



JULIANA SOUZA VELOSO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE SEMENTES DE CAFÉ
SUBMETIDAS À CRIOPRESERVAÇÃO**

**LAVRAS – MG
2017**

JULIANA SOUZA VELOSO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE SEMENTES DE CAFÉ SUBMETIDAS À
CRIOPRESERVAÇÃO**

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

Dra. Sttela Dellyzette Veiga Franco da Rosa

Orientadora

Dra. Lilian Padilha

Coorientadora

**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).**

Veloso, Juliana Souza.

Avaliação molecular de sementes de café submetidas à
criopreservação / Juliana Souza Veloso. - 2016.

55 p.

Orientador(a): Sttela Dellyzette Veiga Franco da Rosa.

Coorientador(a): Lilian Padilha

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. *C arabica* L. 2. Expressão gênica. 3. Conservação. I. Rosa,
Sttela Dellyzette Veiga Franco da. II. Padilha, Lilian. III. Título.

JULIANA SOUZA VELOSO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE SEMENTES DE CAFÉ SUBMETIDAS À
CRIOPRESERVAÇÃO**

**MOLECULAR EVALUATION OF COFFEE SEEDS SUBMETED TO
CRYOPRESERVATION**

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

APROVADA em 21 de novembro de 2016.

Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho

Dra. Lilian Padilha

Prof. Dr. João Almir Oliveira

UFLA

Embrapa Café

UFLA

Dra. Sttela Dellyzette Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dra. Lilian Padilha
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2017**

A Deus, pela oportunidade de aprendizagem

À toda minha família pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu namorado Wylcker pelo amor e companheirismo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de aprendizado.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Agronomia/Fitotecnia pela estrutura física, oportunidade de realizar o mestrado e apoio financeiro.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Agronômico de Campinas e ao Laboratório de Genética Molecular do IAC Café pela estrutura física e oportunidade de realizar a pesquisa.

À Embrapa Café, em especial às pesquisadoras Dr^a. Sttela Dellyzette Veiga franco da Rosa e Dr^a. Lilian Padilha pela oportunidade de integrar a pesquisa de criopreservação, paciência, disponibilidade, transmissão de conhecimentos, sugestões visando ao enriquecimento da pesquisa e pela excelente orientação e coorientação, respectivamente.

À Dr^a. Dulcinéia de Carvalho e ao Dr. João Almir Oliveira pela disponibilidade em participar da banca e pelas contribuições.

Aos professores e técnicos do programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia pelos conhecimentos transmitidos que possibilitaram a conclusão do mestrado.

À Dr^a. Madeleine Alves de Figueiredo pelo fornecimento do material vegetal.

À Dr^a. Aline da Consolação Sampaio Clemente e a pós-doutoranda Juliana Camargo Martinati Schenk pelos ensinamentos que possibilitaram a realização da pesquisa.

À minha família pelo apoio, paciência, conselhos e otimismo sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Wylcker, meu namorado, pelo incentivo, paciência, carinho e pelo amadurecimento que a nossa convivência proporcionou.

A toda equipe de orientados da Sttela pela paciência e apoio nos momentos cruciais.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular IAC-Café pelo apoio, sugestões, conhecimentos transmitidos e pela capacidade de tornar diferente e divertido cada dia de trabalho.

Agradeço também a todos aqueles que, embora não citados, contribuíram para que fosse possível concluir mais essa etapa em minha vida.

RESUMO

As sementes de café apresentam baixa longevidade e sensibilidade à dessecação, o que limita seu armazenamento em bancos de germoplasma convencionais. Como método alternativo para a conservação tem sido estudado o armazenamento em temperatura ultra-baixa utilizando nitrogênio líquido. Entretanto, ainda não são completamente conhecidas as alterações moleculares que ocorrem em sementes de café armazenadas nestas condições. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a expressão de genes em sementes de café submetidas a diferentes protocolos de criopreservação visando ampliar o conhecimento em nível molecular dos efeitos da criopreservação sobre a viabilidade destas sementes e auxiliar na compreensão e interpretação de resultados fisiológicos, bioquímicos e moleculares. A expressão dos genes alvo varia conforme a metodologia de secagem, de pré-resfriamento e o tempo de reaquecimento. O uso de cloreto de sódio (75 % UR) para a secagem e/ou a ausência de pré-resfriamento resulta em maior expressão dos genes isocitrato liase, esterase, desidrina e apetala 2 nas sementes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo IAC 62 do que às demais metodologias de secagem e pré-resfriamento. O uso do sulfato de amônio (85 % UR) para a secagem e/ou o pré-resfriamento até -50 °C proporciona maior expressão dos genes telomerase, inibidor de apoptose e DNA metilase nas sementes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo IAC 62 do que às demais metodologias de secagem e pré-resfriamento ou em ausência de pré-resfriamento. Os genes telomerase, inibidor de apoptose e DNA metilase, bem como os genes ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e peroxidase apresentam padrão de expressão similar.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.. Expressão gênica. Conservação. Baixa temperatura.

ABSTRACT

Coffee seeds present low longevity and sensitivity to desiccation, which limits their storage in conventional germplasm banks. As alternative method for this conservation, storage in ultra-low temperatures, using liquid nitrogen, have been studied. However, the molecular changes that occur in coffee seeds stored under these conditions are not yet entirely known. Therefore, with this work, we aimed at evaluating the expression of genes from coffee seeds submitted to different cryopreservation protocols in order to expand the knowledge of the effects of cryopreservation over the viability of these seeds at molecular level and to aid in understanding the physiological, biochemical and molecular results. The expression of target genes varies according to drying, pre-cooling and reheating time methodologies. The use of sodium chloride (75% UR) for drying and/or the absence of pre-cooling results in a greater expression of the genes isocitrate lyase, esterase, dehydrin and apetala 2 in the seeds of *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo IAC 62 when compared to the other drying and pre-cooling methodologies. The use of ammonium sulfate (85% UR) for drying and/or pre-cooling up to -50 °C provides greater expression of genes telomerase, apoptosis inhibitor and DNA methylase in the seeds of *Coffea arabica* L. cv. Catuaí amarelo 62 when compared to the other drying and pre-cooling methodologies or in the absence of pre-cooling. Genes telomerase, apoptosis inhibitor and DNA methylase, as well as genes ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and peroxidase present similar expression pattern.

Keywords: *Coffea arabica* L.. Gene expression. Conservation. Low temperature.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Expressão gênica relativa em sementes criopreservadas de *C. arabica* L. cv. Catuaí amarelo. Isocitratol liase (A), *mannose-binding lectin* (MBL) (B), esterase (C), desidrina (D), *late abundant 2* (E). Tratamentos 1, 2 e 3 - sementes secadas em sílica gel até 20 % (bu), pré-resfriadas até -40 °C em velocidade de 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamentos 4, 5 e 6 - sementes secadas em sílica gel até 17 % (bu), pré-resfriadas até -40 °C, a 1°C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamento 7 - sementes secadas em solução saturada de sulfato de amônio (85 % UR) até 17 % (bu), pré-resfriadas até -50 °C a 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2 min em 40 °C. Tratamento 8 - sementes secadas em cloreto de sódio (75 % UR) até 17% (bu), imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por dois minutos em 40 °C. Dados obtidos a partir da média entre três repetições utilizando o tratamento 8 para estimar a expressão relativa..... 36
- Figura 2 – Expressão gênica relativa em sementes criopreservadas de *C. arabica* L. cv. Catuaí amarelo. Telomerase (A), inibidor de apoptose (B), DNA-metilase (C), apetala 2 (D). Tratamentos 1, 2 e 3 - sementes secadas em sílica gel até 20 % (bu), pré-resfriadas até -40 °C a 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamentos 4, 5 e 6 - sementes secadas em sílica gel até 17% (bu), pré-resfriadas até -40 °C a 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamento 7 - sementes secadas em solução saturada de sulfato de amônio (85 % UR) até 17 % (bu), pré-resfriadas até -50 °C em velocidade de 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2 minutos em 40 °C. Tratamento 8 - sementes secadas em cloreto de sódio (75 % UR) até 17% (bu), imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por dois minutos em 40 °C. Dados obtidos a partir da média entre 3 repetições utilizando o tratamento 8 para estimar a expressão relativa. 39
- Figura 3 – Expressão gênica relativa em sementes criopreservadas de *C. arabica* L. cv. Catuaí amarelo. Metalotioneína, (A), catalase (B), ascorbato peroxidase (C), glutationa-s-transferase (D), superóxido dismutase (E) e peroxidase (F). Tratamentos 1, 2 e 3 -

sementes secadas em sílica gel até 20 % (bu), pré-resfriadas até -40 °C a 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamentos 4, 5 e 6 - sementes secadas em sílica gel até 17% (bu), pré-resfriadas até -40 °C a 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamento 7 - sementes secadas em solução saturada de sulfato de amônio (85 % UR) até 17 % (bu), pré-resfriadas até -50 °C em velocidade de 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2 minutos em 40 °C. Tratamento 8 corresponde a sementes secadas em cloreto de sódio (75 % UR) até 17% (bu), imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por dois minutos em 40 °C. Dados obtidos a partir da média entre 3 repetições utilizando o tratamento 8 para estimar a expressão relativa. 42

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Valores médios de protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas normais fortes (PNF), folhas cotiledonares (FC), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), embriões viáveis no teste de tetrazólio (EV) e condutividade elétrica (CE) de sementes de café criopreservadas..... | 28 |
| Tabela 2 – Identificação e sequência dos <i>primers</i> que codificam para os genes alvo. | 29 |
| Tabela 3 – Nome e sequência dos <i>primers</i> testados para gene de referência..... | 32 |
| Tabela 4 – Coeficiente de correlação de Pearson, desvio padrão ($\pm Ct$) e coeficiente de variação (% Ct) obtidos na análise de gene de referência pelo software BestKeeper (PFAFFL et al., 2004). | 34 |
| Tabela 5 – Valor de estabilidade obtido na análise de gene de referência pelo software Normfinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004)..... | 35 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 13 |
| 2.1 | Café | 13 |
| 2.2 | Sementes de café | 14 |
| 2.3 | Criopreservação..... | 15 |
| 2.3.1 | Espécies de oxigênio altamente reativas..... | 17 |
| 2.4 | Expressão gênica e criopreservação | 18 |
| 2.4.1 | Danos por dessecação..... | 19 |
| 2.4.2 | Danos e reparos no DNA | 21 |
| 2.4.3 | Danos devido ao estresse oxidativo | 23 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1 | Local..... | 26 |
| 3.2 | Material vegetal | 26 |
| 3.3 | Seleção de genes | 29 |
| 3.4 | Extração de RNA e síntese de cDNA..... | 30 |
| 3.5 | Padronização das reações de qRT-PCR | 31 |
| 3.6 | Expressão gênica..... | 32 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 4.1 | Seleção e validação do gene de referência..... | 34 |
| 4.2 | Expressão de genes relacionados à dessecação..... | 35 |
| 4.3 | Expressão de genes relacionados a danos e reparos no DNA | 39 |
| 4.4 | Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo | 42 |
| 5 | CONCLUSÕES | 47 |
| | REFERÊNCIAS | 48 |

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos mais importantes para o mercado internacional e para a balança econômica brasileira (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA, 2016). Nos últimos anos, tem sido observado aumento da produtividade do cafeeiro (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2016a) devido, principalmente, aos investimentos realizados em pesquisa. Entretanto, a dificuldade em armazenar as sementes de café por longo período de tempo permanece como um dos principais entraves à manutenção da variabilidade genética do gênero *Coffea*.

Atualmente, a conservação de acessos de café é realizada em condições de campo, pois, como as sementes de café apresentam baixa longevidade e sensibilidade à dessecação, seu armazenamento em bancos de germoplasma convencionais é impossibilitado. Entretanto, essa prática de armazenamento *in vivo* exige um grande aporte financeiro e está sujeita a ocorrência eminente de eventos climáticos como estiagens, geadas, doenças e incidência de pragas, capazes de comprometer a manutenção da diversidade genética (DULLOO et al., 2009), pois podem ocasionar a perda de patrimônio genético ou mesmo, a erosão genética.

Visando garantir o armazenamento seguro e por tempo indeterminado de recursos genéticos para espécies de café tem sido estudada a conservação de sementes em temperatura ultra-baixa utilizando nitrogênio líquido (-196 °C) (EIRA et al., 2002; DUSSERT; ENGELMANN, 2006). Entretanto, ainda não estão completamente elucidadas as alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares que ocorrem em sementes de café armazenadas em temperatura ultra-baixa. Nesse contexto, a ampliação do conhecimento em nível molecular dos efeitos da criopreservação sobre a viabilidade das sementes de café é considerada de grande importância para auxiliar a elucidação desses mecanismos uma vez que auxilia a compreensão e interpretação de resultados fisiológicos, bioquímicos e moleculares obtidos por meio de diferentes metodologias de crioconservação.

Neste estudo avaliou-se a expressão de genes em sementes de café submetidas a diferentes protocolos de dessecação, pré-resfriamento e reaquecimento visando à criopreservação com objetivo de ampliar o entendimento sobre a expressão desses genes em sementes de café criopreservadas e relacionar sua expressão à qualidade fisiológica apresentada pelas sementes avaliadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café

O cafeeiro é uma planta perene pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. A família Rubiaceae apresenta cerca de 100 espécies, das quais apenas duas possuem expressão econômica: *Coffea arabica* L., conhecida como café arábica e *Coffea canephora* Pierre, conhecida como café robusta (BORÉM et al., 1999). Estas espécies correspondem, respectivamente, a 70 e 30% do volume de café comercializado no mundo, sendo o Brasil responsável por 33,60% da produção mundial (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2016b). Devido à grande importância da produção cafeeira para a economia nacional, o café é considerado uma das principais *commoditys* brasileiras.

O café se destaca em importância desde o seu estabelecimento no país, no século XIX, pois proporcionou o estabelecimento de um cenário permeado por oportunidades, investimento e expectativa de lucro, marcando a história política brasileira de meados do século XIX até o terceiro decênio do século XX. A partir desse período, o desenvolvimento da cafeicultura no Brasil teve grande relevância na balança econômica nacional, na geração de emprego e como aspecto cultural.

O café também se destaca pela rica composição nutricional, pois é fonte de aminoácidos, vitaminas, minerais e ácidos clorogênicos, que são compostos responsáveis pela modulação do estado de humor (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2016a).

Visando satisfazer a demanda da cadeia produtiva do café e dos consumidores do Brasil e do mundo, as instituições de pesquisa têm investido no aprimoramento de técnicas de cultivo e processamento pós-colheita, no desenvolvimento de técnicas para análise da qualidade de sementes e na produção de cultivares de café com maior nível de resistência a pragas e doenças e maior produtividade que as atuais cultivares elite. Todo esse investimento na produção e na qualidade de sementes é fundamental para o desenvolvimento do agronegócio café e permite que o Brasil se encontre em posição de destaque na produção e comercialização desta *commodity*, uma vez que as sementes ainda são o principal material propagativo utilizado para o melhoramento da cultura e é por meio destas que são produzidas mudas da espécie *C. arabica* L.

2.2 Sementes de café

No cafeeiro as sementes se encontram armazenadas no interior de frutos do tipo drupa elipsóide (RENA et al., 1986). Estes frutos geralmente possuem dois lóculos e duas sementes, podendo ocasionalmente, conter três ou mais.

A semente de café é formada por células poliédricas com parede espessa, sendo envolvida pelo endocarpo ou pergaminho que é uma estrutura componente do fruto, mas que também acompanha a semente. Morfologicamente, a semente de café se caracteriza como plano-convexa, elíptica ou oval, possui um sulco longitudinal na face plana e é constituída pelo endosperma, embrião e espermoderma, sendo este último, também conhecido como película prateada. O embrião localiza-se na superfície convexa da semente e somente após o desenvolvimento do endosperma inicia sua diferenciação (RENA et al., 1986). Este é formado por um eixo hipocótilo-radicular e dois cotilédones. O endosperma é o principal tecido de reserva em sementes de café e atua fornecendo energia para o processo de germinação e de emergência. Segundo Shimizu e Mazzafera (2000), é o tecido que apresenta maior volume na semente, representando 95% de sua massa seca. A composição química do grão de café é variável, podendo ser influenciada principalmente por fatores genéticos, métodos de colheita, processamento, armazenamento e condições climáticas inerentes a cada região de cultivo (PIMENTA et al., 2000).

A deterioração de sementes é um processo que envolve complexas alterações e interfere no potencial fisiológico da semente. Segundo McDonald (2004), este processo resulta no aumento da vulnerabilidade das sementes a alterações externas e na redução da habilidade das mesmas em sobreviver. A velocidade de deterioração é determinada principalmente pela interação entre o genótipo e o ambiente; sendo este último representado principalmente pela temperatura do local e pela umidade relativa, as quais interferem diretamente no teor de água das sementes (DELOUCHE, 2002). Além disso, os pré-tratamentos e as condições de armazenamento às quais a semente é submetida também influenciam sobremaneira a viabilidade da mesma e, conseqüentemente, seu tempo de estocagem.

Para fins de armazenamento do germoplasma vegetal, atualmente considera-se que o modo mais apropriado é a utilização de sementes, pois geralmente possuem tamanho reduzido, ocupam pequeno espaço, demandam menor custo para estocagem e são de fácil manuseio (RAMALHO et al., 2012). No caso do cafeeiro, as sementes da espécie *Coffea*

arabica L. e *Coffea canephora* Pierre são caracterizadas como intermediárias (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ARAÚJO et al., 2008), uma vez que apresentam baixa longevidade e sensibilidade à dessecação em níveis inferiores a 10% de umidade (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Esse fato impossibilita seu armazenamento em bancos de sementes convencionais. Como método alternativo para manutenção do germoplasma por longo período de tempo, têm sido realizado o armazenamento *in vivo*, ou seja, coleções de plantas vivas mantidas em condições de campo (EIRA et al., 2006; RAMALHO et al., 2012). Entretanto, este sistema de preservação é mais dispendioso, necessita de maior quantidade de mão-de-obra para sua manutenção e está mais vulnerável a desastres naturais como fogo e incidência de pragas e doenças; o que põe em risco a conservação da variabilidade genética destas espécies. Por essa razão, considera-se que a conservação por meio da criopreservação seja a técnica mais promissora para preservação de recursos genéticos vegetais para espécies que produzem sementes intermediárias, como o café. Entretanto, ainda não estão elucidados os mecanismos fisiológicos e moleculares de desidratação, resfriamento e aquecimento visando à criopreservação de sementes desta espécie.

2.3 Criopreservação

A criopreservação consiste no armazenamento de materiais biológicos em temperatura ultra-baixa, geralmente por meio da imersão em nitrogênio líquido (-196 °C) ou do contato do material com a fase de vapor do nitrogênio líquido (-135 °C) (DAY et al., 2008; HAMILTON; TURNER; ASHMORE, 2009; TRIGIANO; GRAY, 2011). As técnicas de criopreservação de vegetais baseiam-se na desidratação do material ao ponto de mantê-lo vivo, mas com baixo metabolismo e em seguida, o congelamento deste, possibilitando que o citoplasma seja vitrificado uniformemente, sem comprometer a membrana celular (TRIGIANO; GRAY, 2011).

Devido a possibilidade de criopreservar materiais biológicos que apresentam sensibilidade à dessecação e baixa longevidade em menor espaço que o necessário para armazenamento em condições de campo e por longo período de tempo, esta técnica tem sido considerada promissora para a preservação da biodiversidade e para o armazenamento de materiais que apresentem superioridade genética em ensaios experimentais (FAZUOLI, 1986; FERNANDES et al., 2008; KACZMARCZYK; ROKKA; KELLER, 2011). Entretanto, o

processo de criopreservação pode causar danos a estrutura celular do material a ser preservado e desse modo, comprometer a viabilidade do material, ou mesmo, resultar na sua morte.

O sucesso de um protocolo de criopreservação está intimamente relacionado à manutenção da integridade celular durante o processo de resfriamento do material, pois a lenta formação de gelo pode causar danos físicos à membrana celular e organelas. Segundo Trigiano e Gray (2011), a lenta redução da temperatura a níveis abaixo de zero grau, resulta na formação de gelo nos espaços intracelulares. Este gelo ocasiona a formação de um gradiente osmótico que resulta no estabelecimento de fluxo de água do interior da célula para os espaços extracelulares, e devido à baixa temperatura encontrada nestes espaços, a água que chega nesta região passa do estado líquido para o sólido formando mais gelo e ocupando maior volume do que a água em estado líquido ocuparia. Esse fato causa danos físicos irreversíveis à membrana celular. Na natureza, a formação de gelo em espécies de ambientes temperados somente ocorre quando a temperatura na superfície vegetal chega a aproximadamente $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TRIGIANO; GRAY, 2011). Isso ocorre porque estes vegetais possuem crioprotetores naturais que constituem um eficiente mecanismo para evitar a ocorrência de danos ocasionados pelo congelamento. As substâncias crioprotetoras em plantas geralmente são açúcares, proteínas ou aminoácidos. Entretanto, em várias espécies vegetais o frio causa danos celulares mesmo antes de ocorrer formação de gelo. Em outras espécies, a desidratação do citoplasma causada devido ao estabelecimento de um fluxo de água do espaço intracelular para o extracelular, pode ser suficiente para ocasionar dano letal (TRIGIANO; GRAY, 2011).

Antes da imersão em nitrogênio líquido, as sementes devem ser submetidas à secagem. Assim, além dos danos durante a etapa de resfriamento, as sementes estão sujeitas aos danos durante a etapa de dessecação. Dentre os principais danos que ocorrem em sementes devido a dessecação destacam-se a desestruturação de macromoléculas e a oxidação de lipídeos nas membranas celulares. Segundo Chen e Burris (1990) as membranas celulares podem ser consideradas os sítios primários de danos causados pela dessecação e este tipo de dano é responsável pela perda parcial da semi-permeabilidade das membranas e resulta em aumento da condutividade elétrica e lixiviação de várias soluções citoplasmáticas, como íons, açúcares e proteínas durante a reidratação dos tecidos das sementes secas. As membranas biológicas possuem a bicamada lipídica em estado líquido cristalino com movimentos rotacionais e laterais das cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídeos dentro da bicamada quando as células estão hidratadas e em temperaturas biológicas. Com a secagem, a disposição dos fosfolipídeos

muda da configuração lamelar para hexagonal, causando disfunção dessa membrana de forma reversível ou irreversível, dependendo do grau de dessecação e da natureza dos fosfolipídeos que a compõem (GUIMARÃES, 1999).

O processo de dessecação e resfriamento de sementes também pode ocasionar a perda de viabilidade ou envelhecimento das mesmas devido a ocorrência de peroxidação de compostos na presença de oxigênio (HENDRY et al., 1993). Isso ocorre devido a formação de espécies de oxigênio altamente reativas (EROs), também conhecidas como radicais livres. Estas EROs reagem com os lipídeos de membrana, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outras macromoléculas. Como consequência ocorre a diminuição da composição lipídica, redução da competência respiratória e aumento na produção de compostos voláteis como aldeídos. Devido a essa alteração do metabolismo de compostos primários e de funções básicas celulares ocorre a alteração do funcionamento biológico celular. Isso resulta em aumento da velocidade de deterioração da célula e pode ocasionar a desintegração da membrana seguida por morte celular (LEPRINCE; BUITINK; HOEKSTRA, 1999). Ao nível de organismo, as EROs podem levar à ocorrência de danos necróticos no meristema apical, diminuição da produção e desenvolvimento de raízes, principalmente em espécies tropicais ou subtropicais que produzem sementes recalcitrantes (BERJAK et al., 2011).

2.3.1 Espécies de oxigênio altamente reativas

Espécies de oxigênio altamente reativas são formas parcialmente reduzidas de oxigênio (O_2) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH^-) e o oxigênio singlet (1O_2). O peróxido de hidrogênio pode ser produzido pelas enzimas peroxissomais associadas ao metabolismo de ácidos graxos e pelas enzimas citoplasmáticas responsáveis pela oxidação de metabólitos celulares. É considerado pouco reativo, pois não ataca diretamente os vários componentes celulares, mas pode atravessar facilmente as membranas biológicas e se difundir por distâncias consideráveis (VOLZ-THOMAS et al., 2003). O ânion superóxido é uma molécula que possui um elétron desacoplado, e por essa razão, pode reagir com outras moléculas para estabilizar-se (BAILLY, 2004). Esse radical é considerado uma espécie pouco reativa, pois não se difunde por distâncias consideráveis a partir do seu sítio de produção; entretanto, é possível a sua combinação com outras espécies, formando uma espécie mais reativa (VOLZ-THOMAS et al., 2003). O radical hidroxil é considerado a espécie mais reativa dentre as EROs, pois é

capaz de reagir com várias biomoléculas produzindo derivados que não podem ser regenerados pelo metabolismo celular. Entretanto, possui vida média curta e reage apenas em seu próprio sítio de formação (VOLZ-THOMAS et al., 2003). O oxigênio singlet (1O_2) é formado pela oxidação de outras espécies reativas de oxigênio e atua em duplas ligações, tais como as ligações dos ácidos graxos poliinsaturados ou nas guaninas em bases de DNA (DIPLOCK, 1998).

A peroxidação de compostos devido a EROs é um processo natural e ocorre em todas as células, porém, nas células embebidas, a água age como uma barreira entre a geração de radicais livres e as macromoléculas alvo, reduzindo o dano (HENDRY et al., 1993). Desse modo, a desidratação causada pelo frio atua acelerando este processo de deterioração natural e reduzindo a viabilidade de sementes.

A intensidade da peroxidação de compostos, bem como outras danificações como perda de proteínas associadas às membranas depende dos mecanismos de proteção desenvolvidos na semente durante a segunda metade do processo de sua formação, tais como a presença de açúcares solúveis, antioxidantes e algumas proteínas com ação crioprotetora (HENDRY et al., 1993).

2.4 Expressão gênica e criopreservação

O rápido desenvolvimento de tecnologias na área da biotecnologia tem gerado expectativas sobre a ampliação do conhecimento de vias regulatórias e genes que controlam a tolerância à dessecação e à baixas temperaturas. Por meio da compreensão desses mecanismos espera-se benefícios como a produção de culturas mais tolerantes a estresses abióticos e o desenvolvimento de estratégias para melhor preservar a biodiversidade genética *ex situ* (FALEIRO, 2007). Um exemplo desse avanço biotecnológico é o desenvolvimento da PCR em tempo real, técnica capaz de quantificar a expressão de genes no momento fisiológico de interesse. A determinação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos possibilita a identificação de genes e o estudo de sua função metabólica.

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação contida em um gene é usada para a síntese de um produto gênico funcional. Esse produto gênico funcional pode ser um RNA mensageiro (mRNA), um RNA não-codante (ncRNAs), e polipeptídeos (SANTOS, 2010).

A maior parte dos trabalhos sobre expressão gênica em sementes de café se concentra em temas relacionados à qualidade da bebida (GEROMEL et al., 2006), desenvolvimento da semente e do grão (PEREIRA et al., 2005; SALMONA et al., 2008), maturação dos frutos (BUDZINSKI, 2011) e via biosintética da cafeína (PERROIS et al., 2015) e dos ácidos clorogênicos (LIN et al., 2005). Poucos estudos têm sido realizados visando compreender a atuação dos genes responsáveis pelas alterações moleculares em vegetais expostos a condições adversas de frio e dessecação visando à criopreservação do material. Por essa razão, segundo Harding (2004), essa área de estudo carece de investimento em pesquisas básicas e aplicadas.

Os poucos estudos genéticos realizados com o tema criopreservação geralmente avaliam a expressão de genes relacionados à proteção contra danos oxidativos decorrentes da peroxidação lipídica, ocorridos durante os períodos de dessecação e reidratação (DUSSERT et al., 2006; VOLK, 2010). Desse modo, faz-se necessário o estudo da expressão de genes relacionados à proteção celular contra outros eventos decorrentes da criopreservação, tais como, danos e reparos no DNA, bem como a continuação dos estudos de genes relacionados aos danos por dessecação e ao sistema antioxidante celular.

2.4.1 Danos por dessecação

A compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na tolerância de plantas à dessecação é de grande importância à criopreservação de plântulas e sementes, pois, segundo Berjak e Pammenter (2013), a dessecação pode ser considerada uma das principais causas de danos celulares associados a criopreservação (BERJAK; PAMMENTER, 2013).

Vários genes têm sido associados à resposta vegetal ao estresse por dessecação. A família *Mannose-binding lectin* (MBL) é induzida em resposta a estresses bióticos e abióticos como dessecação e salinidade (Zhang et al., 2000). Seus membros atuam no transporte e imobilização de carboidratos (Boyd, 1963) e na sinalização celular para a resposta ao estresse salino (SOUZA FILHO et al., 2003).

As esterases (carboxil-esterhidrolases) são enzimas que atuam em diferentes processos fisiológicos vegetais, tais como a maturação, o crescimento e a regeneração celular, uma vez que atuam na hidrólise de ésteres. Entretanto, a maior parte dos estudos sobre esta enzima está relacionada a tolerância de plantas aos inseticidas pois, as esterases possuem importante

função catalítica na desintoxicação celular (LI; SCHULER; BEREMBAUM, 2007; NAUEN, 2007; RUSSEL et al., 2011).

As proteínas abundantes durante a embriogênese tardia ou “*late embryogenesis abundant*” (LEA) são proteínas hidrofílicas que se acumulam durante estágios tardios de desenvolvimento das sementes, tecidos tolerantes a dessecação e em sementes submetidas a secagem (GRAETHER; BODDINGTON, 2014). Estudos recentes comprovam a regulação positiva das LEA em muitas espécies vegetais em resposta a diversos estresses abióticos, tais como deficiência hídrica causada por seca ou salinidade e temperaturas extremas como as encontradas em condições de frio ou congelamento (BATTAGLIA; COVARRUBIAS, 2013). As LEA também desempenham múltiplas funções nas células desseçadas e também estão relacionadas a homeostase de proteínas e ácidos nucleicos, estabilidade das membranas celulares e no balanço redox (TUNACLIFF et al., 2010). Essa característica versátil pode ser devido a sua diferenciada constituição de aminoácidos.

Dehidrinas são genes pertencentes à família das LEA. As proteínas codificadas por este gene são constituídas de porções hidrofóbicas capazes de se ligar a lipídeos e outras proteínas contribuindo para a estabilização de proteínas e de componentes celulares, evitando a ocorrência de modificações na fluidez das membranas e auxiliando na aquisição da conformação protéica (GRAETHER; BODDINGTON, 2014). Além da função crioprotetora de membranas, também atuam na proteção contra EROs (WISNIEWISK et al., 2006) e contra o estresse causado por drástica desidratação, frio ou devido à alta salinidade do solo, uma vez que sob essas condições de estresse é observado o aumento da taxa de tradução e, conseqüentemente, dos níveis dessa proteína na célula (GRAETHER; BODDINGTON, 2014). Entretanto, segundo Zhu et al. (2000), observaram que há especificidade e resposta diferencial das variadas classes de desidrinas às situações de estresse, havendo, portanto, classes que não respondem a específicas situações.

O gene isocitrato liase (ICL) atua na regulação do ciclo do glioxilato e no desenvolvimento de atividades nos glioxissomos. No ciclo do glioxilato, os lipídios insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis (sacarose), os quais são deslocados para os meristemas radiculares e apicais, onde são utilizados como fonte de energia para célula durante a germinação (TAIZ; ZEIGER, 2004). A atividade da enzima isocitrato liase, segundo Bewley e Black (1994), aumenta durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos no ponto em que ocorre a maior taxa de degradação de lipídios e síntese de

sacarose. Assim, atividade desta enzima tem sido considerada indicadora de germinação em sementes (IGAMBERDIEV; LEA, 2002).

Santos, Von Pinho e Rosa (2013), avaliaram a expressão do gene que codifica a enzima ICL em sementes de *C. arabica* e *C. canephora* submetidas a dessecação e em sementes frescas. Nesse trabalho, os autores observaram que sementes dessecadas apresentaram menor taxa de transcritos que as frescas e, portanto, indica a redução da expressão deste gene em condição de dessecação.

2.4.2 Danos e reparos no DNA

O genoma das plantas contém as informações que determinam o comportamento biológico das espécies e a adaptação ao ambiente sendo, portanto, capaz de influenciar na viabilidade de plantas e sementes. Nesse contexto, materiais vegetais criopreservados geralmente apresentam alterações no DNA especialmente ao nível epigenético e sob essas condições, é comum a ocorrência de alterações nos padrões de metilação (HAO; LIU; DENG, 2001; HAO; YAOU; DENG, 2002). Em condições de estresse salino e osmótico Dyachenko et al. (2006) observaram que o aumento dos níveis de metilação no DNA está relacionado a tolerância de plantas a esse tipo de estresse.

A regulação do nível de metilação do genoma é extremamente complexa envolvendo a atuação de inúmeras enzimas e expressão de genes que são influenciados pelo ambiente. Nesse processo regulatório o gene DNA metilase (DNA-met) apresenta considerável importância, pois, atua diretamente na supressão de determinados genes e na alteração da estrutura da cromatina para formas condensadas. As metilações do DNA transferem um grupo metil para a posição 5' do anel pirimídico das citosinas, catalizadas pela enzima metiltransferase (GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007) acarretando o silenciamento gênico (FUCHS et al., 2006).

Um dos modelos propostos para explicar a natureza repressora da metilação do DNA sugere que esta metilação pode atuar como agente bloqueador que inibe fisicamente a interação do DNA com os fatores de transcrição e outras proteínas que se ligam ao DNA essenciais à transcrição (CEDAR; BERGAMAN, 2012).

A metilação do DNA tem sido associada com modificações no padrão da expressão gênica em numerosas espécies de plantas, sendo que o padrão de metilação é variável entre os órgãos vegetais (HARDING, 2004). Desse modo, algumas sequências de DNA não metiladas

em sementes tornam-se metiladas em plântulas. A idade do tecido também pode alterar o padrão de metilação do DNA, podendo ter um caráter regulatório, e possivelmente está associada a transição do desenvolvimento em plantas (SULIMOVA et al., 1978).

Condições de hipotermia ou congelamento podem induzir a morte celular por apoptose devido ao desbalanço iônico, redução da energia disponível para os processos metabólicos, produção e acúmulo de radicais livres, alterações na permeabilidade da membrana celular e desnaturação de proteínas ocasionados sob estas condições (BAUST et al., 2009, BAUST, 2010). A apoptose é um fenômeno natural essencial aos organismos, no entanto, altas taxas apoptóticas podem ser consideradas prejudiciais ao desenvolvimento e sobrevivência dos mesmos e, por essa razão, a morte celular programada sofre constante regulação gênica.

Recentemente inúmeros genes envolvidos no processo apoptótico têm sido identificados, como por exemplo, o inibidor de apoptose (APOP) que é responsável pela codificação da proteína nuclear Api5 (LI et al., 2011). Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. Tem sido observado que o uso de inibidores de apoptose resulta no aumento da eficiência da criopreservação, pois atuam inibindo proteínas envolvidas na cascata de morte celular e resulta na redução da intensidade do processo apoptótico, no aumento da viabilidade celular e manutenção das funções celulares (BISSOYI et al., 2014).

Outro gene indispensável ao desenvolvimento e sobrevivência de vegetais é a telomerase. Este gene é importante para a proteção dos cromossomos contra fusões de suas extremidades e evita a perda de sequências teloméricas durante a replicação do material genético. Assim, contribui para a ocorrência de uma divisão celular normal. Boubriak et al. (2007) detectou a perda progressiva dos telômeros em sementes submetidas à secagem e estocadas por longos períodos e observou uma correlação direta entre a qualidade da germinação e a estabilidade dos telômeros. A fragmentação do telômero e sua restauração têm sido associada ao envelhecimento de sementes por Boubriak et al. (2007) e Riha et al. (1998).

O mecanismo de ação da enzima telomerase baseia-se na adição de repetições teloméricas, produzidas por uma transcriptase reversa especializada, às extremidades do telômero. Isso evita que ocorra o encurtamento telomérico e, conseqüentemente, a perda de informação genética durante o processo de replicação e compensa a inabilidade da DNA polimerase em replicar a porção final da extremidade 5' da molécula de DNA (SEXTON; COLLINS, 2011).

O gene *Apetala2* (*AP2*) apresenta importância para a sobrevivência e vigor da plântula, pois, participa da determinação do tamanho, peso e acúmulo de óleo e proteínas em sementes (JOFUKU et al., 2005). Segundo Maes et al. (2001), LICAUSI et al. (2013) e WANG et al. (2016) este gene também está envolvido na resposta da planta a vários tipos de estresses e atua como fator de transcrição de genes associados ao desenvolvimento da planta, a tolerância a desidratação, ao frio e ao estresse osmótico.

2.4.3 Danos devido ao estresse oxidativo

Plantas expostas a condições ambientais estressantes, produzem maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs); o que pode causar significantes danos celulares. Entretanto, elas possuem um eficiente sistema antioxidante capaz de realizar a desintoxicação. Segundo Asada (1992), o maior sistema de desintoxicação de peróxido de hidrogênio corresponde ao ciclo ascorbato-glutationa, do qual, o gene ascorbato peroxidase (*APX*) apresenta importante papel na síntese de enzima de mesmo nome que atua na catalização da reação de conversão de H_2O_2 em H_2O , utilizando o ascorbato como doador de elétron para reduzir H_2O_2 em água.

A codificação da *APX* depende da interação entre fatores genéticos e estímulos ambientais, como por exemplo, a sensibilidade em níveis endógenos de ascorbato, aos estresses salino, por desidratação, alta quantidade de luz, alta e baixa temperatura, ação patogênica, concentração de peróxido de hidrogênio e ácido abscísico (SHIGEOKA et al., 2002; ROSA et al., 2010; BONIFACIO et al., 2011). Por exemplo, Pinheiro et al. (2004), ao avaliar quatro clones de *Coffea canephora*, dois tolerantes e dois suscetíveis à deficiência hídrica, constataram que houve aumento da produção da enzima *APX* principalmente nos clones que apresentaram suscetibilidade ao estresse hídrico. De acordo com os autores, esse aumento constituiu um mecanismo de defesa dos clones contra o aumento do processo oxidativo resultante do estresse hídrico, uma vez que os danos referentes a oxidação são mais frequentes em clones suscetíveis.

Outro gene com importante papel na desintoxicação celular em condições de acúmulo de peróxido de hidrogênio é o glutathione-S-transferase (*GST*). Este gene é responsável pela codificação de uma enzima que é integrante do ciclo ascorbato-glutationa e atua na desintoxicação de compostos xenobióticos, sendo, portanto, mais conhecida por desempenhar a função de desintoxicação de plantas contra herbicidas (EDWARDS; DIXON; WALBOT,

2000). Entretanto, diversos estudos comprovam que esta proteína também está envolvida na resposta biológica contra o estresse oxidativo, toxicidade provocada por metais pesados e ataque de patógenos (EDWARDS; DIXON; WALBOT, 2000).

Esta proteína atua basicamente na catálise da reação de conjugação da GSH (forma reduzida da NADPH-dependente da glutathiona oxidada, que é um subproduto do ciclo ascorbato-glutathiona) a substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, geralmente fitotóxicos, produzindo conjugados solúveis em água; o que reduz sua toxicidade e facilita a excreção. Essa reação de conjugação é realizada pela ligação do grupo sulfidrílico da glutathiona com grupos eletrofílicos de compostos tóxicos (FOYER; NOCTOR, 2005). Diferentes compostos como por exemplo, xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares, como peroxidação de lipídeos, atuam como substratos para esta enzima (VAN DER AAR et al., 1996). Desse modo, nos diferentes organismos onde esta enzima atua já foram descritas várias funções como por exemplo, a tolerância ao estresse oxidativo (EDWARDS; DIXON; WALBOT, 2000; KAMPRANIS et al., 2000), transporte de produtos secundários tóxicos (MUELLER et al., 2000) e sinalização celular durante a resposta ao estresse (LOYALL et al., 2000).

O gene catalase (CAT) apresenta importante papel na decomposição de H_2O_2 em H_2O . A enzima produzida apresenta uma atividade catalítica de 10^7 min^{-1} , não é facilmente saturada por substratos e é considerada um dos principais oxidorredutores da natureza (SCANDALIOS, 2005). Está localizada no citoplasma, nas mitocôndrias, peroxissomos de folhas e glioxissomos (BATKOVÁ et al., 2008).

Dependendo da concentração de H_2O_2 a enzima catalase pode exercer função peroxidativa ou catalítica. Em baixas concentrações de H_2O_2 ($< 1 \mu\text{M}$), possui ação peroxidativa, ou seja, transforma o peróxido de hidrogênio em água a partir da oxidação de uma variedade de moléculas, como etanol e ácido ascórbico. Em altas concentrações de substrato, possui ação catalítica na qual o peróxido de hidrogênio pode agir comoceptor ou doador de moléculas de hidrogênio (SCANDALIOS et al., 2005).

Ambos os genes APX e CAT atuam no processo de desintoxicação celular transformando peróxido de hidrogênio em água, entretanto, segundo Mittler (2002), há diferença de afinidade entre a enzima ascorbato peroxidase e a catalase pelo H_2O_2 . Considerando as peculiaridades para o estabelecimento da afinidade pelo substrato, o autor sugere que a APX seja responsável pela fina modulação das EROs para sinalização, enquanto a CAT seja responsável pela remoção do excesso de EROs durante o estresse.

Santos et al. (2014) avaliou a atividade da enzima catalase em sementes de café com diferentes estádios de desenvolvimento após submetidas ao estresse por secagem. Neste trabalho os autores verificaram que há aumento da atividade desta enzima conforme o processo de maturação e deterioração avança.

As peroxidases (POX) são oxidoredutases cuja função é catalizar reações oxidativas que usam H_2O_2 como aceptor de elétrons. Em plantas, as POXs contribuem para a integridade estrutural das paredes celulares agindo na biossíntese de lignina, na suberização e formação da parede celular (GIJSEN, 1997). Além disso, estão fortemente relacionadas com mecanismos de proteção antioxidativa, pois, a indução da atividade da peroxidase constitui um mecanismo utilizado para reduzir os níveis de H_2O_2 e peróxidos orgânicos formados sob diferentes condições de estresse (ROSSI; LIMA; HAKVOORT, 1997).

Superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EROs nas células (FOYER; NOCTOR, 2005). A SOD corresponde a um grupo de metaloenzimas que catalizam a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxido (O_2^-). Esta reação apresenta grande importância principalmente porque o radical O_2^- é mais tóxico do que o H_2O_2 .

O gene Metalotioneína (MT) está relacionado a homeostase de metais, a remoção de espécies reativas de oxigênio e a tolerância a desidratação (HASSINEN et al.; 2011). Zhou et al. (2012) verificaram que sementes de lótus expostas a altas salinidades, metais pesados e na presença de EROs apresentam maior expressão deste gene em relação ao tratamento controle. No mesmo estudo, foi observado que sementes transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, que superexpressavam este gene, apresentaram maior tolerância a altas salinidades e ao envelhecimento. Esse fato evidencia a correlação deste gene com o maior vigor de sementes. Conjuntamente com esses dados foi possível observar uma maior atividade das enzimas que removem as EROs (ZHOU et al.; 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

As extrações, as quantificações do RNA, sínteses de cDNA e as reações de PCR em tempo real foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular, do Centro de Café “Dr. Alcides Carvalho” do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

A análise dos dados foi realizada no Setor de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Material vegetal

Para estudar a expressão gênica foram utilizadas sementes de *C. arabica* da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 obtidas de trabalho de tese realizado na UFLA com o objetivo de investigar tratamentos e protocolos de criopreservação em sementes de café (FIGUEIREDO, 2016). A coleta dos frutos e o processamento das sementes estão descritos na referida tese, sendo aqui utilizados os seguintes tratamentos de criopreservação: 1. sementes secadas em sílica gel até o teor de água de 20% (bu), pré-resfriadas até -40 °C em velocidade de 1 °C/minuto, armazenadas em nitrogênio líquido por 36 horas e aquecidas em banho maria por dois minutos em 40 °C; 2. sementes secadas em sílica gel até o teor de água de 20% (bu), pré-resfriadas até -40 °C em velocidade de 1 °C/minuto, armazenadas em nitrogênio líquido por 36 horas e aquecidas em banho maria por quatro minutos em 40 °C; 3. sementes secadas em sílica gel até o teor de água de 20% (bu), pré-resfriadas até -40 °C em velocidade de 1 °C/minuto, armazenadas em nitrogênio líquido por 36 horas e aquecidas em banho maria por seis minutos em 40 °C; 4. sementes secadas em sílica gel até o teor de água de 17% (bu), pré-resfriadas até -40 °C em velocidade de 1 °C/minuto, armazenadas em nitrogênio líquido por 36 horas e aquecidas em banho maria por dois minutos em 40 °C; 5. sementes secadas em sílica gel até o teor de água de 17 % (bu), pré-resfriadas até -40 °C em velocidade de 1 °C/minuto, armazenadas em nitrogênio líquido por 36 horas e aquecidas em banho maria por quatro minutos em 40 °C; 6. sementes secadas em sílica gel até o teor de água de 17% (bu), pré-resfriadas até -40 °C em velocidade de 1 °C/minuto, armazenadas em nitrogênio líquido por 36 horas e aquecidas em banho maria por seis minutos em 40 °C; 7. sementes secadas em solução saturada de sal de sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄], 85% UR, até teor o de água de

17% (bu), pré-resfriadas até $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ em velocidade de $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, armazenadas em nitrogênio líquido por 36 horas e aquecidas em banho maria por dois minutos em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 8. sementes secadas em sal de cloreto de sódio (NaCl), 75 % UR, até o teor de água de 17% (bu), armazenadas em nitrogênio líquido por 36 horas e aquecidas em banho maria por dois minutos em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amostras de sementes de café oriundas destes tratamentos constituíram o material vegetal cuja expressão gênica foi avaliada no presente trabalho. Para fins de armazenamento este material foi guardado em deepfreezer à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

Os resultados de expressão gênica foram discutidos e comparados aos resultados das avaliações fisiológicas das sementes, visando compreender as alterações metabólicas que ocorrem em sementes de café submetidas à criopreservação. Para efeito de comparação entre as velocidades de secagem proporcionadas pelos agentes dessecantes na criopreservação das sementes considerou-se que a sílica gel proporcionou secagem rápida das sementes, pois, o grau de umidade almejado (17% e 20% bu) foi obtido após um período de 45 horas enquanto que o sulfato de amônio e o cloreto de sódio proporcionaram secagem lenta, uma vez que o grau de umidade almejado (17% bu) foi obtido após um período de 403 e 188 horas, respectivamente. As avaliações fisiológicas das sementes foram realizadas por Figueiredo (2016), onde foram feitas as seguintes determinações (tabela 1): germinação de sementes em germinador a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ na presença de luz (BRASIL, 2009) utilizando rolo de papel tipo germitest e quatro repetições de 25 sementes para avaliar a protrusão radicular (PR) após 15 dias de semeadura, a porcentagem de plântulas normais (PN) após os 30 dias de semeadura, a porcentagem de plântulas normais fortes (PNF) e a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) aos 45 dias após a semeadura; massa seca de plântulas após secagem em estufa de circulação forçada de ar à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 - 5 dias ou até obter massa constante utilizando balança de precisão para determinar a massa seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA) das plântulas normais (cg); teste de tetrazólio utilizando quatro repetições de 10 sementes embebidas em água por 36 horas para a extração dos embriões de acordo com a metodologia recomendada por Brasil (2009) para determinar a porcentagem de embriões viáveis (EV); teste de condutividade elétrica (CE) utilizando quatro repetições de 25 sementes para determinar a condutividade elétrica das sementes imersas em água destilada por 24 horas à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1 – Valores médios de protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas normais fortes (PNF), folhas cotiledonares (FC), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), embriões viáveis no teste de tetrazólio (EV) e condutividade elétrica (CE) de sementes de café criopreservadas.

| Id | PR (%) | PN (%) | PNF (%) | FC (%) | MSR (cg) | MSPA (cg) | EV (%) | CE (%) |
|-------|--------|--------|---------|--------|----------|-----------|--------|---------|
| 1 | 41,5 b | 33,0 d | 9,5 c | 31,0 d | 5,75 d | 35,80 c | 75,0 b | 14,40 a |
| 2 | 43,0 b | 31,0 d | 9,5 c | 30,5 d | 5,84 d | 34,39 c | 56,3 c | 14,30 a |
| 3 | 46,5 b | 42,5 c | 8,0 c | 42,0 c | 8,16 d | 45,71 c | 56,3 c | 15,36 b |
| 4 | 90,0 a | 78,5 b | 21,0 b | 78,0 b | 15,51 b | 89,10 b | 90,0 a | 14,16 a |
| 5 | 89,0 a | 80,0 b | 21,5 b | 80,5 b | 13,95 c | 84,64 b | 95,0 a | 13,78 a |
| 6 | 90,5 a | 79,5 b | 19,5 b | 79,5 b | 13,41 c | 86,34 b | 93,8 a | 13,66 a |
| 7 | 94,5 a | 89,0 a | 31,5 a | 87,5 a | 16,80 b | 98,83 a | 87,5 a | 16,08 b |
| 8 | 97,0 a | 93,5 a | 10,0 c | 93,5 a | 26,71 a | 104,43 a | 91,3 a | 12,62 a |
| CV(%) | 10,95 | 13,18 | 42,06 | 13,52 | 17,68 | 15,62 | 10,44 | 10,36 |

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Skott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade. Tratamentos de 1-3: secagem das sementes em sílica gel até 20% de umidade, pré-resfriadas até -40 °C, imersão em nitrogênio líquido, e reaquecimento a 40°C por 2 minutos (1), 4 minutos (2) e 6 minutos (3). Tratamentos de 4-6: idem às condições anteriores, porém as sementes foram secadas até 17% de umidade, imersas em nitrogênio líquido, e reaquecidas a 40°C por 2 minutos (4), 4 minutos (5) e 6 minutos (6). Tratamento 7: Secagem em solução saturada de (NH₄)₂SO₄ até 17%, pré-congeladas até -50°C, imersão em nitrogênio líquido e reaquecimento por 2 minutos a 40 °C; Tratamento 8: Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, imersão em nitrogênio líquido e reaquecimento por 2 minutos a 40 °C. Umidades determinadas com base em peso úmido.

Com base na tabela 1 verificou-se que a qualidade fisiológica das sementes variou em função do protocolo de criopreservação empregado.

Os tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram os mais baixos valores médios de PR, PN, PNF, FC, MSR, MSPA e EV, quando comparados aos tratamentos 4-8, portanto, apresentaram menor qualidade fisiológica.

Os tratamentos 4, 5 e 6 apresentaram valores de PN, PNF, FC e MSPA intermediários aos 1, 2, 3 e 7, 8 por isso apresentaram qualidade fisiológica intermediária entre esses tratamentos.

Os tratamentos 7 e 8 apresentaram valores de PN, FC e MSPA maiores que os demais tratamentos; valores de PR, MSR (tratamento 7) e EV estatisticamente iguais aos tratamentos 4, 5 e 6 e PNF (tratamento 8) estatisticamente igual aos apresentados pelos 1, 2 e 3. Considerando as análises fisiológicas realizadas esses tratamentos apresentaram, de forma geral, melhor qualidade fisiológica que os demais.

3.3 Seleção de genes

A expressão de genes relacionados ao estresse por dessecação e estresse oxidativo, bem como, associados a danos e reparos do DNA foi avaliada nas sementes criopreservadas. São eles: isocitrato liase (ICL), *mannose-binding lectin* (MBL), esterase (EST), desidrina (DH), *late abundant protein* (LEA2), telomerase, inibidor de apoptose (APOP), DNA metilase (DNA-Met), apetala 2, metalotioneína (MT), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutationa-s-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX). Os *primers* para a amplificação desses genes foram fornecidos pelo IAC, e suas sequências estão identificadas na tabela 2.

Tabela 2 – Identificação e sequência dos *primers* que codificam para os genes alvo. (continua)

| Identificação | Sequência |
|--|---|
| <i>Genes relacionados a danos por dessecação</i> | |
| Isocitrato liase (ICL) | F - ATCCAGTATCGCCATGAGC R - GGCACAGCATCAAGAACCT |
| <i>Mannose-binding lectin</i> (MBL) | F - GCCTCTTCACTATCTCCTTTACAA R - ACTTTTTTCCTCACCAAACCACCAG |
| Esterase (EST) | F - GTTTTACTGGCCCTTCTGCG R - CAAGACCGTGCAGCCAAAC |
| Dehidrina (DH) | F - AATCACCCATGGTACCTCCA R - TCTCGTCAAATCCACCCATT |
| <i>Late abundant protein</i> (LEA2) | F - CTTGACAGTCTCGGAACCAT R - GCCATCAAGGAGAAAGAGGA |
| <i>Genes relacionados a danos e reparos no DNA</i> | |
| Telomerase | F - TTGTGGACCTTCAAGAGGTTG R - CCTCATGCTTTTGCGAAACT |
| Inibidor de apoptose (APOP) | F - AGTGCTACCTCTGGGCTCAA R - ACCCCAATAAAGGAAGGTG |
| DNA metilase (DNA-Met) | F - GGTGGAATGGGATCCAGATA R - GTGAGGTTCTGCTCGTGTGA |
| Apetala 2 | F - GTTTCGGGCAGTCCATACTC R - CCTCCTCCTTACCCCTCTGT |

Genes relacionados ao estresse oxidativo

| | |
|---------------------------------|--|
| Metalotioneína (MT) | F - ATTCGTCTGCTCTGTGAAGATGT R - ATACATGTTTCCGCAGTTTCCT |
| Catalase (CAT) | F - CCCTTCCCGACTTGCTTTAT R - GTTCCAACGGTGAGAGAGGA |
| Ascorbato peroxidase (APX) | F - TTCCGAATAGAACCGTTTGG R - GGATGCGGAGTACCTGAAAG |
| Glutathiona-s-transferase (GST) | F - GTTCGGAAATGGGTTGAAGA R - AGCAGCAATCCCACATCTTT |
| Superóxido Dismutase (SOD) | F - AGGATGTCAGTCGGGTTTTG R - CTGTGATGTCTGGGAACACG |
| Peroxidase (POX) | F - ATGCATCACATCCCTTGACA R - CAAGCGGAGGCTACCTGTAT (conclusão) |

Para o desenho dos *primers* utilizados foi utilizado o software Primer 3 Plus (UNTERGASSER et al., 2015) para indicar possíveis sequências *Forward* e *Reverse* e o software OligoAnalyser 3.1 (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, 2014) para verificar a temperatura de anelamento (58-60°C), o tamanho do fragmento amplificado (80-150 pb), o valor de variação da energia livre de Gibbs (valor positivo) e a temperatura de formação de harpin (preferencialmente negativa).

3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA foi realizada com o protocolo sugerido por Chang et al. (2003). Amostras de 50 g de sementes que passaram por diferentes metodologias visando à criopreservação foram maceradas em nitrogênio líquido até obter um pó fino. Após a maceração, adicionou-se 25 mL de tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP K10, 100 mM Tris HCL pH = 8,0, 25 mM EDTA, 2 M NaCl 2% de β -mercaptoetanol). Em seguida, esse material foi incubado em banho-maria por 15-20 minutos a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 15 mL de clorofórmio, o material foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. Após, esta etapa a fase aquosa foi recolhida. As etapas da adição de clorofórmio, homogeneização, inversão e centrifugação foram repetidas seis vezes visando obter um RNA de melhor qualidade. Em seguida, foram recolhidos 10 mL da fase aquosa e a

esse material acrescentou-se 3 mL de solução de LiCl 12M livre de RNase. O material obtido ficou em repouso de 0-4°C por 12-18 horas. Após o repouso, foi realizada centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C e descartado o sobrenadante. Posteriormente, o *pellet* foi lavado com 750 µL de solução de LiCl 2,5M livre de RNase e ressuspendido. Após, foi realizada a centrifugação do material a 10.000 rpm durante 10 minutos à 4°C e descartou-se o sobrenadante. Para completa remoção do sobrenadante as amostras foram colocadas para secar no gelo e em capela onde, em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de água tratada com DEPC.

Para avaliar a integridade do material extraído, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo (EtBr) e visualizado sob luz ultravioleta. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro de microvolume, sendo utilizadas as amostras que apresentaram a razão de leitura 260nm/280 nm entre 1,8 e 2,0.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase utilizando o Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita com o RNA tratado e o kit ImProm™ Reverse Transcriptase (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.5 Padronização das reações de qRT-PCR

Foram realizadas quatro diluições para cada amostra de RNA tratado (1500 ng/µl, 1000 ng/µl, 500 ng/µl e 300 ng/µl) para obtenção da concentração do cDNA que resultasse em Cts (*Cycle Threshold*) entre 10 e 30 para garantir um bom padrão de amplificação.

Visando determinar a eficiência dos *primers* foram realizadas reações de PCR utilizando o *primer* na concentração de 10 pM para amplificar as diferentes concentrações das amostras de cDNA. O objetivo foi obter a estimativa da curva padrão, a partir dos valores de Ct e com base nesta curva obter a determinação dos valores de slope e R².

A eficiência do par de *primer* foi calculada por meio da seguinte expressão:

$$\text{Eficiência} = \left[10 \left(\frac{-1}{\text{slope}} \right) \right]^{-1}$$

Após a determinação da concentração ideal do cDNA para uso nas reações e da estimativa da eficiência dos *primers* foram avaliados cinco genes candidatos a normalizadores: ubiquitina carboxil-terminal hidrolase, actina, GAPDH, ubiquitina ligase e fator remodelador da cromatina. Foram utilizados o software BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e o Normfinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004) para avaliação da

estabilidade dos genes na reação de PCR em tempo real. Na tabela 3 encontram-se listados os nomes e sequências dos *primers* que codificam para os genes que foram avaliados.

Tabela 3 – Nome e sequência dos *primers* testados para gene de referência.

| Nome | Sequência |
|--|--|
| Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase | F- CGGACCAGTTTCACATGGTT R- ATGGCCATCACGTTGAAGTT |
| Actina | F- TCAGCACATTCCAGCAGATG R- TAAAAGCTCACCACCCAAG |
| GAPDH | F- GGGATAGGGCTGAGTTCCTC R- TCAATCAGATCCAGCACTCG |
| Ubiquitina ligase | F- GTGGTGGACCAGCAGTAGGT R- TCACTGCCCAGCAATACCA |
| Fator remodelador da cromatina | R- TCACTGCCCAGCAATACCA R- TCACTGCCCAGCAATACCA |

3.6 Expressão gênica

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador ABI Prism 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems), com método de detecção via *SYBR Green*, conforme as especificações do fabricante (Fermentas). Para cada reação, foram utilizados 1000 ng de cDNA. As amostras foram processadas em triplicatas e um controle sem cDNA foi incluído para cada par de *primer* com intuito de verificar a ocorrência de contaminações. Também foi incluído, em triplicata, um controle positivo da reação utilizando o gene de referência escolhido. As reações de PCR em tempo real foram realizadas com 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 45 ciclos de 95°C por 2 min/62°C por 30 seg/72°C por 30 seg.

A expressão gênica foi determinada a partir da normalização da expressão do gene alvo com o gene de referência definido. A normalização foi realizada de acordo com a seguinte expressão:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{gene alvo})} - \Delta Ct_{(\text{calibrador ou testemunha})}$$

Onde:

$$\Delta Ct_{(\text{gene alvo})} = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{gene de referência ou normalizador})}$$

$$\Delta Ct_{(\text{calibrador})} = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{tratamento 8})}$$

Ct é o ciclo definido como threshold, nele a fluorescência é detectável e é inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias.

A quantificação relativa da expressão gênica foi estimada por: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Os resultados da expressão gênica foram comparados à qualidade fisiológica dos tratamentos obtida por meio das análises fisiológicas (tabela 1).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção e validação do gene de referência

Os resultados médios da expressão gênica de cada tratamento para cada um dos cinco genes utilizados na escolha do gene de referência foram gerados por meio da técnica PCR em tempo real, registrados como valores de *Ct* e processados utilizando os softwares BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e Normfinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004). Na tabela 4 encontram-se os valores do coeficiente de correlação de Pearson, desvio padrão em relação à média do *Ct* e o coeficiente de variação para cada gene avaliado por meio do software BestKeeper.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação de Pearson, desvio padrão ($\pm Ct$) e coeficiente de variação (% *Ct*) obtidos na análise de gene de referência pelo software BestKeeper (PFAFFL et al., 2004).

| Estimativas | Genes analisados | | | | |
|--|--|--------|-------|-------------------|--------------------------------|
| | Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase | Actina | GAPDH | Ubiquitina ligase | Fator remodelador da cromatina |
| Coeficiente de correlação de Pearson (r) | 0,947 | 0,946 | 0,975 | 0,847 | 0,996 |
| Desvio padrão ($\pm Ct$) | 0,439 | 0,561 | 0,548 | 0,886 | 0,586 |
| CV (% <i>Ct</i>) | 2,427 | 3,218 | 2,946 | 4,513 | 2,958 |

De acordo com a tabela 4 os genes GAPDH e fator remodelador da cromatina apresentaram os maiores valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) 0,975 e 0,996, respectivamente. Esses valores foram obtidos a partir das estimativas de r para todos os possíveis pares formados pelos genes analisados. Elevados valores de r indicam que há aplicabilidade do gene sob análise como fator de normalização.

Os genes Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase e GAPDH apresentaram os menores valores de desvio padrão em relação ao *Ct* médio, 0,439 e 0,548, respectivamente (Tabela 4). Isso indica que esses genes, dentre os testados, são os mais estáveis para uso como gene de referência. O coeficiente de variação foi baixo para todos os genes avaliados, o que indica boa precisão experimental na obtenção dos dados.

Na tabela 5 encontra-se o valor de estabilidade estimado pelo software Normfinder para cada gene avaliado.

Tabela 5 – Valor de estabilidade obtido na análise de gene de referência pelo software Normfinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004).

| Estimativa | Genes analisados | | | | |
|-----------------------|--|--------|-------|-------------------|--------------------------------|
| | Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase | Actina | GAPDH | Ubiquitina ligase | Fator remodelador da cromatina |
| Valor de estabilidade | 0.019 | 0.021 | 0.014 | 0.021 | 0.016 |

De acordo com a tabela 5 os genes GAPDH e fator remodelador da cromatina apresentaram as menores estimativas para o valor de estabilidade, respectivamente, 0,014 e 0,016. O valor de estabilidade é uma medida da variação na expressão do gene sob análise. Dessa forma, a partir desta análise, o melhor gene candidato deve apresentar a menor variação de sua expressão.

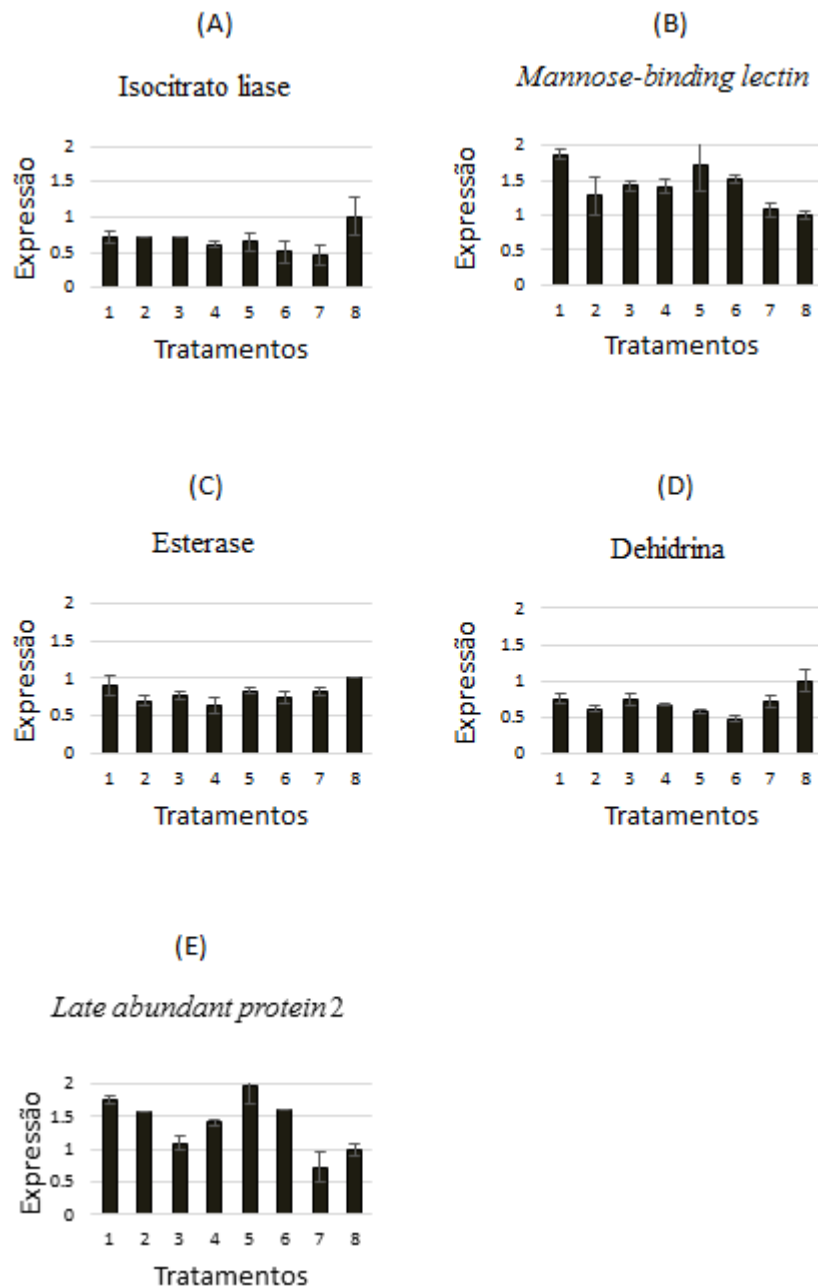
Com base nas estimativas fornecidas pelos softwares BestKeeper e Normfinder foi escolhido o gene GAPDH como gene de referência para a normalização das reações de PCR em tempo real deste trabalho.

4.2 Expressão de genes relacionados à dessecação

Na figura 1A está apresentada a expressão do gene isocitrato liase em sementes de *C. arabica* L. submetidas a diferentes protocolos visando à criopreservação. Por meio desta figura pode-se observar que a expressão deste gene praticamente não sofreu variação nos tratamentos que foram secados até 20% de umidade e variou nos tratamentos que foram secados até 17% de umidade. A partir desta figura também pode ser observado que o tratamento 8 apresentou a maior expressão do gene ICL. Isso provavelmente ocorreu devido a metodologia de pré-resfriamento e/ou a metodologia de dessecação terem proporcionado a indução à expressão desse gene nas sementes que constituíram o tratamento 8. Vale lembrar que os tratamentos 1-7 foram pré-resfriados e o tratamento 8 não foi pré-resfriado, e em relação à secagem, os tratamentos 1-6 foram secados em sílica gel, que proporciona uma

secagem mais rápida do que os tratamentos 7 e 8 que foram secados utilizando soluções salinas saturadas, respectivamente, sulfato de amônio e cloreto de sódio.

Figura 1 – Expressão gênica relativa em sementes criopreservadas de *C. arabica* L. cv. Catuaí amarelo. Isocitratol liase (A), *mannose-binding lectin* (MBL) (B), esterase (C), desidrina (D), *late abundant 2* (E). Tratamentos 1, 2 e 3 - sementes secadas em sílica gel até 20 % (bu), pré-resfriadas até -40 °C em velocidade de 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamentos 4, 5 e 6 - sementes secadas em sílica gel até 17 % (bu), pré-resfriadas até -40 °C, a 1°C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamento 7 - sementes secadas em solução saturada de sulfato de amônio (85 % UR) até 17 % (bu), pré-resfriadas até -50 °C a 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2 min em 40 °C. Tratamento 8 - sementes secadas em cloreto de sódio (75 % UR) até 17% (bu), imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por dois minutos em 40 °C. Dados obtidos a partir da média entre três repetições utilizando o tratamento 8 para estimar a expressão relativa.



A expressão do gene ICL tem sido associada à qualidade fisiológica e tem sido utilizada como indicativo de germinação em sementes (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). Carvalho et al. (2014) e Martins et al. (2000) verificaram que ocorre aumento de transcritos do gene ICL em sementes que apresentam melhor qualidade fisiológica. Desse modo, o fato da maior expressão deste gene ter sido observada no tratamento 8 pode ter contribuído para que as sementes constituintes deste tratamento apresentassem um dos melhores desempenhos fisiológicos e um dos maiores valores de PR, PN, PNF e FC no teste de germinação (tabela 1).

Mannose-binding lectin (MBL) é induzida em condições de estresse salino e por dessecação (Zhang et al., 2000), nas quais atua na sinalização celular em resposta ao estresse (SOUZA FILHO et al., 2003). De acordo com o perfil da expressão deste gene apresentada na figura 1B pode-se observar que os tratamentos submetidos à secagem rápida (sílica gel) apresentaram maior expressão do que os submetidos à secagem lenta. Também, de acordo com a tabela 1 os tratamentos submetidos à secagem rápida apresentaram desempenhos fisiológicos mais baixos do que os tratamentos submetidos à secagem lenta. Esses fatos podem indicar que o estresse causado pela secagem rápida utilizando sílica gel contribuiu para a indução da expressão deste gene. SOUZA FILHO et al. (2003) também verificaram que o estresse por desidratação influencia na expressão deste gene ao constatar aumento dos níveis da proteína MBL nas plantas de arroz submetidas ao estresse por desidratação.

Na figura 1C está apresentada a expressão do gene esterase nos tratamentos avaliados. É possível observar que as sementes do tratamento 8 apresentaram maior expressão deste gene do que as demais. Tal gene atua na hidrólise de ésteres, sendo, portanto, fundamental para a maturação, crescimento e regeneração celular e, segundo Russel et al. (2011) também apresenta importante função catalítica na desintoxicação celular. Essa atuação no metabolismo antioxidante provavelmente contribuiu para o fato das sementes constituintes do tratamento 8 apresentarem um dos melhores desempenhos fisiológicos avaliados (tabela 1).

A expressão do gene desidrina foi maior no tratamento 8 do que nos demais (figura 1D). Graether e Boddington (2004) constataram que o aumento da taxa de tradução da desidrina está relacionado à proteção do vegetal contra o estresse causado por drástica desidratação e pelo frio. Assim, o tratamento que apresentou maior expressão do gene DH possivelmente apresentou maior tolerância a esse tipo de estresse; o que contribuiu para este tratamento obter um dos melhores resultados fisiológicos dentre os demais avaliados (tabela 1).

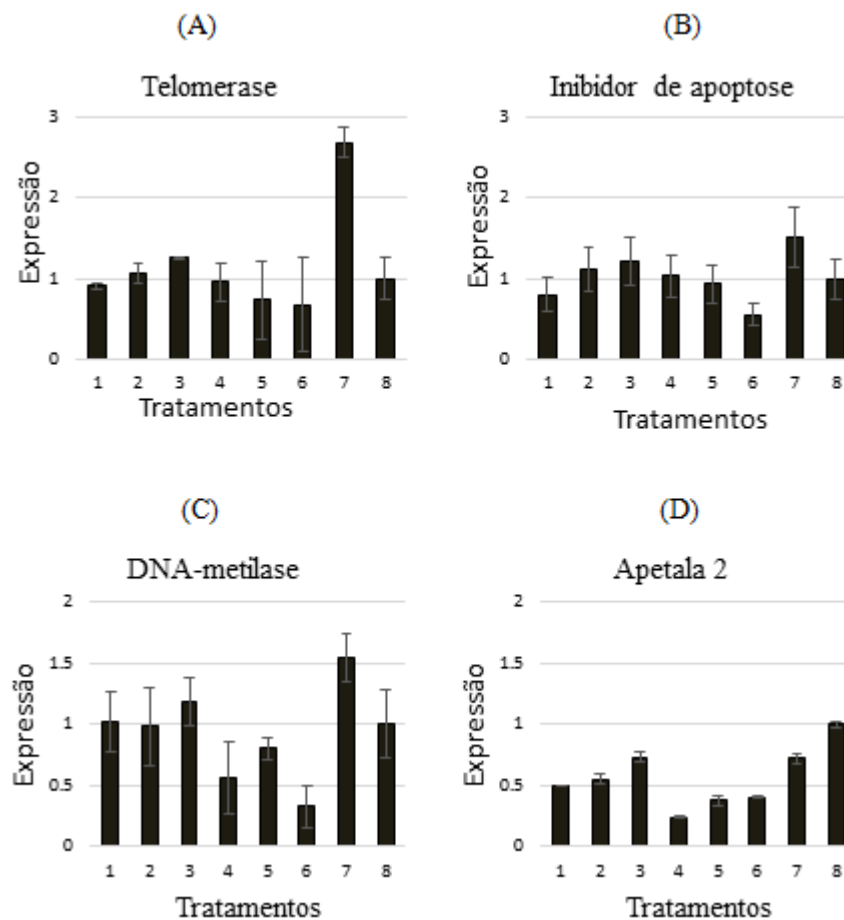
A expressão do gene LEA 2 tem sido relacionada a melhoria da qualidade fisiológica em sementes dessecadas pois, atua na homeostase de proteínas e ácidos nucleicos, estabilidade das membranas celulares e no balanço redox (TUNACLIFF et al., 2010). Na figura 1E pode ser observado que sua expressão, de forma geral, foi maior nos tratamentos submetidos à secagem rápida do que naqueles submetidos à secagem lenta; o que pode indicar que a velocidade de secagem influencia expressão deste gene.

4.3 Expressão de genes relacionados a danos e reparos no DNA

A expressão do gene telomerase está representada na figura 2A. Por meio desta, pode ser observado que a maior expressão gênica foi verificada no tratamento 7. Isso pode ter ocorrido devido a metodologia de pré-resfriamento até $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e/ou a metodologia de secagem utilizando sulfato de amônio terem atuado induzindo sua expressão. Este gene atua na proteção dos telômeros contra o encurtamento por exonucleases e contra a possível ocorrência de fusões. Sua atividade tem sido associada à manutenção da estabilidade cromossômica (Riha et al., 2001) e ao envelhecimento de sementes secas (Boubriak et al., 2007). De acordo com o modelo proposto por Wang et al. (2010), moderados danos nas sequências teloméricas podem ativar mecanismos de alongamento do telômero, enquanto que severos danos oxidativos resultam na degradação dos telômeros. A partir deste modelo, é possível sugerir que no tratamento 7 foram ativados mecanismos de reparo das sequências teloméricas que podem ter contribuído para a qualidade fisiológica apresentada por este tratamento (tabela 1).

Também pode ser observado na figura 2 que conforme aumenta o tempo de reaquecimento das sementes nos tratamentos submetidos à secagem rápida até 20% de umidade, ocorre aumento progressivo da expressão deste gene, o que pode indicar que o tempo de reaquecimento influencia diretamente a expressão deste gene nas sementes submetidas à secagem em sílica gel até 20% de umidade.

Figura 2 – Expressão gênica relativa em sementes criopreservadas de *C. arabica* L. cv. Catuaí amarelo. Telomerase (A), inibidor de apoptose (B), DNA-metilase (C), apetala 2 (D). Tratamentos 1, 2 e 3 - sementes secadas em sílica gel até 20 % (bu), pré-resfriadas até $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tratamentos 4, 5 e 6 - sementes secadas em sílica gel até 17% (bu), pré-resfriadas até $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tratamento 7 - sementes secadas em solução saturada de sulfato de amônio (85 % UR) até 17 % (bu), pré-resfriadas até $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ em velocidade de $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2 minutos em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tratamento 8 - sementes secadas em cloreto de sódio (75 % UR) até 17% (bu), imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por dois minutos em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dados obtidos a partir da média entre 3 repetições utilizando o tratamento 8 para estimar a expressão relativa.



Na figura 2B está apresentada a expressão do gene inibidor de apoptose (APOP) nas sementes de *C. arabica* avaliadas. De acordo com esta figura é possível verificar que sua expressão variou conforme o grau de umidade atingido na secagem e o tempo de reaquecimento em sementes submetidas à secagem rápida em sílica gel até 20% de umidade, pois, as sementes secadas nesta condição apresentaram aumento da expressão conforme se aumentou o tempo de reaquecimento. Também é possível observar que a maior expressão do gene APOP ocorreu no tratamento 7. Bissoyi et al. (2014) verificou que a inibição da morte celular em tratamentos submetidos a criopreservação possibilita o aumento da eficiência deste processo pois, a redução da taxa de morte celular permite a manutenção das funções celulares e o aumento da viabilidade celular após a criopreservação.

Por meio da figura 2B também é possível verificar que a expressão do gene APOP apresentou mesma tendência de expressão que o gene telomerase. Resultado similar foi observado por Nakajima et al. (2003) ao avaliar o efeito da inibição da enzima telomerase em células leucêmicas. Estes autores verificaram que a inibição da telomerase é seguida por encurtamento do telômero e indução do processo apoptótico. Shammass et al. (2005) verificou que a inibição da atividade da telomerase acarretou o encurtamento telomérico resultando em

senescência em 40% e apoptose em 86% das células tratadas devido a mecanismos que incluem a *up-regulation* de vários genes envolvidos no ciclo celular e apoptose.

O gene DNA-met apresentou maior expressão nos tratamentos submetidos à secagem rápida que foram secados até 20% de umidade do que nos que foram secados até 17% de umidade (figura 2C). Esse fato indica uma possível relação entre o grau de umidade e a expressão deste gene.

O tratamento 7 apresentou maior expressão do gene DNA-met que os demais (figura 2C). Esse resultado pode ter ocorrido devido ao fato do pré-resfriamento até -50°C e/ou do pré-resfriamento lento utilizando sulfato de amônio terem atuado propiciando a indução deste gene. De acordo com Dyachenko et al. (2006) o aumento dos níveis de metilação no DNA está relacionado a aquisição de tolerância de vegetais ao estresse osmótico. Deste modo, o fato deste gene estar mais expresso nesse tratamento pode ter contribuído para que as sementes que constituem este tratamento apresentassem um dos melhores desempenhos fisiológicos, dentre os demais tratamentos avaliados (tabela 2).

Pode ser observado, por meio da figura 2 (A, B e C), que a expressão do gene DNA-met, APOP e telomerase apresentaram tendência similar de expressão. Zhang et al. (2015) também verificaram que a atuação da telomerase, o processo apoptótico e a metilação do DNA podem estar relacionados. Estes autores demonstraram que a inibição global ou gene-específica da metilação do DNA resulta em apoptose nas células tratadas e na ocorrência de danos no DNA oriundos da disfunção telomérica devido a redução da expressão da telomerase e redução do tamanho dos telômeros. Assim, o fato desses genes estarem mais expressos no tratamento 7 do que nos demais tratamentos pode ter contribuído para que este tratamento apresentasse um dos melhores desempenhos fisiológicos.

A figura 2D mostra o aumento da expressão do gene apetala 2 (AP2) conforme há o aumento do tempo de reaquecimento em sementes submetidas à secagem rápida utilizando sílica gel. Também pode ser observado que houve maior expressão deste gene nas sementes submetidas à secagem rápida até 20% do que nas secadas até 17% nesta mesma velocidade e que houve maior expressão deste gene nos tratamentos submetidos à secagem lenta com 2 minutos de reaquecimento do que nos tratamentos submetidos à secagem rápida com mesmo tempo de reaquecimento. Esse fato sugere que o tempo de reaquecimento, o grau de umidade e a velocidade de secagem da semente influenciam a expressão deste gene.

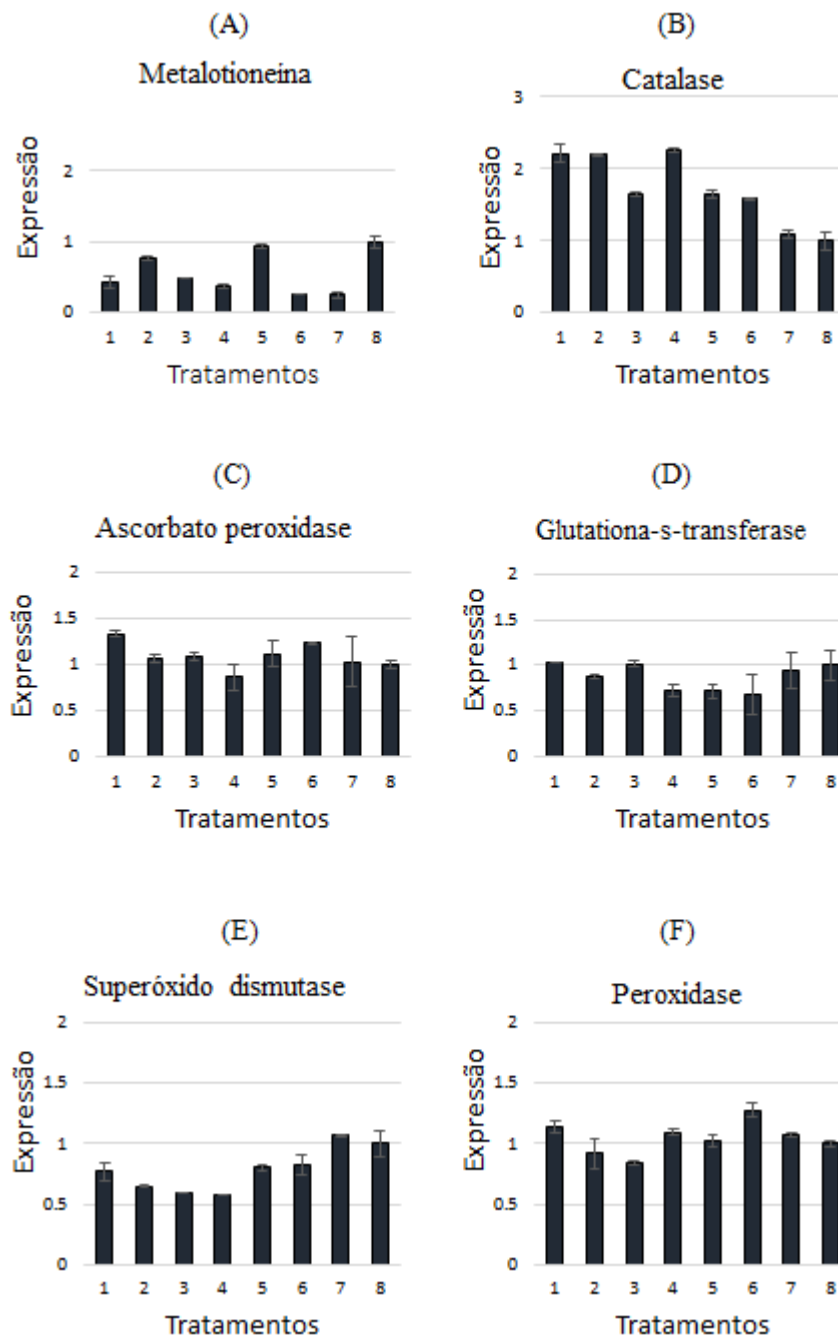
Um dos melhores resultados fisiológicos foi apresentado pelo tratamento 8, que apresentou a maior expressão do AP2. Esse resultado fisiológico deve-se em parte ao fato

deste gene atuar como fator de transcrição possibilitando a expressão de genes relacionados a tolerância a estresses abióticos como por desidratação, frio e estresse osmótico (WANG et al., 2016; LICAUSI et al., 2013). Assim, é possível que o fato deste gene estar mais expresso no tratamento 8 tenha contribuído para que este tratamento apresentasse uma das maiores qualidades fisiológicas descritas na tabela 1.

4.4 Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo

O gene metalotioneína (MT) apresenta importante atividade na manutenção da homeostase celular. Na figura 3A está apresentado o perfil da expressão deste gene em sementes submetidas ao processo de criopreservação. Pode ser observado que nos tratamentos submetidos à secagem rápida a expressão deste gene varia conforme o tempo de reaquecimento pois, àqueles que foram reaquecidos por 4 minutos apresentaram maior expressão do que os tratamentos que foram reaquecidos por 2 e 6 minutos. Este fato sugere que há uma possível relação entre o tempo de reaquecimento e a indução à expressão deste gene.

Figura 3 – Expressão gênica relativa em sementes criopreservadas de *C. arabica* L. cv. Catuaí amarelo. Metalotioneína, (A), catalase (B), ascorbato peroxidase (C), glutathione-S-transferase (D), superóxido dismutase (E) e peroxidase (F). Tratamentos 1, 2 e 3 - sementes secadas em sílica gel até 20 % (bu), pré-resfriadas até -40 °C a 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamentos 4, 5 e 6 - sementes secadas em sílica gel até 17% (bu), pré-resfriadas até -40 °C a 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2, 4 e 6 min, respectivamente, em 40 °C. Tratamento 7 - sementes secadas em solução saturada de sulfato de amônio (85 % UR) até 17 % (bu), pré-resfriadas até -50 °C em velocidade de 1 °C/min, imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por 2 minutos em 40 °C. Tratamento 8 corresponde a sementes secadas em cloreto de sódio (75 % UR) até 17% (bu), imersas em nitrogênio líquido e aquecidas em banho maria por dois minutos em 40 °C. Dados obtidos a partir da média entre 3 repetições utilizando o tratamento 8 para estimar a expressão relativa.



Também pode ser observado pela figura 3A que o gene MT está mais expresso no tratamento 8 do que nos demais tratamentos reaquecidos por 2 minutos. Ozturk et al. (2002) verificaram que o aumento na expressão do gene MT pode ser associado a maior tolerância ao estresse hídrico. Esse fato foi constatado pelos autores ao analisar a frequência da hibridização de transcritos do gene MT em sequências de plantas tolerantes ao estresse hídrico. Segundo Ruttkay-Nedecky et al. (2013) a atuação deste gene também está associada a proteção celular contra o estresse oxidativo. O fato de este gene estar associado à proteção contra o estresse hídrico e oxidativo pode ter contribuído para que o desempenho fisiológico

apresentado pelo tratamento 8 tenha sido um dos maiores dentre os demais tratamentos avaliados (tabela 1).

Na figura 3B está apresentada a expressão do gene CAT nos tratamentos submetidos à criopreservação. Pode-se observar que houve maior expressão deste gene nos tratamentos submetidos à secagem rápida. Resultado similar foi obtido por Santos, Pinho e Rosa (2013) ao avaliar sementes de café submetidas a diferentes metodologias de secagem.

As sementes submetidas à secagem rápida apresentaram desempenho fisiológico inferior às secadas lentamente. Assim, a qualidade fisiológica dos tratamentos foi maior naqueles que apresentaram menor expressão deste gene. Esse fato também foi constatado por Taveira et al. (2012) ao avaliar os perfis proteicos e o desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. De acordo com os autores, a maior expressão deste gene ocorreu devido a necessidade de atuação mais intensa da CAT durante o processo deteriorativo de sementes de café. Além disso, segundo Mittler (2002) o aumento da concentração da enzima catalase está relacionado ao aumento da concentração de peróxido de hidrogênio. Esse fato sugere que, de forma geral, sementes submetidas a maior estresse oxidativo podem apresentar maior expressão do gene CAT.

O perfil da expressão do gene ascorbato peroxidase (APX) está apresentado na figura 3C. Por meio desta é possível observar que os tratamentos submetidos à secagem rápida apresentaram tendência de redução da expressão deste gene em sementes secadas até 20% e tendência ao aumento da expressão deste gene nas sementes secadas até 17% conforme aumentou-se o tempo de reaquecimento, o que indica que o grau de umidade da semente após a secagem em sílica gel e o tempo de reaquecimento ao qual foi submetida podem estar associados à indução da expressão deste gene. A APX é responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O (ASADA, 1992) e segundo Mitler et al. (2002) também atua na fina modulação de EROS para a sinalização.

A expressão do gene glutationa-s-transferase (GST), apresentada na figura 3D, foi menor nas sementes secadas em sílica gel até 17% do que nas que foram secadas até 20%, o que indica uma possível relação entre o grau de umidade das sementes submetidas à secagem rápida e a indução à expressão deste gene. Segundo Loyall et al. (2000) o gene GST atua na sinalização celular durante a resposta ao estresse oxidativo.

O gene superóxido dismutase (SOD) atua na eliminação de EROS durante o estresse oxidativo provocado pela dessecação (FRANCA; PANEK; ELEUTHERIO, 2007) e por baixas temperaturas (BUDIARTO, 2009). Sua expressão está representada na figura 3E, onde

se observa que houve maior expressão nos tratamentos submetidos à secagem lenta. Esse fato sugere uma possível relação entre a velocidade de secagem empregada e a sua expressão.

As sementes secadas lentamente apresentaram os melhores valores de desempenhos fisiológicos dentre as demais avaliadas (tabela 1). Como o gene SOD atua catalisando a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxidos (O_2^-) é possível que tenha contribuído para o desempenho fisiológico apresentado pelas sementes desses tratamentos.

A expressão deste gene também parece estar relacionada ao tempo de reaquecimento e ao grau de umidade das sementes. Na figura 3E pode ser observado que sementes submetidas à secagem rápida em sílica gel até 20% de umidade apresentaram tendência de redução da expressão do SOD conforme se aumentou o tempo de reaquecimento.

O gene peroxidase (POX) atua na redução dos níveis de H_2O_2 formados sob diferentes condições de estresse (ROSSI; LIMA; HAKVOORT, 1997). Sua expressão está apresentada na figura 3F, onde é possível observar que os tratamentos submetidos à secagem rápida em sílica gel apresentaram tendência de redução da expressão deste gene em sementes secadas até 20% conforme se aumentou o tempo de reaquecimento. Esse fato pode indicar que na secagem utilizando sílica gel até 20% de umidade o tempo de reaquecimento ao qual a semente foi submetida pode influenciar diretamente a expressão deste gene.

A avaliação da expressão gênica além de considerar os genes individualmente também pode ser realizada considerando genes em conjunto. Por meio desta abordagem é possível perceber que o padrão de expressão dos genes telomerase, APOP e DNA-met é similar (figura 2A, B e C). Esse fato pode sugerir que estes genes participam de uma mesma via que foi ativada em resposta aos estresses oriundos dos protocolos de criopreservação aos quais as sementes foram submetidas e/ou que estão sendo ativados mecanismos de reparo no DNA. Entretanto, para a confirmação desta hipótese são necessários mais estudos.

A partir da figura 3 (C, E e F) pode ser observado que os genes APX, SOD e POX também apresentaram padrão de expressão gênica similar, o que pode sugerir uma atuação conjunta e complementar desses genes na remoção de EROS. Esses genes atuam na remoção de EROS a partir da conversão destes em formas menos tóxicas ou em água. A SOD é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EROs nas células (FOYER; NOCTOR, 2005) e atua catalisando a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de radicais superóxido (O_2^-). A APX é responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O (ASADA, 1992). A POX tem como função catalisar reações oxidativas que usam H_2O_2 como acceptor de

elétrons. (ROSSI; LIMA; HAKVOORT, 1997). Assim, o fato de o perfil da expressão gênica apresentado por esses genes ter sido extremamente similar pode indicar que os mecanismos de regulação da expressão desses genes durante as etapas da criopreservação estão intimamente associados, o que possibilita que atuem de forma complementar na remoção de EROS.

Outro fato interessante que pode ser considerado é que o estresse oriundo de uma determinada metodologia de criopreservação induz o aumento da expressão de genes relacionados à proteção celular contra os danos oriundos dessa metodologia. Entretanto, o aumento da expressão desses genes, não garante que as sementes apresentarão boa qualidade fisiológica. Isso ocorre porque em alguns casos os danos oriundos da metodologia de criopreservação são tantos que os mecanismos genéticos de proteção que são induzidos durante a criopreservação não são capazes de proteger as sementes e manter boa qualidade fisiológica nas mesmas. Em outros casos, dependendo da metodologia empregada, a expressão de genes de proteção contra o estresse abiótico é capaz de contribuir para que a qualidade fisiológica permaneça em bons níveis. Dessa forma, foi verificado neste trabalho que alguns genes que atuam na tolerância a desidratação e estresse oxidativo apresentaram maior expressão em tratamentos que apresentaram baixa qualidade fisiológica, enquanto outros genes foram mais expressos nos tratamentos que apresentaram melhores qualidades fisiológicas. Além disso, os mecanismos de proteção vegetal contra danos abióticos são regulados por inúmeros genes. Assim, o metabolismo das sementes submetidas a diferentes protocolos de criopreservação é o resultado da atuação conjunta desses genes.

5 CONCLUSÕES

A expressão dos genes avaliados varia de acordo com a metodologia de secagem, de pré-resfriamento e o tempo de reaquecimento aos quais as sementes são submetidas visando à criopreservação.

Os genes telomerase, APOP e DNA-met, bem como os genes APX, SOD e POX apresentam padrão de expressão similar, o que sugere atuação conjunta no reparo do DNA e na remoção de EROs, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F; Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, Ago. 2004.
- ARAÚJO, R. F. et al. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despolpado e não despolpado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 71-78, Out. 2008.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase – A hydrogen peroxide – scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**. Lund, v. 85, n. 2, p. 235-241, Jun. 1992.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Estudo da OIC analisa mercado de café nos últimos 50 anos**. Rio de Janeiro, 2014 Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=59&infol=3298>>. Acesso em: 03 Dez. 2016a.
- _____. **Composição química**. Rio de Janeiro, 2010 Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=279#3207>>. Acesso em: 03 Dez. 2016b.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, n. 2, p. 93-107, Mai. 2004.
- BATTAGLIA, M.; COVARRUBIAS, A. A. Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. **Frontiers in Plant Science**, Lausana, v. 4, n. 190, Jun. 2013. Paginação irregular.
- BATKOVÁ, P.; POSPOŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 52, n. 3, p. 413-422, Set. 2008.
- BAUST, J. G.; DAYONG, G.; BAUST, J. M. Cryopreservation: an emerging paradigm change. **Organogenesis**, Georgetown, v. 3, n. 3, p. 90-96, Jul. 2009.
- BAUST, J. M. Properties of cells and tissues influencing preservation outcome: molecular basis of preservation induced cell death. In: BAUST, J. G.; BAUST, J. M. **Advances in Biopreservation**, Boca Raton: Ed. CRC Press, 2010. cap. 3, p. 63-87.
- BERJAK, P. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant seeded species. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 21, n. 3, p.187-203. Set. 2011.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausana, v. 4, n.478, Nov. 2013. Paginação irregular.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Ed. Plenum Press, 1994.

BISSOYI, A. et al. Targeting cryopreservation-induced cell death: a review. **Biopreservation and Biobanking**, New Rochelle, v. 12, n. 1, p. 23-34, Fev. 2014.

BONIFACIO, A. et al. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 34, n. 10, p. 1705-1722, Out. 2011.

BORÉM, A. et al. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 1999.

BOUBRIAK, I. et al. Telomeres and seed banks. **Cytology and Genetics**, Nova York, v.41, n. 1, p. 23-29, Jan/Fev. 2007.

BOYD, W. C. The lectins: their present status. **The International Journal of Transfusion Medicine**, Lund, v.6, n. 1, p. 1-32, Jun. 1963.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BUDIARTO, K. The occurrence of hyperhydricity on several carnations (*Dianthus carriophyllus* L.) cultivars during low temperature storage. **Biodiversitas**, Belo Horizonte, v. 10, n. 3, p. 104-107, Jul. 2009.

CARVALHO, E. R. et al. Enzyme activity in soybean seeds produced under foliar application manganese. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v, 38, n. 4, p. 317-327, Jul/Ago, 2014.

CHANG, H. et al. Overproduction of Cytokinins in Petunia Flowers Transformed with PSAG12-IPT Delays Corolla Senescence and Decreases Sensitivity to Ethylene. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 13,2 n. 4, p.2174-2183, Ago, 2003.

CHEN, Y. G.; BURRIS, J. S. Role of carbohydrate in desiccation tolerance and membrane behaviour in maturing maize seed. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 971-975, Jun. 1990.
DAY, J. G. et al. Cryopreservation, conservation of bioresources at ultra low temperatures. In: WALKER, J. M.; RAPLEY, R. **Molecular Biomechanics Handbook**. 2. ed. Totowa: Ed. Humana Press. 2008. cap. 52, p. 917-947.

DELOUCHE, J. C. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Seed News**, Pelotas, v. 6, n. 6, p. 24-31, Nov/Dez. 2002.

DIPLOCK, A. T. Defense against reactive oxygen species. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 29, n. 6, p. 463-467, Dez. 1998.

DULLOO, M. E. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, Dez. 2009.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea Arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 169-178, Mai/Jun. 2006.

- DUSSERT, S. et al. Oxidative stress phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 127, n. 2, p. 192-204, Abr. 2006.
- DYACHENKO, O. V. et al. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of *Mesembryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress. **Biochemistry**, Moscou, v. 71, n. 4, p. 461-465, Fev. 2006.
- EDWARDS, R.; DIXON, D. P.; WALBOT, V. Plant glutathione s-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 5, p. 193-198, Mai. 2000.
- EIRA, M. T. S. et al. Conservation of genetic resources of *Coffea* using cryopreservation. In: SEEDS INTERNATIONAL WORKSHOP PROCEEDINGS, 7., 2002, Salamanca. **Anais...** Wallingford: CABI Pub, 2003. p. 11-19.
- EIRA, M. T. S. et al. Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 149-163. Jan/Mar. 2006.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, Jan. 1990.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais**. Planaltina: Ed. EMBRAPA, 2007.
- FERNANDES, P. et al. Characterization of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. **Tree Fisiology**. Canadá. v. 28, n. 1, p. 1841-1850. Out. 2008.
- FIGUEIREDO, M. A. de. **Secagem e resfriamento de sementes de *Coffea Arabica* L. visando à criopreservação**. 2016. 198 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- FOYER, C. H. NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in physiological context. **Plant, Cell, and Environment**. Oxford, v. 28, n. 8, p. 1056-1071, Mar. 2005.
- FRANCA, M. B.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. Oxidative stress and its effects during dehydration. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 621-631, Abr. 2007.
- FUCHS, J. et al. Chromosomal histone modification patterns—from conservation to diversity. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 11, n. 4, p. 199–208, Abr. 2006.
- GEROMEL, C. et al. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 3243-3258, Dez. 2006.

GIJSEN, M. A. deletion mutation at the *ep* locus causes low seed coat peroxidase activity in soybean. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 991-998, Nov. 1997.

GRAETHER, S. P.; BODDINGTON, K. F. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. **Frontiers in Plant Science**, Lausana, v. 5, n. 1, Out. 2014. Paginação irregular.

GRAFI G., ZEMACH A., PITTO L. Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 17696, n. 1, p. 287–294. Mai/Jun. 2007.

GUIMARÃES, R. M. **Fisiologia de Sementes**. Lavras: Ed. UFLA/FAEPE, 1999.

HAMILTON, K. N.; TURNER, S. R.; ASHMORE, S. E. Cryopreservation. In: OFFORD, C. A.; MEAGHER, P. F. **Plant Germplasm Conservation in Australia: Strategies and Guidelines for Developing, Managing and Utilising Ex Situ Collections**. Canberra: Ed. Offord. 2009. cap. 7. p. 129-128

HAO, Y. J.; YOU, C. X.; DENG, X. X. Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 23, n. 1, p. 37-46. Jan/Fev. 2002.

HAO, Y. J.; LIU, Q. L.; DENG, X. X. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. **Cryobiology**, Rockville, v. 43, n. 1, p. 46-53, Ago. 2001.

HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 25, n. 1, p. 3-21, Jan/Fev. 2004.

HASSINEN, V. H. et al. Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity? **Plant Biology**, Estugarda, v. 13, n. 2, p. 225-232, Mar. 2011.

HENDRY, G. A. F. et al. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 270-273, Out. 1993.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. **OLIGOANALYZER 3.1 SOFTWARE**. Coralville, 2014. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/calc/analyser>>. Acesso em: 27 Jan. 2015.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, Londres, v. 60, n. 7, p. 651-674, Aug. 2002.

JOFUKU, K. D. et al. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 8, p. 3117–3122, Fev. 2005.

KACZMARCZYK, A.; ROKKA, V. M.; KELLER, E. R. J. Potato shoot tip cryopreservation, a review. **Potato Research**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 45-79, Dez. 2011.

KAMPRANIS et al. A novel plant glutathione-S-transferase/oxidase suppresses bacterial lethality in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 38, p. 29207-29216, Set. 2000.

LEPRINCE, O. BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 338, p. 1515-1524, Mai.1999.

LICAUSI, F. et al. AP2/ERF transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. **New Phytologist**, Cambridge, v. 199, n. 3, p.639-649, Ago. 2013.

LI, X. et al. Rice Apoptosis inhibitor5 coupled with two dead-box adenosine-5'-triphosphate-dependent RNA helicases regulates tapetum degeneration. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 4, p. 1416-1434, Abr, 2011.

LIN, C. et al. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 114-130. Dez. 2005.

LOYALL, L. et al. Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 10, p. 1393-1950, Out. 2000.

MAES, T. et al. Petunia AP2-like genes and their role in flower and seed development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 2, p. 229-244, Fev. 2001.

MARTINS, C. A. et al. Atividade da isocitrato-liase durante a germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 42-46, Jun. 2000.

McDONALD, M. B. Orthodox seed deterioration and its repair. In: BENECH-ARNOLD, R. L.; SÁNCHEZ, R. A. **Handbook of seed physiology: Applications to agriculture**. Nova York: Ed. Hawork Press, 2004. cap. 9, p. 273-304.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**. Brasília, 2012. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20%282%29%281%29.pdf.> Acesso em: 03 Dez. 2016.

MITTLER, R. Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.7, n. 9, p. 405-410, Set. 2002.

MUELLER, L. A. et al. Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, n. 4, p.1561-1570, Ago. 2000.

NAKAJIMA et al., Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells: possibility of antitelomerase therapy. **Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 560-567, Mar. 2003.

- NAUEN, R. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 63, n. 7, p. 628-633. Jul. 2007.
- OZTURK, Z. N. et al. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt stressed barley. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, n. 5-6, p. 551-573, Mar/Abr. 2002.
- PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and ACC oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. Braz. **Journal of Plant Physiology**, Estugarda, v. 17, n. 3, p. 283-289, Mar. 2005.
- PERROIS, C. et al. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea Canephora* (Robusta). **Planta**, Berlim, v. 241, n. 1, p. 179-191, Set. 2015.
- PFÄFFL, M. W. et al. Determination of most stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel spreadsheet tool using a Repeated pair-wise correlation and regression analysis. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 26, n. 1, p.509-515, Jan. 2004.
- PIMENTA, C. J. et al. Peso, acidez, sólidos solúveis, açúcares e compostos fenólicos em café (*Coffea arabica* L.), colhidos em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 1, n. 5, p. 23-30, Dez. 2000.
- PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, Shannon, v. 197, n. 5, p. 1307-1314, Dez. 2004.
- RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na agropecuária**. 5. ed., rev. Lavras: Ed. UFLA, 2012.
- RENA, A. B. et al. Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEEIRO, 1., 1984, Poços de Caldas. **Anais...** Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fósforo, 1986. p. 447.
- RIHA, K. et al. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n.10, p. 1691-1698, Out, 1998.
- RIHA, K. et al. Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. **Science**, Nova York, v. 291, n. 5509, p. 1797-1800, Mar. 2001.
- ROSA, S. B. et al. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. **Phytochemistry**, Londres, v. 71, n. 5-6, p. 548-558, Abr. 2010.
- ROSSI, C.; LIMA, G. P. P.; HAKVOORT, D. M. R. Atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7) e teor de prolina no embrião e cotilédones de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 123-127, Set/Dez. 1997.

RUSSEL, R. J. et al. The evolution of new enzyme functions: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. **Evolutionary Applications**, Oxford, v. 4, n. 2, p.225-248, Mar. 2011.

RUTTKAY-NEDECKY, B. et al. The role of metallothioneins in oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 3, p. 6044-6066, Mar. 2013.

SALMONA, J. et al. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 66, n. 1, p. 105-124, Nov. 2008.

SANTOS, G. C. **Expressão de genes relacionados ao processo oxidativo durante a secagem de sementes de café**. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, G. C.; VON PINHO, E. V. R.; ROSA, S. D. V. F. da. Gene expression of coffee seed oxidation and germination processes during drying. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 6968-6982, Dez. 2013.

SANTOS, F. C. et al. Desiccation sensitivity from diferente coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p.25-31, Out. 2014.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, n.7, p. 995-1014, Jul. 2005.

SEXTON, A. N.; COLLINS, K. The 5' guanosine tracts of human telomerase RNA are recognized by the G-quadruplex binding domain of the RNA helicase DHX36 and function to increase RNA accumulation. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 31, n. 4, p. 736-743, Fev. 2011.

SHAMMAS, M. A. et al. Telomerase inhibition by siRNA causes senescence and apoptosis in Barrett's adenocarcinoma cells: mechanisms and therapeutic potential. **Molecular Cancer**, Londres, v.4, n. 24, Jul. 2005. Paginação irregular.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p.1305-1319, Mai. 2002.

SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Compositional Changes of Proteins and Amino Acids in Germinating Coffee Seeds. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 43, n.3, p. 259-265, Abr. 2000.

SOUZA FILHO et al. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 4, p. 623-628, Abr. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2004.

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 10, p. 1511-1517, Out. 2012.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant tissue culture, development, and biotechnology**. Londres: Ed. CRC Press, 2011.

UNTERGASSER, A. et al. **PRIMER3 PLUS SOFTWARE**. Boston, 2007. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>>. Acesso em: 27 Jan. 2015.

VAN DER AAR, E. M. et al. Structure-activity relationships for chemical and glutathione-s-transferase-catalysed glutathione conjugation reactions of a series of 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes. **Biochemical Journal**, Portland, v. 320, n. 2, p. 531-540, Dez. 1996.

VOLK, G. M. Application of Functional genomics and Proteomics to Plant Cryopreservation. **Current Genomics**, Hilversum, v. 11, n. 1, p. 24-29, Mar. 2010.

VOLZ-THOMAS, A. et al. Inorganic trace gases and peroxy radicals during BERLIOZ at Pabstthum: An investigation of the photostationary state of Nox and O₃. **Journal Geophysical Research Atmospheres**, Washington, v. 108, n. 4, Fev. 2003. Paginação irregular.

WANG, H. et al. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. **Frontiers in Plant Science**, Lausana, v. 7, n. 67, Fev. 2016. Paginação irregular.

WANG, Z. et al. Characterization of oxidative guanine damage and repair in mammalian telomeres. **Plos Genetics**, São Francisco, v. 6, n. 5, Mai. 2010. Não paginado.

ZHANG, W. et al. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. **Planta**, Berlim, v. 210, n. 6, p. 970-978, Mai. 2000.

ZHANG, X. et al. The DNA methylation inhibitor induces telomere dysfunction and apoptosis of leukemia cells that is attenuated by telomerase over-expression. **Oncotarget**, Albânia, v. 6, n. 7, Mar. 2015.

ZHU, B. et al. Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. **Molecular and General Genetics**, Berlim, v. 264, n. 1-2, p. 145-153. Set. 2000.