

A SEMENTE DE CAFÉ: DESENVOLVIMENTO E PERSPECTIVAS GENÔMICAS

CASTRO, R.D.¹; ESTANISLAU, W.T.¹; MESQUITA, P.R.¹ e HILHORST, H.W.M.²

¹ Universidade Federal de Lavras - UFLA, Dep. de Agricultura, Lavras-MG, 37200-000, <rcaastro@ufla.br>, Tel: +35 3829-1318, Fax: +35 3829-1301; ² Wageningen University and Research Center - WUR, Lab. of Plant Physiology, Arboretumlaan 4, 6703 BD, Wageningen, Holanda)

RESUMO: Apesar da importância econômica do café, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que atuam durante a formação de sementes de cafeeiros. Estas fases são essenciais no estabelecimento de todas as características da semente madura e rendimento final da lavoura. O estabelecimento da era genômica vem transformando os estudos de expressão gênica em biologia de plantas, em função de tecnologias de alto desempenho hoje existentes em transcriptoma ('chips de DNA') e proteoma (eletroforese bidimensional e espectrometria de massa). Estudos nestes níveis apresentam grande potencial e certamente contribuirão para o desenvolvimento da produção cafeeira como um todo, sendo essencial que o biólogo leve em consideração o posicionamento preciso do evento considerado ao longo do desenvolvimento. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um modelo funcional preliminar de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) como pré requisito para as análises de expressão gênica. Utilizou-se microscopia eletrônica na análise estrutural dos tecidos; citometria na análise de síntese e ploidia do DNA; "western blotting" no acúmulo de β - tubulina; e microscopia de imuno-fluorescência nas configurações do citoesqueleto microtubular. O estudo possibilitou o esclarecimento conclusivo da origem dos diferentes tecidos, definir com precisão a organogênese, as fases do desenvolvimento, a ocorrência de eventos fisiológicos e a anatomia da semente. O modelo funcional descreve a complexidade do desenvolvimento da semente do cafeeiro, compreendendo um pré requisito fundamental em estudos de desenvolvimento e implementação de análises de expressão gênica em escala genômica (transcriptoma e proteoma) e de função dos genes na era pós-genômica (metaboloma).

Palavras-chave: *Coffea arabica*, ciclo celular, desenvolvimento, função, genes, genoma, organogênese, semente.

THE COFFEE SEED: DEVELOPMENT AND GENOMICS PERSPECTIVES

ABSTRACT: Although coffee has great world wide economic importance, little is known about the factors that act during flowering and fruit and seed formation in coffee plants. These developmental phases are essential for the establishment of all characteristics of the mature seed and final yield of the crop. It is fundamental a better understanding of the molecular mechanisms and regulatory programs that determine seed quality as propagule and as commodity. Besides, it is relevant to consider the fact that seeds are the main form of survival of the coffee as species, despite the fact that they usually have short longevity. The establishment of the genomic era is transforming the studies of gene expression in plant biology and promises to revolutionize the way that cells and cell processes are studied. This transformation is due to the existence nowadays of high throughput (bio)technologies in transcriptomics (DNA microarrays) and proteomics (2D-electrophoresis and mass spectrometry). Studies at this level show great potential and will certainly be essential also for the development of the coffee production as a whole. However, the success in these types of studies depend not only on the proper use of the technologies, but also on the precise positioning of the event considered in developmental studies. It is presented here a functional model of development of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds, which allows a greater precision on the identification of the different stages and occurrence of physiological events during development, contributing therefore, for the success of the gene expression analysis to be considered in a subsequent phase. The establishment of the model considered the functional analysis of cell cycle and organogenesis events in relation to physiological events during seed development, taking as reference the number of 'days after pollination' (dap), the size and color of fruits. Scanning electron microscopy was utilized for the structural analysis of differences in the seed tissues. Cell cycle and organogenesis events were analysed in relation to the processes of tissue differentiation by cell division, and growth by cell expansion. Synthesis and duplication of DNA, as well as DNA ploidy, were analysed by means of cytometry; the accumulation of α -tubulin by electrophoresis and western blotting, and the cytological analysis the microtubular cytoskeleton configurations by immuno-fluorescence microscopy. The accumulation of dry matter, water content, and germinability and desiccation tolerance tests were considered for the evaluation of the physiological state of the seeds. The relation among DNA synthesis, α -tubulin accumulation and configurations of the microtubular cytoskeleton allowed a precise definition of the phases of development. The phase of differentiation of seed tissues and embryogenesis (60 to 150 DAP) is marked by a decreasing activity of DNA synthesis, as well as of tubulin accumulation and of the mitotic configurations of the microtubular cytoskeleton. The results of the analysis of ploidy by cytometry and of structure by electron microscopy, it is verified that the initial development of the fruit is due to the growth of the diploid maternal nucellar tissue ("false seed"), which is subsequently partially degraded

giving up space for the development of the triploid endosperm and diploid embryo (“true seed”). By the end of this phase (150 DAP), the differentiated embryos are shown to be viable, when isolated and incubated *in vitro*. However, the seeds do not germinate when evaluated in germination test. Both isolated embryos, as seeds, do not show desiccation tolerance in this phase. In the maturation phase (150 to 225 DAP), it is predominantly observed complementary morphogenetic events as cell expansion growth, since mitotic cytoskeleton is no longer observed, existing only cortical cytoskeleton, and increasing accumulation of dry matter. With the progress of maturation and desiccation, it is observed the complete degradation of the remaining cortical cytoskeleton and tubulin, leading to the inactivation of the cell cycle events and induction of embryo and seed quiescence. The acquisition of germinability by the seed is only initiated when fruits reach the larger-green stage (210 DAP), becoming maximum in the cherry stage (225 DAP), when desiccation tolerance also becomes maximum. It was possible, by means of the present study, to conclusively clarify the origin of the different tissues, to define with precision the organogenesis, the different phases of development, the occurrence of specific physiological events and the seed anatomy. Therefore, it is established a functional model that describes the complexity of the development of the coffee fruit and seed, and that complies an essential prerequisite for the success on the implementation of gene expression studies at the genomic level (transcriptomics and proteomics) and of gene function at the post-genomic level (metabolomics).

Key words: *Coffea arabica*, cell cycle, development, function, genes, genome, organogenesis, seed.

INTRODUÇÃO

Apesar da importância econômica mundial do café, pouco se sabe sobre os fatores que atuam durante a floração e formação do fruto e da semente de cafeeiros. Estas fases do desenvolvimento são essenciais no que diz respeito ao estabelecimento de todas as características da semente madura e rendimento final da lavoura. É fundamental um melhor entendimento dos mecanismos moleculares e programas regulatórios determinantes da qualidade da semente como propágulo e como produto (*commodity*). Além disso, é relevante considerar que a semente é o carreador de todas as características genéticas da planta e do produto do melhoramento, constituindo a principal forma de sobrevivência dos cafeeiros como espécies, apesar de apresentarem em geral curta longevidade. O estabelecimento da era genômica vem transformando os estudos de expressão gênica em biologia de plantas e prometem revolucionar a forma com que são estudados as células e os processos celulares. Essa transformação

acontece em função de (bio)tecnologias de alto desempenho hoje existentes em transcriptoma ('chips de DNA') e proteoma (eletroforese bidimensional e espectrometria de massa). Estudos nesses níveis apresentam grande potencial e certamente contribuirão para o desenvolvimento da produção cafeeira como um todo. Contudo, o sucesso nesses tipos de estudos depende não somente do uso adequado das tecnologias pelo biólogo, mas também do posicionamento preciso do evento considerado ao longo do desenvolvimento. É nesse contexto que apresentamos aqui um modelo funcional do desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), estabelecido para permitir a identificação precisa dos diferentes estádios do desenvolvimento e ocorrência de eventos fisiológicos, contribuindo dessa forma para o sucesso nas análises de expressão gênica que venham a ser consideradas em etapas subsequentes de estudos genômicos. O estabelecimento do modelo levou em consideração uma análise multidisciplinar funcional de eventos do ciclo celular e de organogênese em relação a eventos fisiológicos durante o desenvolvimento da semente, tendo como referência o número de 'dias após a polinização' (DAP), o tamanho e a cor do fruto.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se microscopia óptica e eletrônica de varredura na análise estrutural dos diferentes tecidos da semente (Figura 1). Os eventos do ciclo celular e organogênese foram analisados em relação aos processos de diferenciação dos tecidos, por divisão celular, e de crescimento, por expansão celular. Síntese e duplicação de DNA, assim como a ploidia do DNA, foram analisadas por meio de citometria (Figura 2); o acúmulo da proteína β -tubulina, a qual é essencial em microtúbulos e nos processos de expansão e divisão celular, foi analisado por eletroforese e "western blotting" (Figura 3); e a análise citológica das configurações do citoesqueleto microtubular foi feita por microscopia de imunofluorescência (Figura 4). O acúmulo de matéria seca, o conteúdo de água e os testes de germinabilidade e de tolerância à dessecação foram considerados na avaliação do perfil fisiológico das sementes (Figura 5).

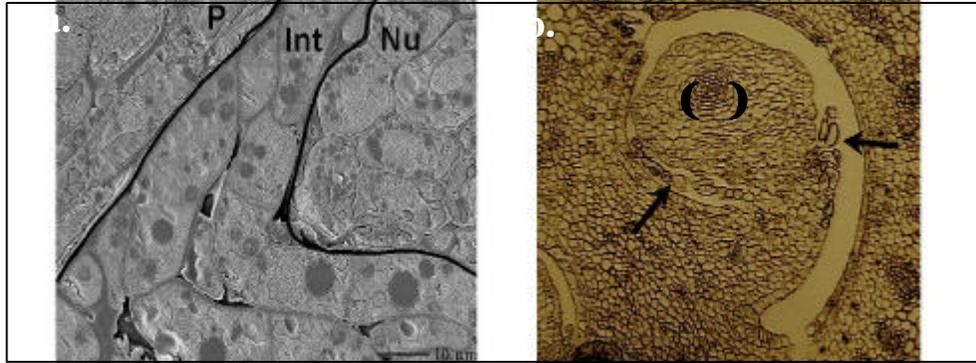


Figura 1 - Crescimento da nucela ('falsa semente'). a : Microscopia eletrônica de varredura, mostrando os diferentes tecidos de um ovário não-fecundado: Nu – nucela; Int – integumento; P – pericarpo. b : Microscopia óptica, mostrando o crescimento do tecido nucelar após a fertilização do óvulo: setas ↑ mostram os integumentos; () indica o posicionamento do óvulo fertilizado.

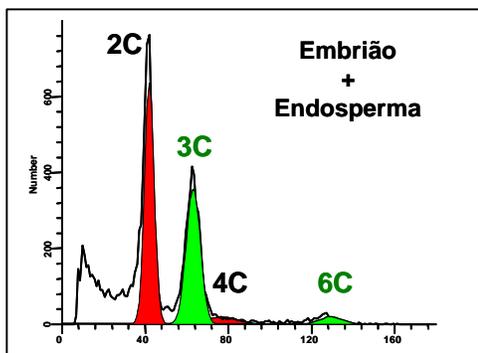


Figura 2 - Citometria.
Histograma mostrando a ploidia das células do embrião (2C) e do endosperma (3C). O número de células com DNA duplicado (4C ou 6C) indica a taxa decrescente de síntese de DNA até 150 DAP. Não se observa síntese de DNA durante a maturação.

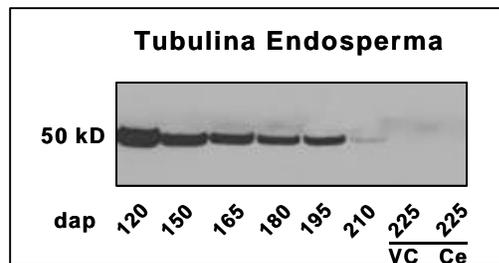


Figura 3 - Acúmulo de α -tubulina.
O western blot mostra o acúmulo decrescente de tubulina nas células do endosperma durante desenvolvimento da semente. VC – verde cana; Ce – cereja.

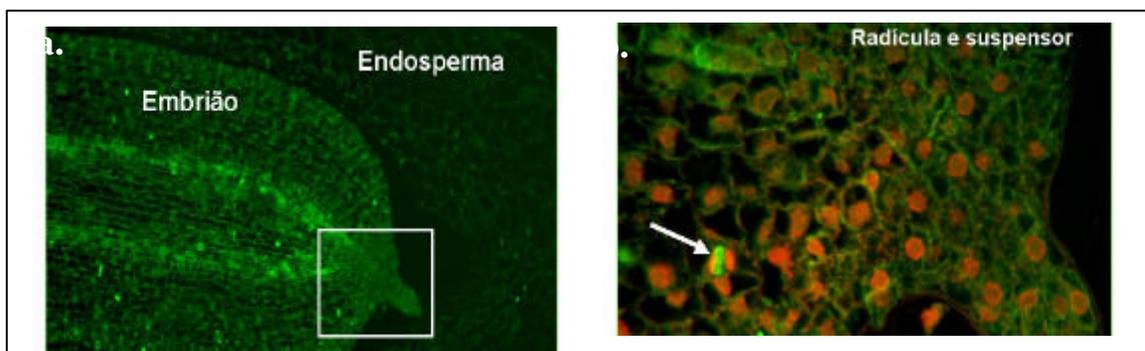


Figura 4 - Citoesqueleto microtubular.
a. Semente aos 120 DAP contendo uma abundante rede de citoesqueleto microtubular mitótico e cortical no embrião e no endosperma, indicando uma atividade intensa do ciclo celular e crescimento por divisão e expansão celular.
b. Imagem do retângulo em 'a', mostrando em detalhe a região da radícula e suspensor do embrião, contendo um grande número de células com citoesqueleto cortical e uma célula com citoesqueleto mitótico em metáfase (fragmoplasto), conforme indicado pela 'seta'.
A partir de 150 DAP, é possível observar somente as configurações de microtúbulos corticais, que são degradados junto com a tubulina no decorrer da fase de maturação, dessecação e quiescência da semente.

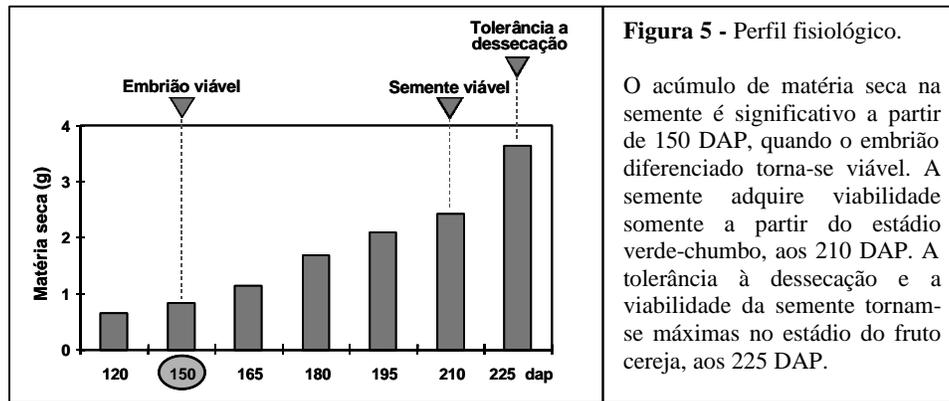


Figura 5 - Perfil fisiológico.

O acúmulo de matéria seca na semente é significativo a partir de 150 DAP, quando o embrião diferenciado torna-se viável. A semente adquire viabilidade somente a partir do estágio verde-chumbo, aos 210 DAP. A tolerância à dessecação e a viabilidade da semente tornam-se máximas no estágio do fruto cereja, aos 225 DAP.

RESULTADOS

A relação entre síntese de DNA, acúmulo de α -tubulina e configurações do citoesqueleto microtubular permitiu definir as diferentes fases do desenvolvimento. A fase de diferenciação dos tecidos da semente e embriogênese (60 a 150 DAP - Figura 6) é marcada pela ocorrência de uma atividade decrescente de síntese de DNA (Figura 2), assim como de acúmulo de tubulina (Figura 3) e das configurações mitóticas do citoesqueleto microtubular (Figura 4). Observou-se pelas análises estruturais por microscopia eletrônica e óptica (Figura 1) e de ploidia por citometria (Figura 2), que o desenvolvimento inicial do fruto deve-se ao crescimento do tecido nucelar diplóide (“falsa semente” Figura 1b), que em seguida é parcialmente degradado, cedendo espaço ao desenvolvimento do endosperma triplóide e embrião diplóide (“semente verdadeira”). Ao final dessa fase (150 DAP - Figura 6), os embriões diferenciados apresentam-se viáveis quando isolados e incubados *in vitro*. No entanto, as sementes não germinam quando avaliadas em teste de germinação. Tanto embriões isolados quanto sementes não apresentam tolerância à dessecação nesta fase (Figura 5). Na fase de maturação (150 a 225 DAP - Figuras 5 e 6) predominam eventos complementares de morfogênese através de crescimento por expansão celular, já que não se observa citoesqueleto mitótico, existindo somente citoesqueleto cortical, e acúmulo crescente de matéria seca (Figuras 5 e 6). Com o avanço da maturação e dessecação, observa-se a degradação completa do citoesqueleto cortical e tubulina (Figuras 3 e 4), levando à inativação dos eventos do ciclo celular e quiescência do embrião e da semente. A aquisição de germinabilidade pela semente é iniciada somente a partir do estágio verde-chumbo do fruto (210 DAP), tornando-se máxima no estágio cereja (225 DAP), quando a tolerância à dessecação torna-se também máxima (Figura 5).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi possível por meio do presente estudo esclarecer conclusivamente a origem dos diferentes tecidos e definir com precisão a organogênese, as diferentes fases do desenvolvimento, a ocorrência de eventos fisiológicos específicos e a anatomia da semente. Fica assim estabelecido um modelo funcional que descreve a complexidade do desenvolvimento do fruto e da semente de cafeeiro (Figura 5), compreendendo um pré-requisito fundamental em estudos de desenvolvimento e implementação de análises de expressão gênica em escala genômica (transcriptoma e proteoma) e de função dos genes na era pós-genômica (metaboloma).

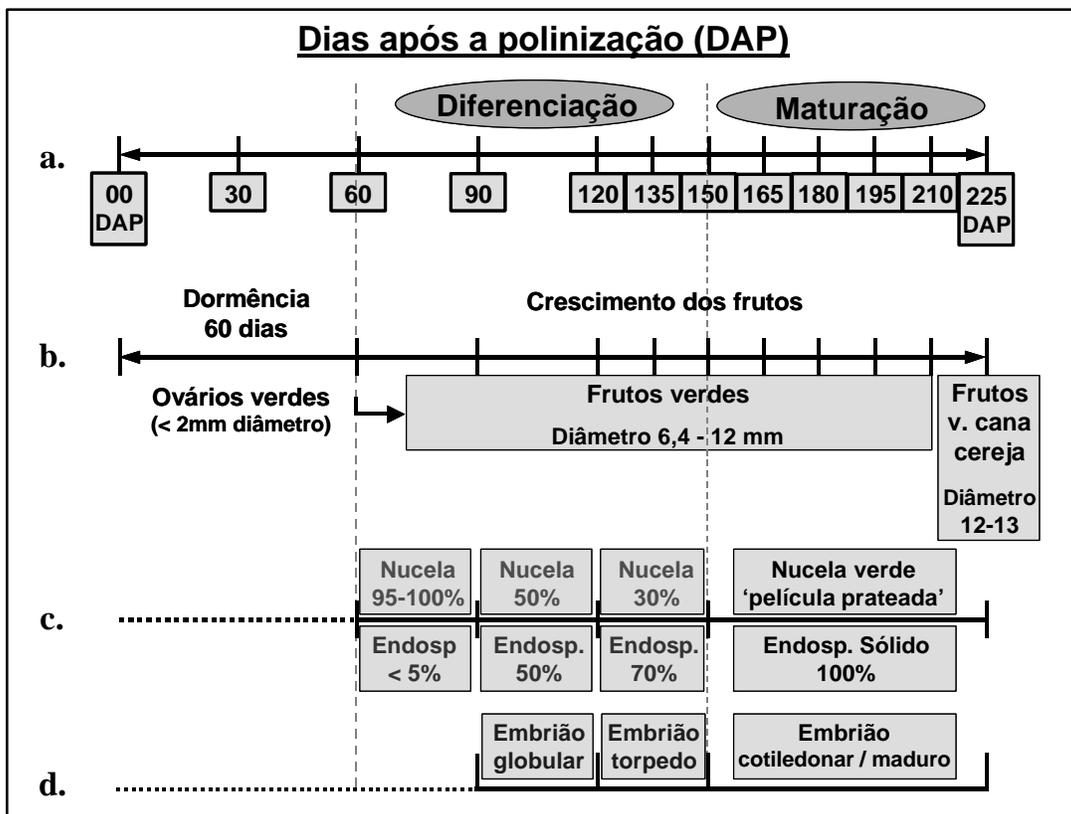


Figura 6 - Modelo funcional de desenvolvimento.

- Desenvolvimento em 'dias após a polinização', com identificação das fases de diferenciação dos tecidos e maturação da semente.
- Desenvolvimento em função do tamanho e coloração dos frutos.
- Diferenciação e organogênese do tecido nucelar e endosperma.
- Diferenciação e organogênese do embrião.

Os eventos fisiológicos são posicionados dentro do presente modelo conforme apresentados na Figura 5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACCHI, O. (1958) Estudos sobre a conservação de sementes de café. **Bragantia** 17: 261-170.
- CAMARGO, R. DE; MENDES, A.N.G.; FRAGA, A.C. E GUIMARÃES, R.J. (1996) Efeito da temperatura e tempo de secagem sobre a germinação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: **Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 22**. Águas de Lindóia: MAARA/PROCAFÉ. p.57.
- CHLAN, C.A. DURE, L.I. (1983) Plant seed embryogenesis as a tool for molecular biology. **Mol. Cell Biochem.**, 55: 5-15.
- CLAYTON, L. (1985). The cytoskeleton and the plant cell cycle. In: **The Cell Division Cycle in Plants**, (Bryant, J.A. e Francis, D., eds). Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 113-131.
- COMAI, L. e HARADA, J.J. (1990) Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 87: 2671-2674.
- DE CASTRO, R.D. A functional analysis of cell cycle events in developing and germinating tomato seeds (1998). CIP-Data Koninklijke Bibliotheek, Den Haag, p. 110.
- DE CASTRO, R.D. and Hilhorst, H.W.M. (2000) Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12: 105-136.
- DHAND, R. (2000) Functional genomics. **Nature**, 405: 819.
- DURE, L.I. (1985) Embryogenesis and gene expression during seed formation. **Oxford Survei on Plant Molecular Cell Biololgy**, 2: 179-197.
- KNIGHT, J. (2001) When the chips are down. **Nature**, 410: 860-861.
- LOCKART, D.J. and Winzeler, E.A. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. **Nature**, 405: 827-836.
- PANDEY, A. and Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. **Nature**: 837-846.
- ROBERTS, E.H. (1973) Predicting the storage life of seeds. **Seed Sci. Tech.**, 3: 499-514.
- VAN DER VOSSSEN, H.A.M. (1979) Methods of preserving the viability of coffee seeds in storage. **Seed Science and Techonology**, 7: 65-74.