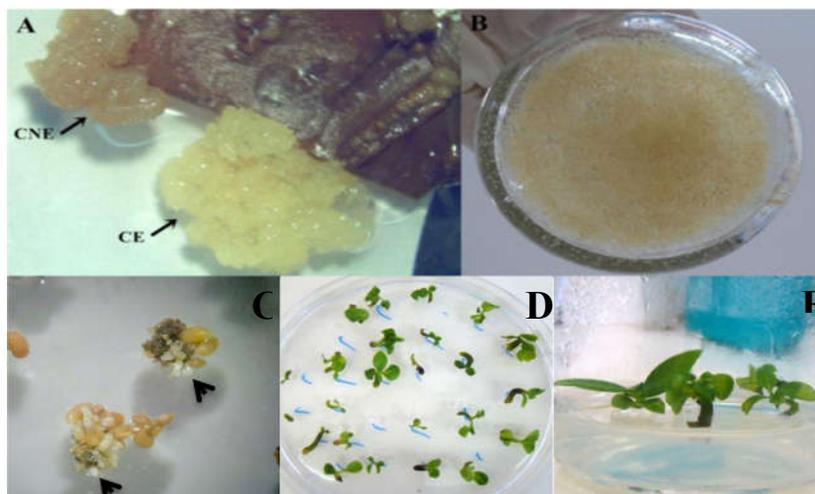
BERTHOULY, 1996) com densidade inicial de biomassa de 10 g L^{-1} de meio (ZAMARRIPA, 1991) havendo renovação total do meio a cada 15 dias de cultivo.

Os frascos foram mantidos em ausência de luz sob agitação orbital a 100 rpm e 25°C por 3 meses. Os embriões foram regenerados a partir de calos embriogênicos cultivados em meio RRH composto por macronutrientes, micronutrientes CaCl_2 e Ferro MS meia força, Tiamina (8g/L), Piridoxina (800mg/L), Ácido nicotínico (800mg/L), Glicina (800mg/L), Prolina (1g/L), Sacarose (15g/L), Maltose (15g/L) e regulador de crescimento BAP (1mg/L). A maturação e germinação dos embriões somáticos foram realizadas em meio T5 (dados não publicados).

3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA a partir de calos embriogênicos e suspensão celular foi realizada utilizando o *Kit NucleoSpin® (Macherey Nagel)* e a extração de calo não embriogênicos, embrião torpedo, embrião cotiledonar e plântula, utilizando *Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen)*(Figura 5). O tratamento das amostras para remoção total de DNA genômico foi realizado com o *Kit Turbo DNA-free (Ambion)*. As concentrações e pureza do RNA foram mensuradas em *Nanovue® Espectrophotometer*. Para a síntese de cDNA foi utilizado o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* a partir de 1000ng de RNA de acordo com a recomendação do fabricante.

Figura 5 – Material vegetal utilizado para extração de RNA e síntese de cDNA



Legenda – Calos embriogênicos (CE) e calos não embriogênicos (CNE) (A); suspensão celular (ECS) (B); embriões no estágio torpedo (C); embriões no estágio cotiledonar (D); plântulas (E).

Fonte – Figuras A e B: FREITAS (2017); Figuras C, D e E: Do Autor (2017).

3.5. RT-qPCR

A partir das sequências obtidas do estudo *in silico*, *primers* foram desenhados utilizando os programas *OligoPerfect™ Designer* (Thermo Fisher Scientific) e *OligoAnalyser 3.1* (Integrated DNA Technologies) (Tabela Suplementar). A eficiência de amplificação das PCRs (E) e o coeficiente de regressão (R^2) foram então determinados para validação dos *primers* através do método da curva padrão, utilizando o conjunto de todas as amostras de cDNA em uma diluição serial de cinco vezes (10^{-1} a 10^{-5}).

As RT-qPCRs foram realizadas no equipamento *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems) em volume total de 10 μ L contendo 200 ng de cDNA, 1X SYBR® Green Master mix (Applied Biosystems) e 1,0 μ M

de cada *primer*. As amplificações seguiram a programação: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e anelamento e extensão por 1 minuto a 60 °C. As curvas de dissociação (*Melting curve*) foram registradas após 40 ciclos para confirmar a especificidade dos *primers* por aquecimento de 60 °C para 95 °C.

Todas as reações foram realizadas com triplicata técnica e biológica. Os dados de expressão foram quantificados relativamente pela fórmula de Pfaffl (2001), a normalização foi feita com a expressão dos genes de referência *24S* e *PP2A* (FREITAS et al., 2017) e foi utilizado como amostra de referência (RQ=1) o calo não embriogênico (CNE) para o gene SAUR5 e suspensão celular (ECS) para os demais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização *in silico* de genes da família SAUR em *Coffea canephora*

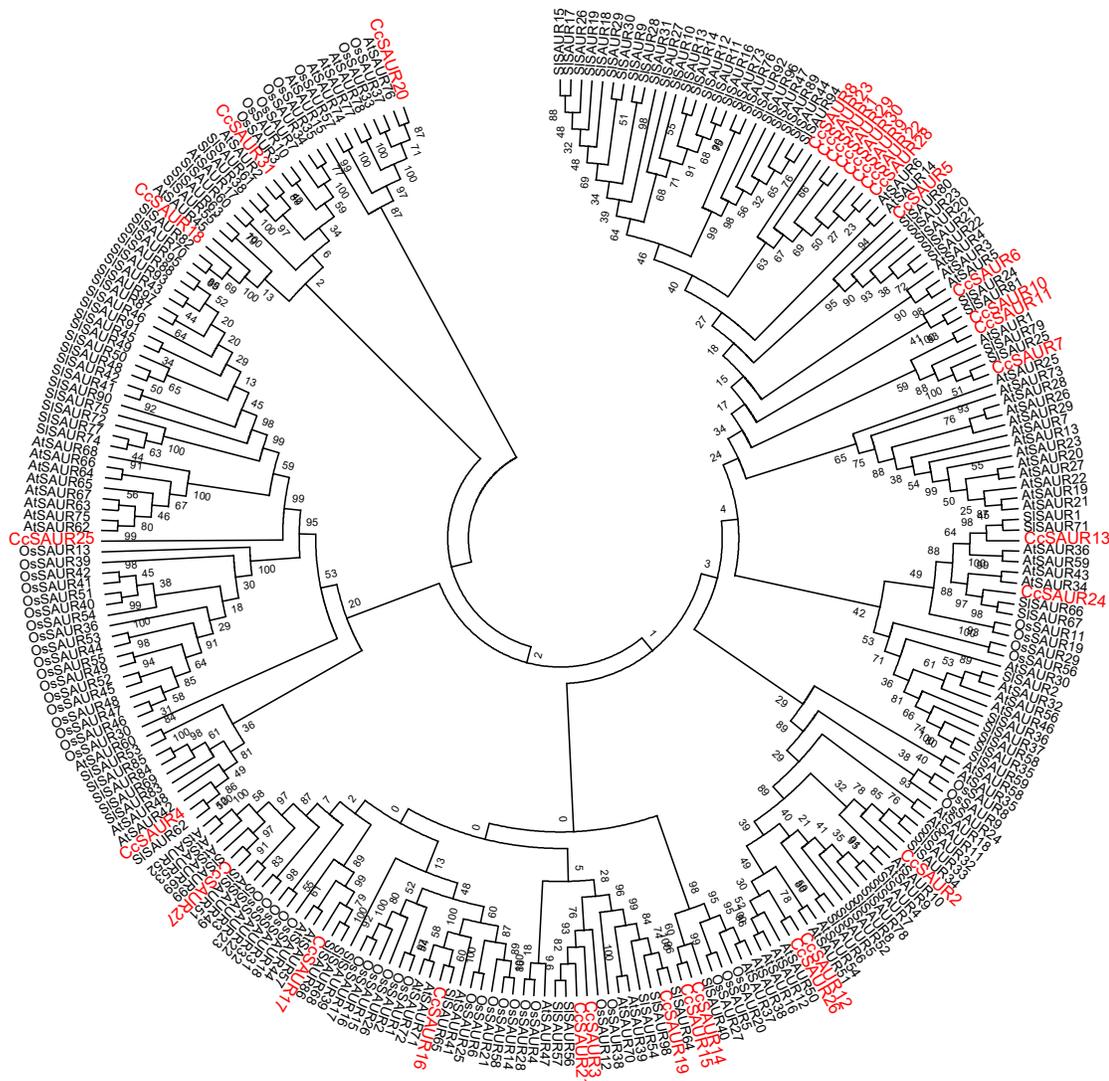
A partir das sequências proteicas disponíveis no banco de dados *Coffee Genome Hub* foram identificados 31 genes com o domínio conservado característico à família SAUR em *C. canephora*. Essa família gênica foi caracterizada pela primeira vez em soja (MCCLURE; GUILFOYLE, 1989), desde então análises genômicas *in silico* foram realizadas em diferentes espécies. Foram identificados 82 genes SAUR em *Arabidopsis*, incluindo dois pseudogenes (HAGEN; GUILFOYLE, 2002), 58 SAURs em arroz, sendo dois pseudogenes (JAIN et al., 2006), 99 e 134 SAURs, respectivamente, em tomate e batata (WU, et al., 2012), 61 genes SAUR em pepino (WU, et al., 2014), 79 SAURs em milho (CHEN et al., 2014), em amora, cânhamo e rami foram identificados 62, 56 e 71 SAURs (HUANG et al., 2016), respectivamente, e 71 genes da família em sorgo (WANG et al., 2010).

Até o momento, *C. canephora* é a espécie que contém o menor número de membros da família SAUR identificados, o que pode ser atribuído à ausência de genes duplicados, como ocorre em tomate, por exemplo, que em estudos filogenéticos apresenta diversos grupos de genes SAUR em clusters na árvore filogenética e também se encontram fisicamente próximos nos cromossomos. As espécies de Solanaceae apresentam as maiores famílias SAUR, sendo especulada uma expansão ao longo de sua evolução, conferindo à família um alto nível de redundância ou funções mais específicas em relação a outras espécies (WU, et al., 2012).

Em uma análise filogenética, comparando as famílias SAUR de cafeeiro *Arabidopsis*, arroz e tomate, foi observado que os genes CcSAUR (*Coffea canephora* SAUR), em sua

maioria, ficaram posicionados em clados separados, com exceção de um cluster contendo oito genes (Figura 6).

Figura 6 – Árvore filogenética contendo os genes *SAUR* de *C. canephora* (em vermelho), tomate, arroz e Arabidopsis.



Fonte – Do Autor (2017)

Os genes encontrados em *C. canephora* foram nomeados em ordem crescente de acordo com a sua localização nos cromossomos. Possuem tamanho médio de 392 pb, sendo o menor o gene *CcSAUR28* (165 pb) e o maior *CcSAUR17* (831 pb). Estes genes codificam proteínas que variam entre 54 e 276 aa, sendo que a média é de 127 aa (Tabela 2). Os genes encontram-se distribuídos em quase todos os cromossomos de *C. canephora*, à exceção do cromossomo 3.

Tabela 2 – Descrição do tamanho dos genes *SAUR* encontrados em *C. canephora* e suas proteínas.

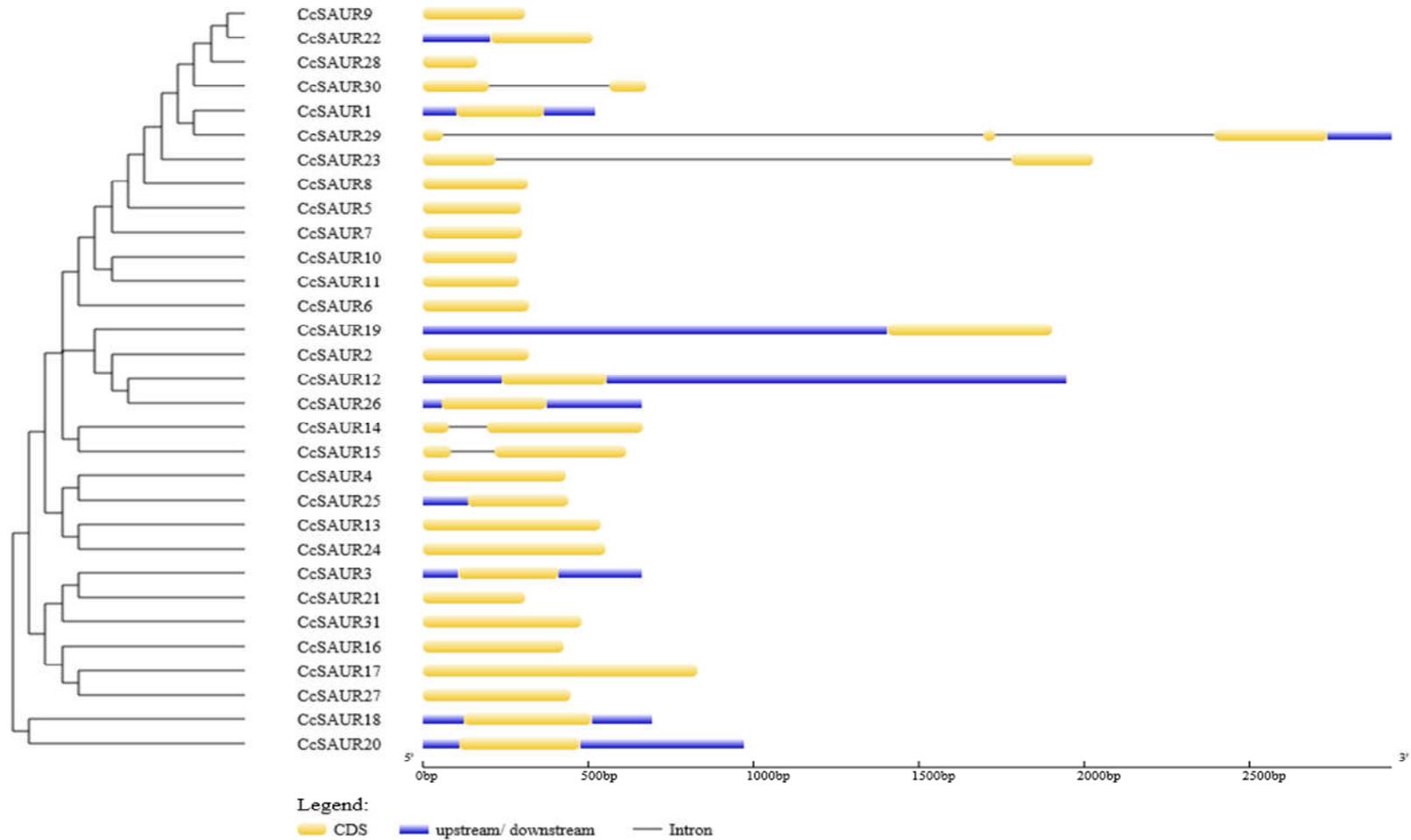
	ID	CDS (pb)	Proteína (aa)
CcSAUR1	Cc00_g22640	480	88
CcSAUR2	Cc00_g26580	321	107
CcSAUR3	Cc00_g29740	303	100
CcSAUR4	Cc01_g10550	432	143
CcSAUR5	Cc02_g16700	297	98
CcSAUR6	Cc02_g16710	321	106
CcSAUR7	Cc02_g16720	300	99
CcSAUR8	Cc02_g16730	318	105
CcSAUR9	Cc02_g16740	309	102
CcSAUR10	Cc02_g16750	285	94
CcSAUR11	Cc02_g16760	291	96
CcSAUR12	Cc02_g16790	318	105
CcSAUR13	Cc02_g24230	537	178
CcSAUR14	Cc02_g4000	549	182
CcSAUR15	Cc04_g00010	483	160
CcSAUR16	Cc05_g16250	426	141
CcSAUR17	Cc06_g04040	831	276
CcSAUR18	Cc06_g06020	387	128
CcSAUR19	Cc06_g12640	498	165
CcSAUR20	Cc06_g12650	366	121
CcSAUR21	Cc07_g19210	309	102
CcSAUR22	Cc08_g08380	309	102
CcSAUR23	Cc08_g08390	468	155
CcSAUR24	Cc08_g12980	552	183
CcSAUR25	Cc09_g10510	312	103
CcSAUR26	Cc10_g01860	318	105
CcSAUR27	Cc10_g01880	447	148
CcSAUR28	Cc11_g04780	165	54
CcSAUR29	Cc11_g04790	438	145
CcSAUR30	Cc11_g04800	312	102
CcSAUR31	Cc11_g17330	480	159

Fonte: Do Autor (2017)

Quanto à região codante e o tamanho de proteínas, há variação entre espécies, como exemplo do milho, em que suas proteínas variam de 79 a 423 aminoácidos. Em espécies da família *Solanaceae*, genes *SAUR* possuem regiões codantes de 171 a 612 pares de bases traduzindo proteínas de 56 a 203 resíduos em tomate, enquanto os genes *SAUR* de batata variam de 134 a 249 pares de bases e suas proteínas têm de 82 a 224aa (CHEN et al., 2014; WU et al., 2012).

Outra característica dos genes *SAUR* já estudados até o momento, que também foi detectada no cafeeiro, é a falta de introns na grande maioria dos membros desta família (Figura 7). Genes desprovidos de introns são, em geral, padrão nos procariotos, o que possibilita que a família *SAUR* seja uma candidata a estudos evolutivos e para comparação genômica (JAIN et al., 2006).

Figura 7 - Representação da estrutura dos genes SAUR de *Coffea canephora*.



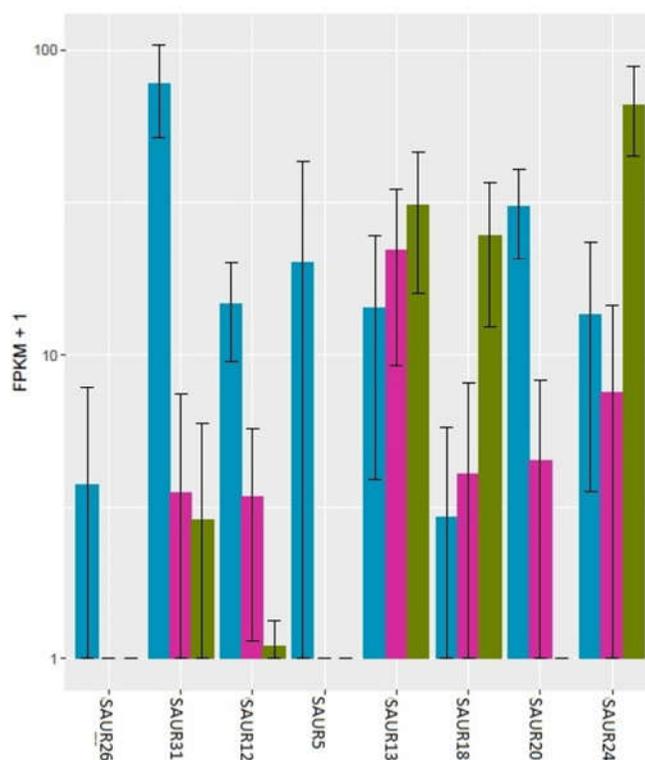
Fonte: Do Autor (2017)

4.2. Perfil de expressão gênica

A partir dos dados obtidos das bibliotecas de calos não embriogênicos, calos embriogênicos e suspensões celulares sequenciadas, foi possível identificar transcritos dos 31 genes *SAUR*, previamente analisados no genoma de *C. canephora*, nas três bibliotecas. Destes, oito encontravam-se diferencialmente expressos entre os tratamentos (Figura 8).

O perfil de expressão gênica *in silico* apresentou padrões diferentes para cada gene, sendo as maiores expressões associadas às bibliotecas de calos não embriogênicos para *CcSAUR31* e em suspensão celular para *CcSAUR24*, enquanto os genes *CcSAUR5*, *20* e *26* exibiram expressão nula em uma ou mais bibliotecas.

Figura 8 – Perfil de expressão gênica de genes *SAUR* *in silico*.



Legenda – Barras azul, rosa e verde correspondem à expressão em calos não embriogênicos, calos embriogênicos e suspensão celular, respectivamente.

Fonte – Do Autor

As análises foram realizadas utilizando os genes *CcSAUR5*, *12*, *13*, *18* e *20*, cujos *primers* amplificaram uma única sequência esperada e ainda apresentaram eficiência entre 93% e 99% (Figuras suplementares 1, 2, 3, 4 e Tabela Suplementar).

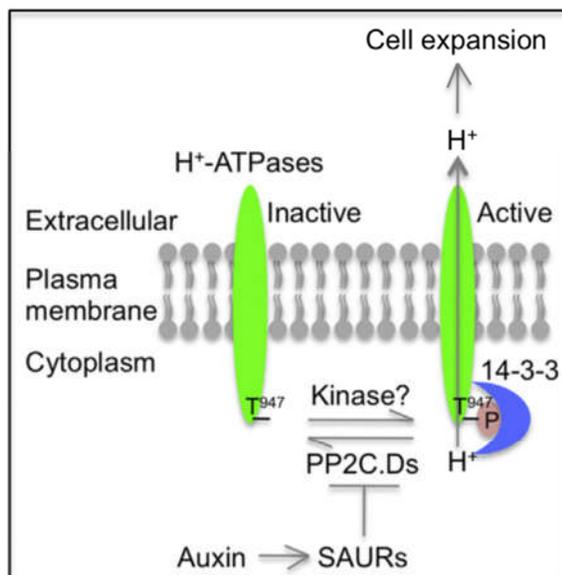
4.2.1. Perfil de expressão do gene *CcSAUR5*

Aparentemente, os poucos genes *SAUR* com função já caracterizada aparentam estar, em sua maioria, envolvidos com desenvolvimento mediado por auxina como expansão e alongação celular (CHAE et al., 2012; SPARTZ et al., 2012; SPARTZ et al., 2014; STAMM; KUMAR, 2013). Estudos recentes mostraram duas subfamílias de genes *SAUR* em *Arabidopsis* como reguladores positivos de expansão celular. Suas proteínas estão associadas com a membrana plasmática e foi demonstrado que regulam a ação das H⁺ATPases promovendo expansão celular (CHAE et al., 2012; SPARTZ et al., 2012).

Existe a hipótese de expansão celular via mecanismo de crescimento ácido mediado por auxina, em que células suscetíveis, quando expostas à auxina, ativariam uma bomba de prótons diminuindo o pH apoplástico e, conseqüentemente, ativando proteínas modificadoras da parede celular, além da hiperpolarização da membrana plasmática, que leva à absorção de solutos e água causando expansão da célula (FRÍAS et al., 1996; RAYLE; CLELAND, 1970).

SPATZ et al. (2014) demonstraram que o gene *SAUR19* em *Arabidopsis* inibe a ação de fosfatases PP2C-D, impedindo que estas desfosforilem o aminoácido Thr-947 do domínio autoinibitório C-terminal das H⁺ATPases, isto faz com que as mesmas permaneçam ativas e regulem a expansão celular. Logo, o gene ativa as H⁺ATPases através da inibição das fosfatases PP2C-D (Figura 9).

Figura 9 – Esquema representativo da ação do gene *SAUR* na expansão celular pela inibição da fosfatase PP2C-D.



Fonte: REN, H., GRAY, W. (2015)

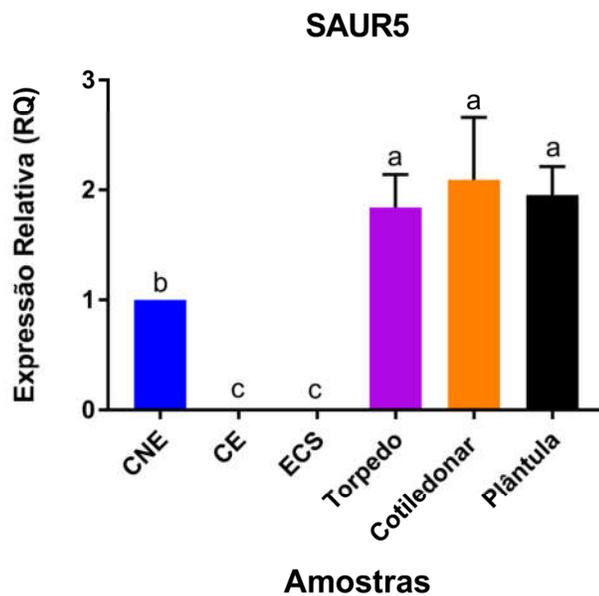
No entanto, a forma como a auxina regula a expressão gênica permanece incerta, foi possível apenas observar que o regulador não tem efeitos na interação entre o gene *SAUR19* e a PP2C-D, indicando que este não se liga diretamente. Como os genes *SAUR* também podem ser induzidos por outros reguladores e rotas que promovam crescimento celular, a ativação das H⁺ATPases de membrana pela inativação de PP2C-D pode ser comum a outras rotas (SPARTZ et al., 2012).

O perfil de expressão gênica de *CcSAUR5* que apresentou identidade de 54% com *AtSAUR19*, representado na Figura 10, pode ser explicado pela inibição de fosfatases PP2C, visto que há uma maior expressão em amostras de embriões torpeda, cotiledonar e plântulas, que possuem maiores taxas de expansão e alongação celular, seguida de calos não embriogênicos, que são mais vacuolizados e apresentam maior crescimento de células quando comparados a calos embriogênicos e suspensões celulares (ROSAS et al., 2016). Os dois últimos não apresentaram expressão significativa.

Também é possível especular que a inibição da PP2C pelo gene *CcSAUR5* promovendo expansão celular via H⁺ATPase esteja envolvida com alguma outra rota que induza crescimento nos tecidos, visto que calos embriogênicos possuem maiores taxas de

auxina sintetizada pela via do triptofano do que calos não embriogênicos, mas apresentam expressão nula do gene induzido por auxina nesse tecido (MICHALCZUK et al., 1992).

Figura 10 – Expressão relativa em RQ do gene *CcSAUR5* em calos não embriogênicos (CNE), calos embriogênicos (CE), suspensão celular (ECS), embriões nos estádios torpedo e cotiledonar e plântulas. Médias com mesma letra são consideradas iguais pelo teste Scott-Knott a 5%.



Fonte – Do Autor (2017)

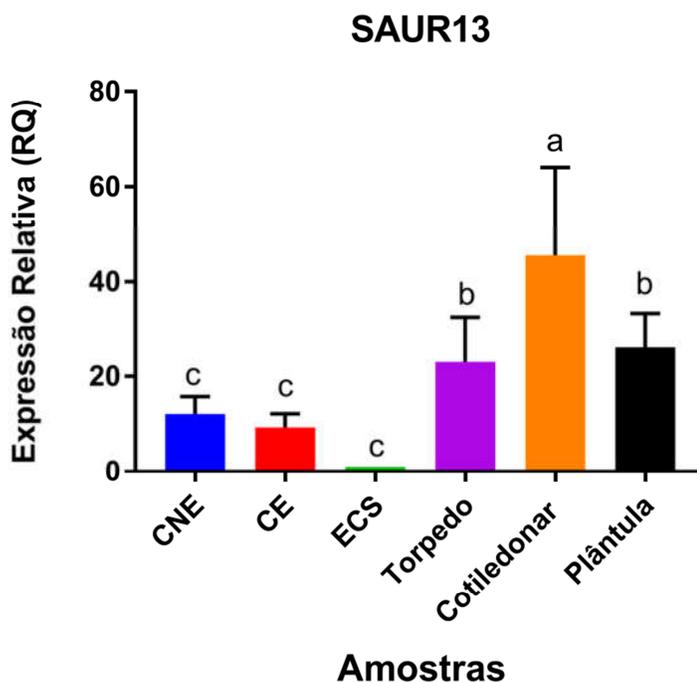
4.2.2. Expressão do gene *CcSAUR13*

Com auxílio do estudo filogenético das proteínas *SAUR* de *C. canephora* e alinhamento das sequências em bancos de dados, foi possível identificar homólogos dos *CcSAURs*. No caso do gene *CcSAUR13*, o alinhamento detectou similaridade com *AtSAUR36* (identidade de 63%), que está envolvido na promoção de senescência foliar e na integração de sinais de auxina e giberelina para regular funções biológicas como: manutenção do gancho apical em mudas etioladas, alongação de hipocótilo sob luminosidade e fertilidade (HOU et al., 2013; STAMM; KUMAR, 2013).

Hou et al. (2013) também reportaram que plantas de *Arabidopsis* mutantes sem a expressão do gene *SAUR36* apresentaram área foliar 83% maior do que plantas selvagens expressando o mesmo, indicando que o gene estaria relacionado com inibição de expansão celular. Ao contrário do indicado no estudo, *CcSAUR13* apresentou maior expressão em embriões cotiledonares, ou seja, em desenvolvimento e expansão foliar (Figura 11).

De forma complementar, Stamm et al. (2013) demonstraram, a partir de linhagens expressando o gene repórter GUS sob controle do promotor do *SAUR36* em *Arabidopsis*, que plântulas com 4 dias de idade apresentaram forte expressão no meristema apical e em regiões distintas da raiz. Este padrão observado seria consistente com tecidos em altos níveis de divisão e/ou alongação celular, assim como o padrão de expressão do gene *CcSAUR13*, observado em embriões nos estádios torpedo, cotiledonar e plântulas.

Figura 11 – Expressão relativa em RQ do gene *CcSAUR13* em calos não embriogênicos (CNE), calos embriogênicos (CE), suspensão celular (ECS), embriões nos estádios torpedo e cotiledonar e plântulas. Médias com mesma letra são consideradas iguais pelo teste Scott-Knott a 5%.



Fonte – Do Autor (2017)

4.2.3. Expressão do gene *CcSAUR20*

Foi encontrado um gene similar ao *CcSAUR2* em *Arabidopsis*, com identidade de 46%, envolvido em rotas relacionadas ao etileno e auxina. De acordo com Markakis et al (2013), o gene *AtSAUR76* está, em parte, envolvido com o processo de alongação celular downstream à auxina, enquanto o etileno influencia a expressão do mesmo através de

mudanças no transporte e/ou biossíntese de auxina endógena. A superexpressão do gene em mutantes produziu raízes com maior número de células meristemáticas e área foliar menor. O gene seria capaz de influenciar atividade meristemática, positivamente na raiz, mas negativamente nas folhas.

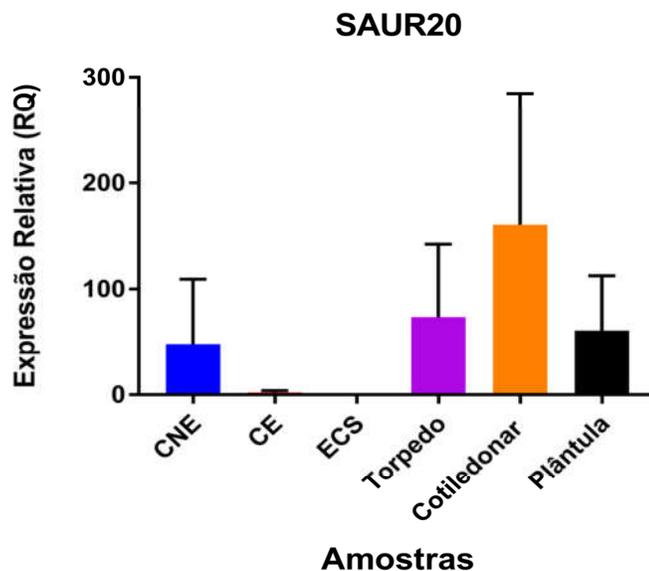
Outro estudo analisou a subfamília *SAUR76-78*, que foi identificada por se associar com receptores de etileno ETR_2 e EIN_4 . Plantas transgênicas superexpressando os três *SAURs* apresentaram folhas mais longas que a linhagem selvagem em consequência de crescimento e expansão celular, já que houve pouca diferença entre o número de células das plantas testadas. A análise dessas plantas também mostrou que houve uma redução na resposta ao etileno, sugerindo que os genes possam afetar a sinalização da subfamília II de receptores de etileno por interação direta, ao mesmo tempo em que podem promover crescimento e desenvolvimento da planta pela regulação de respostas à auxina (LI et al., 2015).

Auxina e etileno são dois reguladores hormonais muito importantes em plantas, o que faz com que suas interações venham sendo cada vez mais estudadas a nível fisiológico e molecular (LI et al., 2015). Já foi relatado que auxina possa estimular a biossíntese de etileno (YANG; HOFFMAN, 1984) e que etileno poderia reduzir a concentração de auxina endógena por conjugação de AIA formando ácido indole-3-acetilaspártico e/ou descarboxilação (SAGEE et al., 1990).

Em cafeeiro, reportou-se que o uso de diferentes inibidores de biossíntese ou a ação de etileno no meio de cultura suporta a hipótese de que uma redução na síntese de etileno ou a inibição da sua ação funcionem como agente promotor de embriogênese somática (KUMAR et al., 2007). Essas informações podem estar de acordo com a expressão observada do gene *CcSAUR20* durante a embriogênese somática de café.

Apesar da diferença estatística entre as médias não ter sido considerada significativa, isso não indica que as médias sejam exatamente iguais (RUMSEY, 2009). Logo, podemos observar na Figura 12 que a maior expressão relativa foi obtida em embriões no estágio cotiledonar, e que os calos não embriogênicos apresentaram maior expressão do que os calos embriogênicos e suspensões celulares.

Figura 12 – Expressão relativa em RQ do gene *CcSAUR13* em calos não embriogênicos (CNE), calos embriogênicos (CE), suspensão celular (ECS), embriões nos estádios torpedo e cotiledonar e plântulas. Médias com mesma letra são consideradas iguais pelo teste Scott-Knott a 5%.



Fonte – Do Autor (2017)

Esse comportamento pode ter relação com a auxina induzindo a biossíntese de etileno e essa interação desencadear a expressão do gene *CcSAUR20*, pois como visto anteriormente, maiores concentrações de etileno possuem um efeito negativo na embriogênese somática de café, justificando a maior expressão em CNE do que em CE ou ECS.

Da mesma forma que concentrações supraótimas de etileno afetam o potencial embriogênico de café, o hormônio também é conhecido pela sua importância em diversos aspectos do desenvolvimento de plantas, como crescimento de plântulas e formação de raízes adventícias, justificando uma maior expressão em embriões em diferentes estádios (BINDER et al., 2004; MERGEMANN; SAUTER, 2000).

Também é possível que o gene *CcSAUR20* interaja com fosfatases PP2C regulando sua atividade e promovendo expansão celular via H⁺ATPase, visto que mais de uma proteína

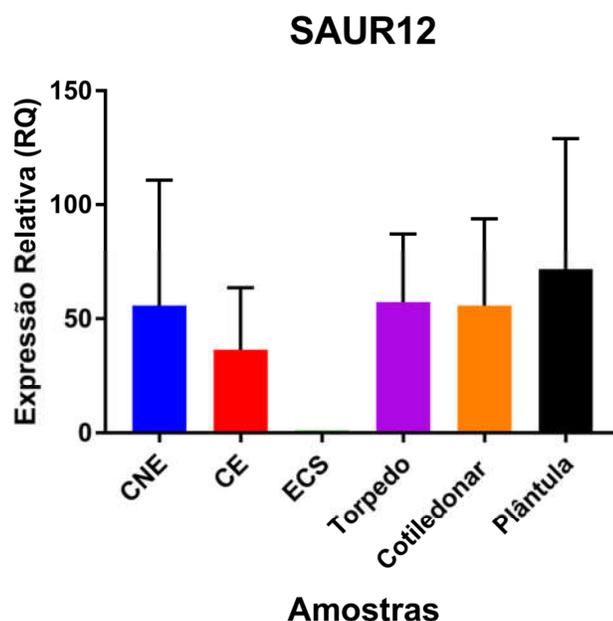
SAUR em *Arabidopsis* foram reportadas por interagir com PP2Cs do clado D (SPARTZ et al., 2014). São necessários mais estudos para verificar ambas as hipóteses.

4.2.4. Expressão dos genes *CcSAUR12* e *CcSAUR18*

Os genes *CcSAUR12* e *CcSAUR18* apresentaram similaridade a genes *SAUR* que ainda não tiveram funções caracterizadas como *AtSAUR50* e *SISAUR81*, respectivamente, logo é necessário que sejam feitos estudos mais aprofundados e maior caracterização dos mesmo para que seja possível pressupor sua função no processo de embriogênese somática em café.

O perfil de expressão de *CcSAUR12* é relativamente estável em todos os tecidos analisados com exceção de suspensões celulares, em que a expressão é quase nula, como representado na Figura 13.

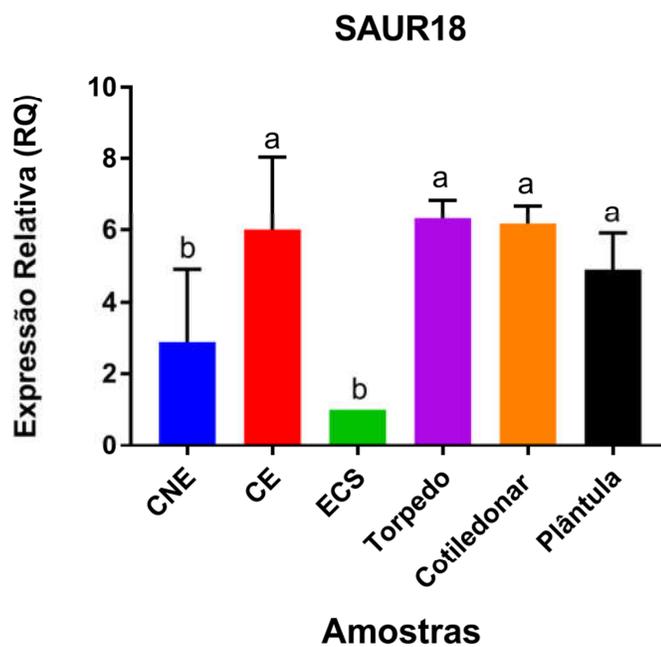
Figura 13 – Expressão relativa em RQ do gene *CcSAUR12* em calos não embriogênicos (CNE), calos embriogênicos (CE), suspensão celular (ECS), embriões nos estádios torpedo e cotiledonar e plântulas. Pelo teste Scott-Knott a 5%, as médias são consideradas iguais.



Fonte – Do Autor (2017)

Já o gene *CcSAUR18* (Figura 14) apresentou diferença de expressão entre tecidos, com expressão relativa maior em calos embriogênicos, embriões torpedos, embriões cotiledonares e plântulas, enquanto a menor expressão relativa foi observada em suspensões celulares.

Figura 14 – Expressão relativa em RQ do gene *CcSAUR18* em calos não embriogênicos (CNE), calos embriogênicos (CE), suspensão celular (ECS), embriões nos estádios torpedos e cotiledonar e plântulas. Pelo teste Scott-Knott a 5%, as médias são consideradas iguais.



Fonte – Do Autor (2017)

5. CONCLUSÃO

Com o presente estudo foi possível identificar 31 genes característicos da família SAUR (*Small auxin-up RNA*) em *Coffea canephora* e, a partir de dados de sequenciamento de transcritos, encontrar os mesmos genes em *Coffea arabica* e analisar o perfil de expressão gênica *in silico* de alguns candidatos.

A partir destas informações foi realizada a verificação da expressão gênica de 5 membros da família durante a embriogênese somática de *C.arabica*, obtendo diferentes perfis para cada um, sendo que o resultado dos genes *SAUR5*, *SAUR12* e *SAUR20* foram bem similares ao perfil determinado *in silico*.

A confirmação das funções propostas para os genes estudados virá a nos auxiliar na compreensão do processo de embriogênese somática em cafeeiro e, possivelmente, outras espécies, logo, mais estudos são necessários.

Apenas com a expressão gênica analisada não é possível determinar com certeza as funções de cada um dos genes no processo de embriogênese somática, mas estes parecem estar de acordo com o que já foi relatado em membros de outras espécies, que os genes *SAUR* estão envolvidos em processos de expansão celular e são induzidos por auxina.

REFERÊNCIAS

- ALTAMURA, M. M. et al. **Recent Advances on Genetic and Physiological Bases of In Vitro Somatic Embryo Formation.** In: GERMANA, M. A. e LAMBARDI, M. (Ed.). In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. New York, NY: Springer New York, 2016. p.47-85. ISBN 978-1-4939-3061-6.
- ANDREWS, S, et al. **FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.** 2010.<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- AYIL-GUTIÉRREZ, B. et al. **Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in Coffea canephora.** Plant Signaling & Behavior, v. 8, n. 11, p. e26998, Oct. 2013.
- BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. **Somatic Embryogenesis of Coffee.** In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K., et al (Ed.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 5. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. p.259-287. ISBN 978-94-011-4774-3.
- BINDER, B. M. et al. **Arabidopsis Seedling Growth Response and Recovery to Ethylene. A Kinetic Analysis.** Plant Physiology, v. 136, n. 2, p. 2913-2920, Aug. 2004.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** Bioinformatics, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.
- CHAE, K. et al. **Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63 promotes hypocotyl and stamen filament elongation.** The Plant Journal, v. 71, n. 4, p. 684-97, Aug 2012.
- CHEN, Y.; HAO, X.; CAO, J. **Small auxin upregulated RNA (SAUR) gene family in maize: identification, evolution, and its phylogenetic comparison with Arabidopsis, rice, and sorghum.** Journal of Integrative Plant Biology, v. 56, n. 2, p. 133-50, Feb 2014.
- CHUGH, A.; KHURANA, P. **Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances.** CURRENT SCIENCE, v. 83, n. 6, p. 715-730, 25 September 2002 2002
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Quarto Levantamento, Brasília, 2016.**
- COOKE, T. J.; RACUSEN, R. H.; COHEN, J. D. **The Role of Auxin in Plant Embryogenesis.** The Plant Cell, v. 5, n. 11, p. 1494-1495, 1993.
- COSTA, J. N. M., Silva, R. B., RIBEIRO, P. de A. **Broca-do-café: previsão de infestação e recomendação de controle safra 2000/2001.** Porto Velho: EMBRAPA – CPAF – Rondônia, 2000. 4p (EMBRAPA – CPAF – Rondônia. Recomendação Técnica, 22).
- DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. **Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review.** Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 18, n. 1, p. 55-81, 2006.
- DE CARVALHO, K. et al. **Nitrogen Starvation, Salt and Heat Stress in Coffee (Coffea arabica L.): Identification and Validation of New Genes for qPCR Normalization.** Molecular Biotechnology, v. 53, n. 3, p. 315-325, Mar 2013.

- DOBIN, A. et al. **STAR**: ultrafast universal RNA-Seq aligner. *Bioinformatics*, v. 29, n. 1, p. 15-21, 2013.
- ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. **Molecular regulation of plant somatic embryogenesis**. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 49, n. 6, p. 631-642, 2013// 2013.
- FEHÉR, A. **The initiation phase of somatic embryogenesis**: what we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, v. 52, n. 1, p. 53-56, 2008.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. **Transition of somatic plant cells to an embryogenic state**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003// 2003.
- FREITAS, N. C. et al. **Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-related tissues**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 128, n. 3, p. 663-678, 2017// 2017.
- FRÍAS, I. et al. **A major isoform of the maize plasma membrane H(+)-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles**. *The Plant Cell*, v. 8, n. 9, p. 1533-1544, 1996.
- GAJ, M. D. **Factors Influencing Somatic Embryogenesis Induction and Plant Regeneration with Particular Reference to Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.** *Plant Growth Regulation*, v. 43, n. 1, p. 27-47, 2004// 2004.
- GODA, H. et al. **Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis**. *Plant Physiology*, v. 134, n. 4, p. 1555-73, Apr 2004.
- GUILFOYLE, T. J.; HAGEN, G. **Auxin response factors**. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 10, n. 5, p. 453-60, Oct 2007.
- HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. **Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors**. *Plant Molecular Biology*, v. 49, n. 3-4, p. 373-85, Jun-Jul 2002.
- HALPERIN, W. **Morphogenetic Studies with Partially Synchronized Cultures of Carrot Embryos**. *Science*, v. 146, n. 3642, p. 408, 1964.
- HALPERIN, W.; WETHERELL, D. F. **Ammonium Requirement for Embryogenesis in vitro**. *Nature*, v. 205, n. 4970, p. 519-520, 01/30/print 1965.
- HATANAKA, T. et al. **Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of Coffea canephora**. *Plant Cell Reports*, v. 10, n. 4, p. 179-82, Jul 1991.
- HOU, K.; WU, W.; GAN, S. S. **SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in Arabidopsis**. *Plant Physiology*, v. 161, n. 2, p. 1002-9, Feb 2013.
- HUANG, X. et al. **Identification of small auxin-up RNA (SAUR) genes in Urticales plants: mulberry (Morus notabilis), hemp (Cannabis sativa) and ramie (Boehmeria nivea)**. *Journal of Genetics*, v. 95, n. 1, p. 119-129, 2016// 2016.
- IKEDA-IWAI, M. et al. **Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of Arabidopsis thaliana**. *The Plant Journal*, v. 34, n. 1, p. 107-114, 2003.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **The Current State of the Global Coffee Trade.** London. Nov. 2016

JAIN, M.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. **Genome-wide analysis, evolutionary expansion, and expression of early auxin-responsive SAUR gene family in rice (*Oryza sativa*).** *Genomics*, v. 88, n. 3, p. 360-71, Sep 2006.

JIMÉNEZ, M. V. **Involvement of Plant Hormones and Plant Growth Regulators on in vitro Somatic Embryogenesis.** *Plant Growth Regulation*, v. 47, n. 2, p. 91-110, 2005// 2005.

KNAUSS, S.; ROHRMEIER, T.; LEHLE, L. **The Auxin-induced Maize Gene ZmSAUR2 Encodes a Short-lived Nuclear Protein Expressed in Elongating Tissues.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 26, p. 23936-23943, 2003.

KUMAR, V.; RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. **Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 43, n. 6, p. 602-607, Dec 2007.

LI, Z. G. et al. **Three SAUR proteins SAUR76, SAUR77 and SAUR78 promote plant growth in *Arabidopsis*.** *Scientific Reports*, v. 5, p. 12477, Jul 24 2015.

LOPEZ-GOMEZ, P. et al. **Influence of Explant and Culture Medium on Somatic Embryogenesis of Coffee Leaves.** *Revista Fitotecnia Mexicana*, v. 33, n. 3, p. 205-213, Jul-Sep 2010.

LOYOLA-VARGAS, V. M. et al. **Somatic Embryogenesis in *Coffea* spp.** In: LOYOLA-VARGAS, M. V. e OCHOA-ALEJO, N. (Ed.). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications.* Cham: Springer International Publishing, 2016. p.241-266. ISBN 978-3-319-33705-0.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications.** Switzerland: Springer, 2016. 506 ISBN ISBN 978-3-319-33705-0.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Culturas.** Brasília : MAPA, 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>>. Acesso em: 4 de agosto de 2016.

MARKAKIS, M. N. et al. **Characterization of a small auxin-up RNA (SAUR)-like gene involved in *Arabidopsis thaliana* development.** *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. e82596, 2013.

MCCLURE, B. A.; GUILFOYLE, T. **Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism.** *Science*, v. 243, n. 4887, p. 91, 1989.

MERGEMANN, H.; SAUTER, M. **Ethylene Induces Epidermal Cell Death at the Site of Adventitious Root Emergence in Rice.** *Plant Physiology*, v. 124, n. 2, p. 609-614, Jun. 2000.

MICHALCZUK, L.; COOKE, T. J.; COHEN, J. D. **Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis.** *Phytochemistry*, v. 31, n. 4, p. 1097-1103, 1992/04/01 1992.

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

- NEMHAUSER, J. L.; HONG, F.; CHORY, J. **Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses.** *Cell*, v. 126, n. 3, p. 467-475, 2006.
- NEWMAN, T. C. et al. **DST Sequences, Highly Conserved among plant SAUR Genes, Target Reporter Transcripts for Rapid Decay in Tobacco.** *The Plant Cell*, v. 5, p. 701-714, 1993.
- NIC-CAN, G. I. et al. **Somatic Embryogenesis: Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression. A Case of Species of the Same Genus.** *PLoS One*, v. 10, n. 6, p. e0126414, 2015.
- PARK, J.-E. et al. **Functional characterization of a small auxin-up RNA gene in apical hook development in Arabidopsis.** *Plant Science*, v. 172, n. 1, p. 150-157, 1// 2007.
- PRIYONO et al. **Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in Coffea canephora Pierre.** *Plant Cell Reports*, v. 29, n. 4, p. 343-57, Apr 2010.
- QUIROZ-FIGUEROA, F. et al. **Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of Coffea arabica.** *Plant Cell Reports*, v. 20, n. 12, p. 1141-1149, 2002.
- QUIROZ-FIGUEROA, F. et al. **Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in Coffea arabica tissue culture.** *Plant Cell Reports*, v. 20, n. 8, p. 679-684, Dec 2001.
- QUIROZ-FIGUEROA, F. et al. **Direct somatic embryogenesis in Coffea canephora. Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 318, p. 111-117, 2006.
- RAJESH, M. K. et al. **De novo assembly and characterization of global transcriptome of coconut palm (Cocos nucifera L.) embryogenic calli using Illumina paired-end sequencing.** *Protoplasma*, v. 253, n. 3, p. 913-928, 2016// 2016.
- RAYLE, D. L.; CLELAND, R. **Enhancement of Wall Loosening and Elongation by Acid Solutions.** *Plant Physiology*, v. 46, n. 2, p. 250-253, 1970.
- REN, H.; GRAY, WILLIAM M. **SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental Signals in Plant Growth.** *Molecular Plant*, v. 8, n. 8, p. 1153-1164, 8/3/ 2015.
- ROSAS, M. M. et al. **The Current Status of proteomic Studies in Somatic Embryogenesis.** In: LOYOLA-VARGAS, V. M. e OCHOA-ALEJO, N. (Ed.). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications.* Switzerland: Springer Nature, 2016. ISBN 978-3-319-33704-3.
- SAGEE, O.; RIOV, J.; GOREN, R. **Ethylene-Enhanced Catabolism of [(14)C]Indole-3-Acetic Acid to Indole-3-Carboxylic Acid in Citrus Leaf Tissues.** *Plant Physiology*, v. 92, n. 1, p. 54-60, 1990.
- SAITOU, N.; NEI, M. **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANTANA-BUZZY, N. et al. **Advances in coffee tissue culture and its practical applications.** In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 43, n. 6, p. 507-520, Dec 2007.

SHIBASAKI, K. et al. **Auxin Response in Arabidopsis under Cold Stress: Underlying Molecular Mechanisms.** *The Plant Cell*, v. 21, n. 12, p. 3823-3838, 2009.

SILVA, A. T. et al. **A putative BABY BOOM-like gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of Coffea arabica L.** In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 51, n. 1, p. 93-101, 2014.

SILVA, A. T. et al. **Characterization of a Putative Serk-Like Ortholog in Embryogenic Cell Suspension Cultures of Coffea arabica L.** *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 32, n. 1, p. 176-184, 2013.

SÖNDAHL, M.; SHARP, W. **High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of Coffea arabica L.** *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, v. 81, n. 5, p. 395-408, 1977.

SOOD, A.; CHAUHAN, R. S. **Comparative NGS Transcriptomics Unravels Molecular Components Associated with Mosaic Virus Infection in a Bioenergy Plant Species, Jatropha curcas L.** *Bioenergy Research*, v. 10, n. 1, p. 129-145, 2017.

SPARTZ, A. K. et al. **The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion.** *The Plant Journal*, v. 70, n. 6, p. 978-90, Jun 2012.

SPARTZ, A. K. et al. **SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H(+)-ATPases to Promote Cell Expansion in Arabidopsis.** *The Plant Cell*, v. 26, n. 5, p. 2129-2142, May 2014.

STAMM, P.; KUMAR, P. P. **Auxin and gibberellin responsive Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA36 regulates hypocotyl elongation in the light.** *Plant Cell Reports*, v. 32, n. 6, p. 759-769, 2013// 2013.

STARITSKY, G. **Embryoid formation in callus tissues of coffee.** *Acta Botanica Neerlandica*, v. 19, n. 4, p. 509-514, 1970.

SULLIVAN, M. L.; GREEN, P. J. **Mutational analysis of the DST element in tobacco cells and transgenic plants: identification of residues critical for mRNA instability.** *RNA*, v. 2, n. 4, p. 308-315, 1996.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TORRES, L. F. et al. **Gene expression and morphological characterization of cell suspensions of Coffea arabica L. cv. Catiguá MG2 in different cultivation stages.** *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 37, n. 9, p. 175, 2015// 2015.

TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Embrapa, 1998. ISBN 9788573830446.

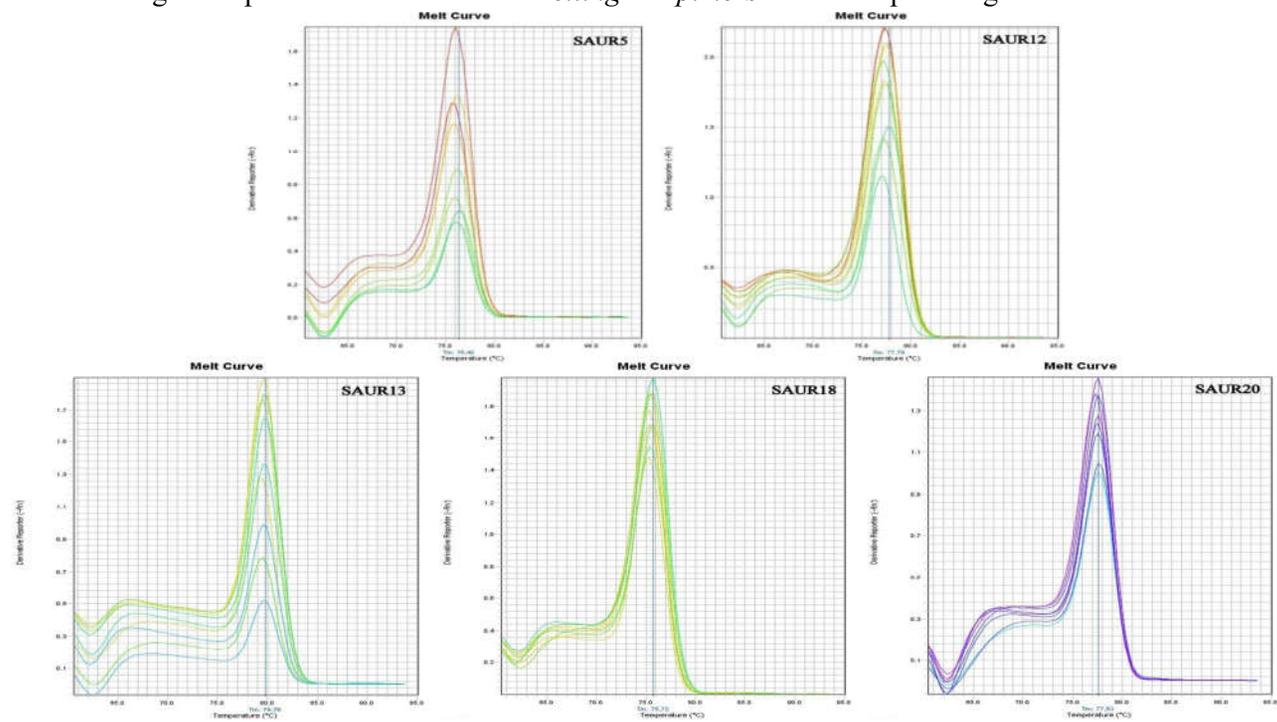
- TREWAVAS, A. **How do plant growth substances work?** *Plant, Cell & Environment*, v. 4, n. 3, p. 203-228, 1981.
- UMEHARA, M.; IKEDA, M.; KAMADA, H. **Endogenous Factors that Regulate Plant Embryogenesis: Recent Advances.** *Japanese Journal of Plant Science*, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2007.
- WANG, S. et al. **Auxin-related gene families in abiotic stress response in Sorghum bicolor.** *Functional & Integrative Genomics*, v. 10, n. 4, p. 533-46, Nov 2010.
- WU, J. et al. **Genome-wide identification and transcriptional profiling analysis of auxin response-related gene families in cucumber.** *BMC Research Notes*, v. 7, p. 218-218, March 2014.
- WU, J. et al. **Genome-wide analysis of SAUR gene family in Solanaceae species.** *Gene*, v. 509, n. 1, p. 38-50, Nov 1 2012.
- XU, Z. et al. **Transcriptome Profiling Reveals Auxin and Cytokinin Regulating Somatic Embryogenesis in Different Sister Lines of Cotton Cultivar CCRI24.** *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 55, n. 7, p. 631-642, 2013.
- YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. **Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants.** *Annual Review of Plant Physiology*, v. 35, n. 1, p. 155-189, 1984/06/01 1984.
- YANG, X. et al. **Understanding of auxin regulation during somatic embryogenesis in cotton by RNA-seq and sRNA-seq.** *Plant Signaling Behavior*, v. 8, n. 11, Aug 29 2013.
- YANG, X. et al. **Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton.** *BMC Plant Biology*, v. 12, p. 110-110, July 2012.
- ZAMBOLIM, L. et al. **Controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus.** In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. *Controle de doenças de plantas cultivadas: grandes culturas.* Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. v. 1. p. 83 – 140.
- ZAMBOLIM, L. **Current status and management of coffee leaf rust in Brazil.** *Tropical Plant Pathology*, v. 41, n. 1, p. 1-8, Feb 2016.
- ZENG, F. et al. **A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis.** *Genomics*, v. 90, n. 5, p. 620-628, 11// 2007.
- ZIMMERMAN, J. L. **Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants.** *The Plant Cell*, v. 5, n. 10, p. 1411, 1993.

APÊNDICE A – Dados Suplementares

Tabela Suplementar: *Primers* utilizados na análise de RT-qPCR

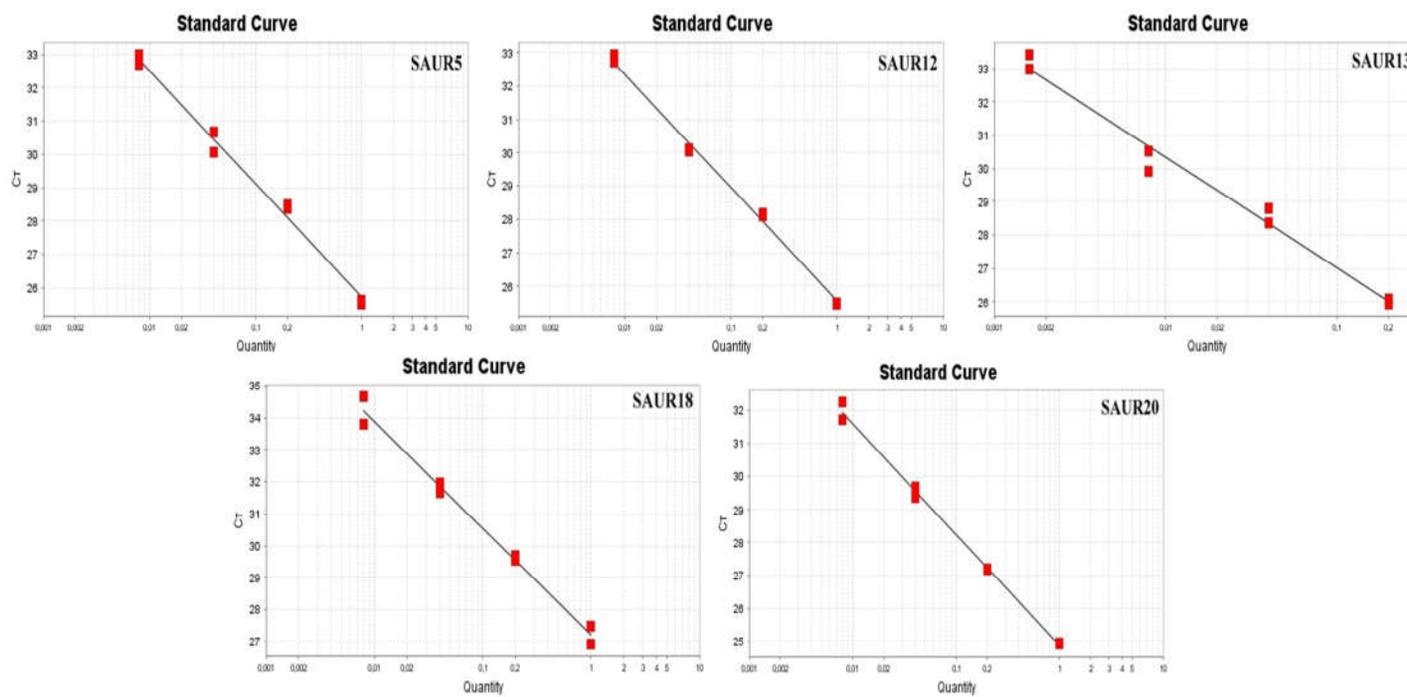
Gene	Sequencia de <i>primer</i> (5'-3')	T _m (°C)	Amplicon (pb)	E (%)	R ²
24S	F- GACCAATCGTCTTCTTTCCAGAAA	60	83	0,938	0,999
	R- TCAACTCAGCCTTGAAACATTAG	58			
PP2A	F- ACCTATGGGTGAAATGAAGATGGA	60	80	0,950	0,980
	R- AGGCGGCGAGATGAATCTTT	59			
SAUR5	F- GATCCGTTTGCCATCTATGATT	60	80	0,971	0,991
	R- CTGATTGACGATTTCTTTGCAG	59			
SAUR12	F- CCTCCCCACTCTTCACTAGC	58	124	0,970	0,994
	R- GCTTGCTGCTTGATTTTCTG	58			
SAUR13	F- TGGGCAAGATCAGAGGTTTC	60	85	0,995	0,986
	R- CTCATCGGCGAACTGTGTC	60			
SAUR18	F- CACTGTCCAACCGCTCTTCT	60	80	0,997	0,990
	R- TCCAATCTTCTTTCCCCACA	60			
SAUR20	F- <i>TTCTCTCCTCCTPrimersCGGTCTCTC</i>	60	104	0,989	0,996
	R- GGTGAGTCTGCCAGCTTTG	59			

Fonte: Do Autor (2017)

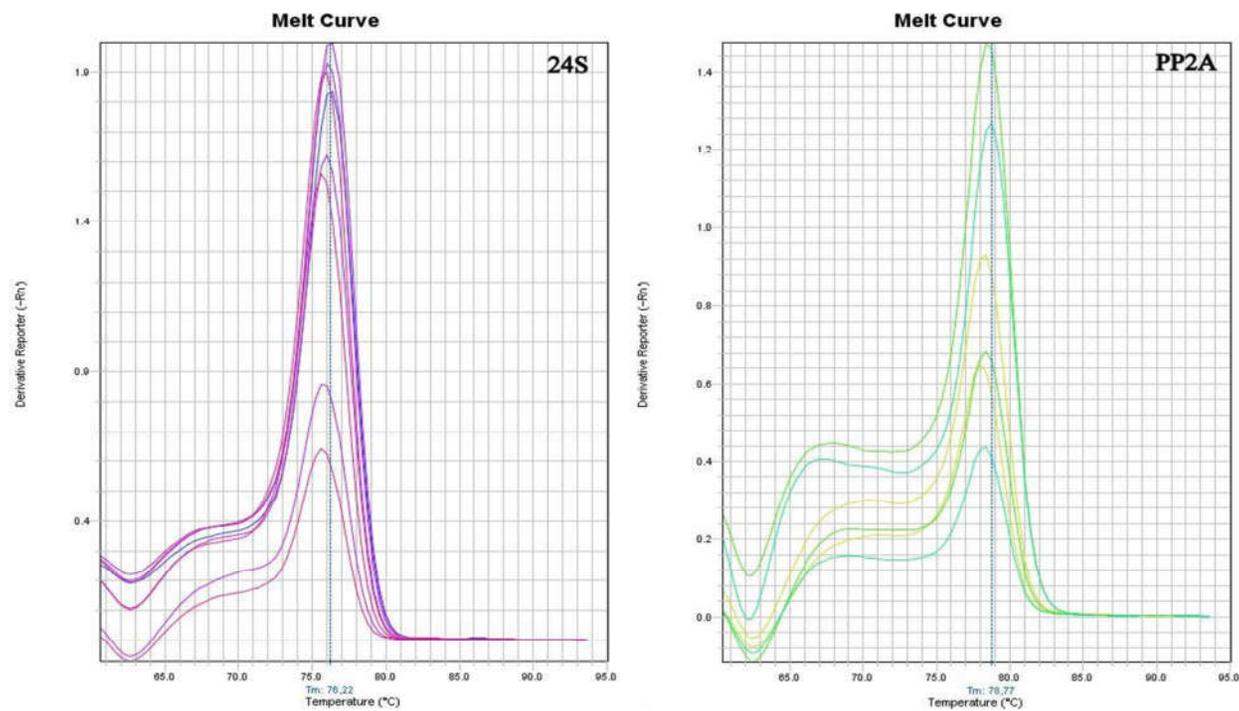
Figura Suplementar 1 - Curva de *Melting* dos *pimers* utilizados para os genes CcSAUR.

Fonte – Do Autor (2017)

Figura Suplementar 2 – Curva padrão dos genes SAUR em pool de amostras com diluição fatorial 1:5.

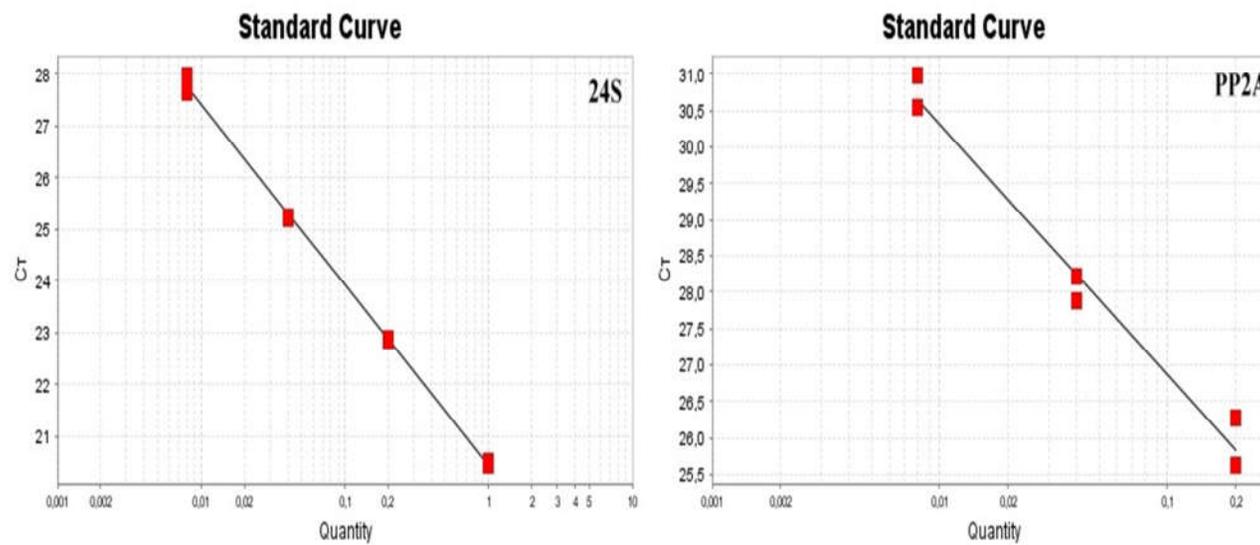


Fonte – Do Autor (2017)

Figura Suplementar 3 - Curva de *Melting* dos primers 24S e PP2A.

Fonte – Do Autor (2017)

Figura Suplementar 4 – Curva padrão dos genes de referência em pool de amostras com diluição fatorial 1:5.



Fonte – Do Autor (2017)