



MAYARA HOLANDA DE CARVALHO

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO E
AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE *Coffea arabica*
TOLERANTE AO ALUMÍNIO**

LAVRAS – MG

2013

MAYARA HOLANDA DE CARVALHO

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE PLANTAS
DE *Coffea arabica* TOLERANTE AO ALUMÍNIO**

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

Orientador

Dr. Edilson Paiva

Coorientadores

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Dra. Evânia Galvão Mendonça

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Carvalho, Mayara Holanda de.

Estratégias para obtenção e avaliação de plantas de *Coffea arabica* tolerante ao alumínio / Mayara Holanda de Carvalho. –
Lavras : UFLA, 2013.

75 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Edilson Paiva.

Bibliografia.

1. *SbMATE* 2. *Agrobacterium rhizogenes*. 3. Transformação genética. 4. Toxicidade. 5. Solos ácidos. 6. Hidroponia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7323

MAYARA HOLANDA DE CARVALHO

**ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE PLANTAS
DE *Coffea arabica* TOLERANTE AO ALUMÍNIO**

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

APROVADA em 29 de julho de 2013.

Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Dra. Evânia Galvão Mendonça	UFLA
Dr. Leonardo Zebral Rodrigues	UFLA

Dr. Edilson Paiva
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

*A pessoa que me faz levantar todos os dias com
disposição para enfrentar a vida, minha linda
Vozinha!*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À minha família, em especial meu irmão; Luiz Felipe Holanda de Carvalho e a meus pais, Francisco e Isabel, pela dedicação e amor. Aos meus eternos amores, Junior, Marline, Carolina e Érica por todo apoio, todo carinho, toda paciência e por serem meus irmãos de coração. À minha tia Marlene e à minha linda amiga, Maria da Glória, por me ajudarem a me reerguer. Sem vocês não seria possível concretizar este sonho!

As novas amizades conquistadas em Lavras, Samuel, Evellyn, Gabriel, Michelle, Kollien, Natália, Flávia, Jéssica, Andressa, Solange, Barbára, Guilherme, Wesley, Ana Carla e Lara; pelos conselhos, momentos enlouquecidos e inesquecíveis, pela amizade e por todo o bem que me proporcionaram.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Transferência de Genes, em especial aos meus orientadores Francisco Aragão e Aisy Baldoni, por me despertarem o amor pela ciência, pela verdadeira amizade, ensinamentos, conselhos, apoio e dedicação.

Aos companheiros do Laboratório Central de Biologia Molecular e ao Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Luciano Vilela Paiva pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e à Dra Evânia Galvão Mendonça pela coorientação e amizade.

Agradeço a todos que ajudaram na realização deste sonho, Mestre em Biotecnologia Vegetal! De fato, nada em nossas vidas conseguimos sozinhos. Muito Obrigada!

“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

RESUMO GERAL

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas comercializado no mundo, sendo o segundo item em importância do comércio internacional de *commodities*. Notoriamente, o Brasil é o maior produtor, segundo maior consumidor e um dos principais exportadores dessa cultura. O grande acúmulo de alumínio (Al), em solos ácidos, é um dos maiores entraves na produção agrícola no Brasil. Predominantemente, este metal é encontrado em sua forma iônica (Al^{3+}), que é altamente tóxico às plantas e está presente em grande parte dos solos aráveis em todo mundo. Diante desse fator limitante, pesquisas resultaram na descoberta de vários genes que conferem tolerância ao Al, dentre os quais, destaca-se o *SbMATE*. Isolado a partir do sorgo, este gene é diferencialmente expresso em altas concentrações de Al^{3+} e tem sua atividade elevada no ápice radicular de genótipos tolerantes, conferindo maior resistência ao Al por liberação de citrato na rizosfera. Neste contexto, este trabalho foi realizado com os objetivos centrais de obter plantas quiméricas de *Coffea arábica* tolerantes ao Al, possibilitando a análise do comportamento dessas plantas em solução nutritiva acrescida de concentrações tóxicas de Al. A inserção de *SbMATE* aconteceu, por meio de transformação genética com duas cepas (MSU e A4) de *Agrobacterium rhizogenes*. O material vegetal utilizado foram sementes da cultivar Catiguá germinadas em meio GER com 30 dias de idade e explantes da cultivar Bourbon Amarelo, obtidos por calos embriogênicos. As plântulas da cultivar Catiguá, transformadas com a cepa MSU, tiveram 32% de eficiência de transformação, enquanto que essa taxa baixou para 16% nos explantes transformados com a cepa A4. A cultivar Bourbon obteve uma eficiência de transformação de 75%. Os ensaios, para detectar a concentração de alumínio a ser utilizada nos futuros experimentos de averiguação da tolerância das plantas transformadas, foram realizados em casa de vegetação. Foi utilizada solução nutritiva Hoagland modificada com $\frac{1}{4}$ de força. O alumínio foi fornecido na forma $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ nas concentrações de 0 $mmol \cdot L^{-1}$, 0,833 $mmol \cdot L^{-1}$, 1,666 $mmol \cdot L^{-1}$ e 2,499 $mmol \cdot L^{-1}$. O pH das soluções foi mantido em $4,0 \pm 0,2$, mediante ajustes diários com HCl 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ durante o período de 30 dias. Entre as concentrações de $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ analisadas, a de 0,888 $mmol \cdot L^{-1}$ foi a mais eficiente, sendo possível visualizar sintomas nítidos da toxicidade do alumínio sem a perda total da

planta. O período de 30 dias foi o tempo ideal para a verificação dos principais sintomas da toxicidade ao alumínio nessa concentração. Esse resultado possibilita análises para a visualização de tolerância de plantas geneticamente modificadas de *Coffea arabica*.

Palavras-chave: *SbMATE*. *Agrobacterium rhizogenes*. Transformação Genética. Toxicidade. Alumínio. Solos ácidos. Hidroponia. *Coffea arabica*.

GENERAL ABSTRACT

Coffee is one of the most important agricultural products sold worldwide, being the second item on the importance of international trade in commodities. Notoriously, Brazil is the largest producer, second largest consumer and one of the leading exporter of this crop. The large accumulation of aluminum (Al) in acid soils is one of the biggest barriers in agricultural production in Brazil. This metal is predominantly found in its ionic form (Al^{3+}), which is highly toxic to plants and is present in most of the arable land in the world. Given this limiting factor, research resulted in the discovery of several genes that confers tolerance to Al, amongst these, the gene *SbMATE* stands out. Isolated from sorghum, this gene is differentially expressed in high concentrations of Al^{3+} and has its high activity in the root apex of tolerant genotypes, conferring most tolerance to Al by citrate release in the rhizosphere. Thus, the aim of this work was the acquisition of chimeric plants of *Coffea arabica* tolerant to Al, enabling the analysis of the behavior of plants in nutrient solution plus toxic concentrations of Al. Inserting *SbMATE* happened through genetic transformation with two strains (MSU and A4) of *Agrobacterium rhizogenes*. The utilized plant material were germinated seeds of cultivar Catiguá amidst GER with 30 days of age and explants from the cultivar Bourbon obtained through embryogenic callus. The seedlings of the cultivar Catiguá transformed with the strain MSU had a 32% transformation efficiency, whereas this rate decreased to 16% in explants transformed with strain A4. The cultivar Bourbon Amarelo obtained a conversion efficiency of 75%. Assays to detect the concentration of aluminum to be used in future experiments to investigate the tolerance of transformed plants were conducted in a greenhouse. Hoagland nutrient solution used was modified with $\frac{1}{4}$ strength. Aluminum was supplied as $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ at concentrations of 0 $mmol \cdot L^{-1}$, 0,833 $mmol \cdot L^{-1}$, 1,666 $mmol \cdot L^{-1}$ and 2,499 $mmol \cdot L^{-1}$. The pH of the solutions was maintained at $4,0 \pm 0,2$ by adjusting daily with HCl 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ during the period of 30 days. Between the concentrations of $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ analyzed, that of 0,888 $mmol \cdot L^{-1}$ was the most efficient, and being possible to visualize clear symptoms of aluminum toxicity without loss of the plant. The 30 days period was the perfect time to check the main symptoms of aluminum toxicity at

this concentration. This result enables analysis to display tolerance of genetically modified plants of *Coffea arabica*.

Keywords: *SbMATE*. *Agrobacterium rhizogenes*. Genetic Transformation. Toxicity. Aluminum, Acid Soils. Hydroponics. *Coffea arabica*.

SUMÁRIO

C:\Users\MAYARA\Desktop\Dissertação Mayara Holanda de Carvalho Final revisada.docx - _Toc366500293	
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Aspectos gerais da cultura do café	15
2.1.1 Origem e história do café	15
2.1.2 Economia Brasileira no âmbito do agronegócio do café	15
2.1.3 Caracterização genética do cafeeiro	17
2.1.5 Dificuldades agronômicas	18
2.2 Alumínio	20
2.3 Gene <i>SBMATE</i> e seu mecanismo de ação	22
2.4 Transformação Genética de <i>Coffea</i>	24
2.4.1 Histórico de Transformação Genética em café	25
2.5 Hidroponia como ensaio para análises de tolerância ao alumínio em <i>Coffea</i>	30
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
ARTIGO 1 Transformação de <i>Coffea arabica</i> via <i>Agrobacterium rhizogenes</i> com o gene <i>SbMATE</i>	46
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAIS E MÉTODOS	54
2.1 Material Vegetal	54
2.2 Transformação de raízes de café por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	55
2.2.1 Plasmídeo	55
2.2.2 Transformação dos explantes	59
2.3 Análise via PCR para detecção do gene <i>SbMATE</i>	60
2.4 Avaliação da eficiência de transformação	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
4 CONCLUSÃO	68

ARTIGO 2	Desenvolvimento de um método para avaliação da tolerância ao alumínio de plantas de <i>Coffea arabica</i> oriundas de culturas <i>in vitro</i>	76
1	INTRODUÇÃO	79
2	MATERIAIS E MÉTODOS	82
2.1	Obtenções de explantes	82
2.2	Montagem do experimento de hidroponia	83
2.3	Avaliação da tolerância ao Al em solução nutritiva	83
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	87
4	CONCLUSÃO	96

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café arábica é produzido em mais de sessenta países e é classificado como um dos cinco produtos de exportação agrícola mais valorizado dos países em desenvolvimento (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2011). O comércio internacional dessa *commodity* tem importância expressiva em todos os setores da economia. Seu cultivo, processamento, comercialização, transporte e mercado proporcionam milhões de empregos em todo o mundo.

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas comercializado no mundo e no Brasil, sendo o segundo item em importância do comércio internacional de *commodities*, perdendo apenas para o petróleo. É responsável pela geração de um grande número de empregos em todos os setores da economia, indo desde os setores de máquinas, equipamentos e insumos, passando pela produção no campo e pela indústria, até o setor de serviços, como logística e comércio.

Notoriamente, o Brasil é o maior produtor, segundo maior consumidor e um dos principais exportadores dessa cultura (BRASIL, 2013).

Por ser um gênero de grande interesse social e econômico, existe uma significativa valorização no agronegócio do café. Muitas pesquisas têm promovido o desenvolvimento de cultivares cafeeiras de alta qualidade, bem como novas tecnologias de mecanização, irrigação, armazenamento, correção de solo, rotação de culturas, adubação, produção e distribuição de sementes. Um exemplo dessas pesquisas é o Projeto Genoma Café, que tem como objetivo ampliar os conhecimentos moleculares relacionados com esta cultura,

fornecendo subsídios para o melhoramento genético dessa planta (VIEIRA, 2006).

Esforços convencionais puderam cumprir com a maioria das necessidades da agricultura para a produção de café. Estratégias de melhoramento clássico garantiram sucesso notável na seleção e produção de cultivares resistentes a diferentes doenças, tais como a ferrugem alaranjada das folhas e a antracnose dos frutos (SILVA et al., 2006), além da obtenção de variedades com alterações na arquitetura da planta e no período de maturação dos frutos (SERA, 2001).

Entretanto, quando apenas técnicas “tradicionalis” são utilizadas, a identificação de problemas e a introdução de um novo traço em uma variedade de café, passam a ser processos longos que podem perfazer de 20 a 35 anos antes da liberação de um novo cultivar. As técnicas de engenharia genética trazem a possibilidade de obtenção destes genótipos melhorados, em tempo reduzido e de forma mais pontual. Este fato fortalece a necessidade de estudos e aquisição de novos protocolos de transformação genética em *Coffea* auxiliando no melhoramento desta espécie (RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006).

Assim como outras culturas, a produção de café reflete na combinação eficiente de clima, disponibilidade de água, controle de pragas e doenças, condições de solo, entre outros aspectos. As áreas de produção de milho, sorgo, soja e café concentram-se na região dos Cerrados, que possuem solos originalmente ácidos, com baixa fertilidade (FAGERIA, 1989). O grande acúmulo de alumínio em solos ácidos é um dos maiores entraves na produção agrícola no Brasil, a forma mais abrangente nesses é o Al^{3+} , que é altamente tóxico às plantas e está presente em grande parte dos solos aráveis em todo mundo (ECHART; MOLINA, 2001; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2007).

Diante desse fator limitante, pesquisas resultaram na descoberta de vários genes que conferem tolerância ao alumínio. Dentre esses, destaca-se o

SbMATE. Isolado a partir do sorgo, este gene é diferencialmente expresso em altas concentrações de Al^{3+} e tem sua atividade elevada no ápice radicular de genótipos tolerantes, conferindo maior tolerância ao Al por liberação de citrato na rizosfera (MAGALHAES et al., 2004, 2007). A transformação genética pode ser uma ferramenta útil para potencializar o desempenho de plantas economicamente importantes cultivadas em solos ácidos ricos em alumínio.

Neste contexto, este trabalho foi realizado com os objetivos centrais de obter plantas quiméricas de *Coffea arábica* tolerantes ao Al e o desenvolvimento de um método eficiente para análise visual da tolerância ao alumínio de plantas oriundas de culturas *in vitro*, possibilitando a posterior análise do comportamento em solução nutritiva acrescida de concentrações tóxicas de Al, das plantas geneticamente transformadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura do café

2.1.1 Origem e história do café

A planta de café é originária da Etiópia, mas essa cultura foi propagada mundialmente pela Arábia e, a partir de 1615, entrou no Continente Europeu, levada por viajantes (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2013). O café chegou ao norte do Brasil, mais precisamente em Belém, em 1727, trazido da Guiana Francesa. Graças às condições climáticas favoráveis, o cultivo de café, rapidamente, espalhou-se pelas demais regiões brasileiras. Em um espaço de tempo relativamente curto, o café assumiu a posição de produto base da economia brasileira. Findo o ciclo da mineração, o ciclo do café durou por quase um século, sendo considerado a grande riqueza brasileira (ALONSO-SALCES et al., 2009; CARVALHO et al., 2008).

2.1.2 Economia Brasileira no âmbito do agronegócio do café

De acordo com o Informe Estatístico do Café, publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2013), o Brasil é o maior produtor mundial de café, o segundo maior consumidor da bebida e um dos principais exportadores de café solúvel e torrado do mundo. A cafeicultura tem uma área plantada de 2,3 milhões de hectares, o equivalente a cerca de seis bilhões de pés, pouco mais da metade apenas no Estado de Minas Gerais.

Estimativas da produção brasileira de café (arábica e robusta), para a safra de 2013, indicam que a colheita será de 48,59 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado. Em 2012, a produção alcançou 50,83 milhões de

sacas, tal resultado apresentou uma queda de 4,4% quando comparado com as estimativas para 2013 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013).

Essa redução é observada com maior enfoque no café arábica, com queda de 5,1% (1,94 milhão de sacas), em relação ao robusta, que apresentou uma diminuição de 2,4% (298 mil sacas). O ciclo de baixa bienalidade, na maioria das áreas plantadas de café arábica e o regime de chuvas bastante irregular, aliado às altas temperaturas, são os responsáveis pela redução da produtividade (CONAB, 2013).

A maior safra de ciclo de baixa bienalidade já produzida no país é esperada para este ano. Diante das estatísticas realizadas pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a respeito das últimas safras, nota-se que está sendo reduzida a diferença entre as de alta e baixa bienalidade. Fatores extremamente importantes e necessários, para o avanço e modernização da cafeicultura, tais como a maior utilização da mecanização, aliada às inovações tecnológicas, às exigências do mercado, à qualidade do produto e à boa gestão da atividade, influenciaram essa diminuição entre as safras (CONAB, 2013).

O café é produzido em 15 estados brasileiros, está presente em cerca de 1.900 municípios e emprega direta e indiretamente 8,4 milhões de trabalhadores (BRASIL, 2013). A área plantada com a cultura de café (espécies arábica e robusta) no país totaliza 2.341,73 mil hectares. O resultado mostra um crescimento de 0,54% sobre a área de 2.329,36 mil hectares existentes na safra 2012, ou seja, foram acrescentados 12.370 hectares. Em Minas Gerais está concentrada a maior área com 1.221,04 mil hectares, predominando a espécie arábica com 98,8%. A área total estadual representa 52,66% da área cultivada com café no país e, conseqüentemente, o primeiro do ranking nacional. No Espírito Santo está a segunda maior área plantada com a cultura cafeeira, totalizando 498.952 hectares, sendo 311.067 hectares com a espécie robusta e

187.885 hectares com a arábica. O estado é o maior produtor da espécie robusta, com participação de 60,95% na produção do país (CONAB, 2013). O mercado brasileiro de café é o mais desenvolvido dentre os produtos agrícolas nacionais, apresentando o maior volume de transações entre os contratos negociados na Bolsa de Mercadorias e Futuros - BM&FBOVESPA (2010), o que demonstra a influência econômica do produto no agronegócio do país. Várias empresas, institutos e universidades possuem programas direcionados à cultura. O Projeto Genoma Brasileiro do Café foi desenvolvido em parceria entre CBP & D Café (Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia além de outras instituições Federais, com o objetivo de elucidar, detalhadamente, a função dos milhares de genes ligados aos diferentes processos metabólicos e de desenvolvimento das plantas de café. A criação de um banco de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) das espécies *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* permitiu a identificação de cerca de 33.000 diferentes unigenes e viabilizou, ainda, a construção de mapas genéticos que, potencialmente, aumentarão a densidade de marcadores moleculares e auxiliarão no melhoramento de novas variedades. De forma geral, o CAFEST fortaleceu a capacidade de pesquisa do Consórcio nas áreas de genômica (BARRETO et al., 2011), bioinformática (LIMA et al., 2011) e biologia estrutural (VIEIRA, 2006).

2.1.3 Caracterização genética do cafeeiro

Cento e três espécies são catalogadas dentro do gênero *Coffea*, entretanto apenas três espécies destacam-se no cenário mundial, sendo essas conhecidas como: *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea liberica* (DAVIS et al., 2006). As principais espécies cultivadas que dominam o mercado

financeiro são *Coffea arabica* (70%) e *Coffea canephora* (30%). *C. arabica* e *C. canephora* apresentam várias diferenças genéticas e reprodutivas. A primeira é um híbrido natural das espécies *C. canephora* e *Coffea eugenioide*, é alotetraploide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) e autógama, possuindo 90% de autofecundação. A segunda é alógama obrigatória e diploide ($2n = 2x = 22$ cromossomos). As espécies de *C. canephora* apresentam uma resistência natural para doenças e pragas e concentrações de cafeína maiores do que espécies de *C. arabica*, porém a bebida feita a partir de *C. arabica* é mais apreciada e possui um conceito mais alto entre a sociedade (MONDEGO et al., 2011). A maioria das cultivares comercial de *C. arabica*, incluindo Caturra, Mundo Novo e Catuai, foram criadas por apenas duas populações base: Bourbon e Typica (ANTHONY et al., 2002). A cultivar Caturra é um mutante anão do grupo Bourbon, enquanto Mundo Novo é um híbrido entre Bourbon e Typica e a cultivar Catuai resultou de um cruzamento entre Mundo Novo e Caturra (VIDAL et al., 2010). A cultivar Catiguá, oriunda do cruzamento entre Catuai Amarelo IAC 86 e uma planta da seleção de Híbrido de Timor UFV 440-10, apresenta características muito apreciadas pelos consumidores de cafés especiais além de possuir resistência à ferrugem. Essas características credenciam essa cultivar para plantios, visando à produção de cafés especiais, também designados como *gourmet* (OLIVEIRA; PEREIRA, 2013). Apesar de ser grande o número de variedades de café cultivadas, essas, ainda, são suscetíveis a diversos problemas agrícolas presentes no cultivo de toda espécie economicamente importante.

2.1.5 Dificuldades agronômicas

A produção de café reflete na combinação de vários fatores como solo, clima, espaçamento, disponibilidade de água, controle de pragas e doenças. Os

programas de melhoramento possuem como objetivo o aperfeiçoamento de características agronômicas importantes, como rendimento da safra, floração, tamanho das sementes, qualidade da bebida, teor de cafeína, alcance de uma maior produtividade, boa adaptabilidade a condições de solo e clima, estabilidade na produção ao longo dos anos e resistência a doenças e tolerância a pragas como ferrugem, nematoides, bicho mineiro, broca entre outras. Apesar dos esforços sólidos, o progresso no melhoramento de café, utilizando abordagens convencionais, tem sido lento, em razão de fatores relevantes como a base genética estreita de café cultivado, tempo tomado para o avanço da segunda geração, o custo elevado de ensaios de campo, a falta de precisão do processo de produção, as diferenças de nível de ploidia entre outras espécies diploides de *C. arabica* e a incompatibilidade de espécies (MISHRA; SLATER, 2012; RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006). Outra restrição dos programas de melhoramento de café arábica é a seleção de linhagens parentais, geneticamente diferentes, por meio de hibridização e a identificação de híbridos na fase inicial de crescimento das plantas, considerando características morfológicas. Isso ocorre pelo fato da maioria das cultivares comerciais serem morfológicamente idênticas, dificultando, assim, a distinção entre elas (MISHRA; SLATER, 2012). Uma das maiores restrições na produção agrícola é a presença de solos ácidos associados a metais tóxicos. Entre esses metais, o alumínio se destaca como um dos maiores problemas em solos com $\text{pH} \leq 5,0$. Em escala global, os solos ácidos ocupam cerca de 37,8 milhões de Km^2 , dos quais 67% apresentam valores de pH inferiores a 5,5 (ESWARAN; REICH; BEINROTH, 1997). Os níveis de acidez do solo estão aumentando em decorrência de atividades humanas. A liberação atmosférica de poluentes industriais, associada à lixiviação de solos com chuvas ácidas, às atividades de mineração, e, no setor agrícola, à nitrificação subsequente à aplicação de altas doses de fertilizantes

amoniacais, são uns dos motivos da acidificação antropogênica dos solos (ECHART; MOLINA, 2001).

2.2 Alumínio

O Al é o terceiro elemento mais abundante na litosfera, participando com 8% na composição da crosta terrestre. Esse metal ocorre em diferentes formas no solo, dependendo do seu pH. Em solos ácidos a forma mais abrangente é a $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ (Al^{3+}), que é altamente tóxica. O Al^{3+} está presente em 40% dos solos aráveis em todo o mundo (ZHANG et al., 2007).

A toxicidade causada pelo alumínio consiste em uma limitação fundamental na produção de 38% das terras agrícolas no Sudeste da Ásia, 31% da América Latina e 20% das terras cultiváveis na Ásia Oriental, África Subsaariana e da América do norte. Isto constitui um problema seriíssimo na agricultura mundial e, dentro dos estresses abióticos, é superado apenas pelo estresse hídrico (MAGALHAES et al., 2007).

Esse metal afeta diretamente o sistema radicular das plantas, promovendo inibição do crescimento das raízes, o que pode ocasionar deficiências minerais e estresse hídrico (DEGENHARDT et al., 1998), formação de calose e exudação de ácidos orgânicos (RENGEL, 1996). A intoxicação das plantas por Al^{3+} é de difícil identificação, pois os sintomas foliares são muito parecidos com a deficiência de cálcio e/ou fósforo. Nas raízes os sintomas são bem característicos, elas apresentam formações curtas, grossas, amarronzadas e quebradiças, com ramificações finas e escassas (FOY, 1976; KOCHIAN, 1995). Essas anomalias e danos causados ao sistema radicular implicam uma menor exploração do solo pelas plantas, resultando em deficiências na absorção de nutrientes como o fósforo e no aproveitamento da água do solo, o que pode ser mais nocivo (ECHART; MOLINA, 2001).

Em solos ácidos há uma maior limitação na absorção de fósforo pelas plantas, podendo essa ser inferior a 10% (BALIGAR; FAGERIA, 2001). Em virtude da alta absorção nas argilas do solo, o fósforo tem o seu fluxo difusivo limitado, o que propicia a necessidade de aplicação de adubos fosfatados. Porém, esse elemento possui uma alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, o que resulta na imobilização desse fosfato inorgânico solúvel aplicado no solo (HINSINGER, 2001; MARSCHNER, 2003). Complicando ainda mais o cenário agrícola, a segunda maior fração do fósforo total presente no solo está na forma orgânica entre 30 e 50%, e, também, não está prontamente disponível para as plantas (MARSCHNER; SOLAIMAN; RENGEL, 2006; RICHARDSON; GEORGE; SIMPSON, 2005). Todos esses impasses levam à maior utilização de insumos fosfatados, o que gera um aumento significativo nos custos de produção (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003).

Espécies de plantas variam extensivamente no grau de tolerância ao Al e as plantas tolerantes apresentam diferentes mecanismos para sobreviverem à presença desse metal (ECHART; MOLINA, 2001).

De modo geral, existem dois tipos de mecanismos de tolerância ao Al. O primeiro mecanismo está relacionado com a tolerância a altas concentrações de Al no simplasto da raiz. Essa tolerância pode ser adquirida pela quelação do Al do citosol, armazenamento nos vacúolos, ligações alumínio-proteínas e evolução de enzimas tolerantes ao Al. O segundo mecanismo está relacionado com a capacidade de eliminar o Al do ápice da raiz. Isso pode ocorrer por imobilização do Al nas paredes celulares, permeabilidade seletiva do Al na membrana plasmática, formação de uma barreira de pH induzida pela planta na rizosfera ou no apoplasto da raiz e eliminação de ligantes quelantes (TAYLOR, 1988).

Um dos principais mecanismos de tolerância envolve a ativação de transportadores de membrana que liberam ácidos orgânicos. Esses ácidos formam complexos estáveis não tóxicos com o alumínio. Um exemplo disso é o

gene *AIMT1* que confere tolerância ao alumínio em trigo (*Triticum aestivum*) por meio da liberação de malato (RAMAN et al., 2005; SASAKI et al., 2004).

Foi descoberto recentemente um novo gene presente em sorgo (*Sorghum bicolor*) que confere tolerância ao alumínio pela liberação de citrato. Diante de altas concentrações de Al^{3+} ocorre a expressão desse gene com maior atividade no ápice radicular de genótipos tolerantes (MAGALHÃES; GUIMARÃES, 2008). Estudos mostraram que os principais ácidos orgânicos secretados pela raiz e que conferem tolerância ao Al^{3+} são o citrato, malato e o oxalato e o citrato é o quelante mais eficiente entre os três (WANG et al., 2012).

2.3 Gene *SBMATE* e seu mecanismo de ação

Por meio de mapeamento de populações, o gene *SbMATE* foi encontrado na região terminal do cromossomo 3 presente no locus *Alt_{Sb}* (MAGALHÃES et al., 2004). Esse gene, assim como os genes *Altg 51340* de *Arabidopsis thaliana* (GREEN; ROGERS, 2004) e o *Os01g69010* de arroz, é representante de uma família multigênica de transportadores de membranas chamada MATE (Multidrug and Toxin Compound Extrusion Family), caracterizada pelo efluxo de moléculas orgânicas pequenas (BROWN; PAULSEN; SKURRAY, 1999). Proteínas MATE são membros de uma família grande e complexa de transportadores e membros funcionais foram identificados primeiramente em organismos procariotos e só depois em eucariotos. Estão, geralmente, envolvidos no efluxo de pequenos solutos orgânicos, este traço é conservado na filogenia dessa família (HE et al., 2004; HVORUP et al., 2003; MORITA et al., 1998).

Como descrito anteriormente, o gene *AIMT1*, que confere tolerância ao Al^{3+} em trigo, possui grande similaridade em seu modo de ação com o gene *SbMATE*, uma vez que os dois genes conferem tolerância ao trigo e sorgo,

respectivamente, por meio da exsudação de ácidos orgânicos pelo ápice radicular. Apesar dessa semelhança, os dois genes não são integrantes da mesma família, sendo completamente distintos geneticamente (MAGALHAES et al., 2007).

A região codificadora do gene *SbMATE*, analisada em duas linhagens de sorgo, uma sensível ao alumínio e a outra tolerante, é idêntica nas duas, apresentando polimorfismos somente dentro de um único íntron. Essas regiões polimórficas abrigam um elemento denominado MITE (Tourist-like miniature inverted repeat transposable element). Estudos mostraram que mutações relacionadas com a tolerância ao alumínio estão localizadas em regiões reguladoras de *Alt_{sb}* e, provavelmente, atuam no aumento da expressão do gene *SbMATE* no ápice radicular. Acredita-se que esses elementos MITES estão intimamente relacionados com a maior expressão do gene em linhagens tolerantes, uma vez que expansões e contrações dessa região foram observadas em diferentes linhagens de sorgo, e as variações alélicas resultantes estão correlacionadas com diferenças de expressão e de tolerância ao Al^{3+} (MAGALHAES et al., 2007).

Ensaio em meio hidropônico contendo alumínio foram realizados utilizando linhagens sensíveis e tolerantes de sorgo. Na linhagem isogênica sensível houve uma drástica inibição no crescimento radicular causada pela toxicidade do Al, tendo taxas de exsudação de citrato extremamente reduzidas e níveis de expressão do gene *SbMATE* abaixo do limite de detecção. Nas linhagens tolerantes, as plantas não desenvolveram sintomas, além de terem uma alta expressão do gene *SbMATE* e uma grande exsudação de citrato pelos ápices radiculares (MAGALHAES et al., 2007).

Por meio de análises quantitativas de PCR em tempo real, foi demonstrado que o gene *SbMATE* tem sua expressão diretamente proporcional

ao tempo de exposição ao alumínio e que essa é mais observada no primeiro centímetro radicular (MAGALHAES et al., 2007).

Eventos transgênicos de *Arabidopsis thaliana*, trigo, sorgo e milho, superexpressando o gene *SbMATE* de forma constitutiva, apresentaram uma tolerância substancialmente maior ao alumínio quando comparadas às linhagens isogênicas não transgênicas (MAGALHÃES et al., 2007; PÔSSA, 2010). Tais resultados evidenciam que esse gene pode ser usado para expressão heteróloga via transgenia, representando um novo patamar para a exploração genética da tolerância ao Al em programas de melhoramento vegetal.

2.4 Transformação Genética de *Coffea*

Durante os últimos quinze anos, a engenharia genética em café tem como base dois objetivos principais. O primeiro é promover a elucidação, regulação e interação de genes de interesse agrônômico por uma abordagem de genômica funcional. O segundo, realizar a introdução de genes-alvo a fim de obter genótipos com características desejáveis (MISHRA; SLATER, 2012).

Alguns dos genes isolados do genoma de *Coffea*, usados em experimentos de transformação genética, incluem um gene da síntese de teobromina (*CaMXMTI*) para a biossíntese de cafeína supressora (OGITA et al., 2004) e um gene de oxidase de *ACC* envolvido na biossíntese de etileno (RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006). Os genes *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* que conferem resistência ao bicho-mineiro (HENRY; ALTOSAAR; PHILIPPE, 2000), o gene *α -AII* de feijoeiro que confere resistência à broca do café (INÁCIO; RODRIGUES; CAMPANHOLA, 2004) e o gene *BAR* para tolerância a herbicidas (KUMAR et al., 2006; RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006) são alguns exemplos de genes introduzidos ao café a partir de fontes heterólogas.

Na maioria dos experimentos de transformação de café, relatados até o momento, com poucas exceções, o promotor CaMV35S, derivado do vírus do mosaico da couve-flor, é o mais usado em construções transgênicas (MISHRA; SLATER, 2012). Um estudo, realizado para análise comparativa da expressão de diferentes promotores carregando o gene *uidA*, mostrou que o promotor *EF-1 α* de *Arabidopsis thaliana* apresentou uma alta expressão transitória em comparação aos outros promotores utilizados no mesmo trabalho (BOXTEL et al., 1995). Deste modo, este promotor foi utilizado posteriormente pelo mesmo grupo, para transformação via *Agrobacterium* com o objetivo de inserir o gene *cryIac* em café (ARROYO-HERRERA et al., 2008; HENRY; ALTOSAAR; PHILIPPE, 2000). A eficácia do promotor CaMV35S foi verificada em um estudo onde os autores compararam este promotor com dois promotores de café (α -tubulina e α -arabigin) que revelaram um nível similar de expressão transiente do gene *uidA* (ROSILLO et al., 2003). Estes resultados demonstraram que é possível a utilização de novos promotores em experimentos de transformação de café.

2.4.1 Histórico de Transformação Genética em café

a) Transformação via *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes é uma bactéria patogênica de solo que induz a doença ‘hairy root’ em plantas dicotiledôneas, caracterizada pela proliferação de raiz no local da infecção (GAUDIN; VRAIN; JOUANIN, 1994). Essas raízes apresentam, na maioria das vezes, um fenótipo particular caracterizado por um padrão de raízes altamente ramificadas e de desenvolvimento plagiotrópico atribuído ao seu alto conteúdo de auxina endógena (NILSSON; OLSSON, 1997).

As 'hairy root' possuem uma capacidade de crescimento independente e oferecem uma interessante propriedade de regeneração, evitando a formação de calos, podendo, assim, contornar problemas de variação somaclonal (BOSSSELUT et al., 2011).

Em café, clones derivados de 'hairy root' apresentaram variações como folhas frágeis e enrugadas, crescimento atrofiado e internódios curtos (KUMAR et al., 2006).

Em 1993, pesquisadores franceses foram os pioneiros em transformação genética com *A. Rhizogenes* em café. Eles obtiveram uma grande eficiência com uma quantidade elevada (10-40%) de raízes regeneradas, expressando o gene *gus*, a confirmação da integração do vetor foi visualizada pelas técnicas de PCR e Southern blotting. No entanto, as plântulas regeneradas, também, apresentaram fenótipos anormais quando transferidas para a estufa (SPIRAL et al., 1993).

Treze anos depois, pesquisadores franceses transformaram raízes de café com as cepas A4, ARqual, 1724, 2659 e 8196. Raízes transformadas foram obtidas com todas as cepas exceto para a cepa 8196 e a cepa A4 mostrou-se muito mais eficiente (80%). O hipocótilo provou ser o órgão mais reativo para transformação, quando comparado com cotilédones e raízes, dessa vez nenhuma diferença morfológica foi observada entre eventos transgênicos e não transgênicos. As raízes derivadas da infecção não apresentaram nenhum distúrbio no geotropismo. O objetivo desse grupo foi avaliar, por meio de estudos funcionais, genes de resistência a nematoides. Foi observado que plantas transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* oferecem uma grande vantagem sobre culturas axênicas, gerando informações em todo nível da planta e possibilitando a realização de estudos de análise funcional em condições não axênicas (ALPIZAR et al., 2006).

Em 2009, a cultivar Catuaí foi transformada, utilizando a cepa MSU de *Agrobacterium rhizogenes*, com o objetivo de avaliar a tolerância ao stress

hídrico com a inserção do gene *SHINE*. Neste trabalho foi alcançada uma taxa de 32% de eficiência de transformação e as plantas transformadas apresentaram uma tolerância, substancialmente, mais alta quando comparadas com os controles (STEIN, 2009).

b) Transformação via Biobalística

O primeiro trabalho publicado usando a técnica de biobalística em café tinha como objetivo a avaliação da expressão transiente do gene *uidA* em suspensões celulares, embriões somáticos e folhas. Folhas de microestacas *in vitro* apresentaram uma maior expressão, quando comparadas com as folhas de plantas cultivadas em estufa e o promotor EF1 α -A1 de *Arabidopsis thaliana* apresentou uma expressão cinco vezes maior em relação ao CaMV35S (BOXTEL et al., 1995). Em outro trabalho foi observada a expressão transiente do gene *uidA* em suspensões celulares de *Coffea arabica*, avaliando vários parâmetros físicos da transformação e pré - tratamentos dos explantes em diferentes soluções osmóticas. As análises foram encerradas na fase de formação de calos pela falta de regeneração de plantas transgênicas (ROSILLO et al., 2003).

As primeiras plantas transgênicas de café, obtidas a partir do processo de biobalística, foram alcançadas em 2004, neste estudo foram utilizados calos embriogênicos (*C.arabica*), os quais foram submetidos a um pré-tratamento osmótico em meio de cultura contendo 0,5 M manitol, por 24 h antes do bombardeamento, utilizando os parâmetros de transformação conforme Aragão et al. (1996) e Cunha et al. (2004).

Porém o primeiro relato de sucesso da regeneração de plantas transgênicas de café (*C.canephora*), utilizando esse método de transformação, foi publicado por Ribas et al. (2005a). Neste trabalho plantas transgênicas de *C. canephora* foram obtidas, por meio do

bombardeamento de calos embriogênicos, porém os explantes foram submetidos a somente 4 h de pré-tratamento em meio de embriogênese acrescido de 0,4 M de manitol antes do bombardeamento. A expressão transiente do gene *uidA* foi observada 24 h após o bombardeamento, bem como sua expressão estável em calos com 4 meses e em plântulas transgênicas regeneradas de calos embriogênicos.

Em 2009, Albuquerque et al. (2009) obtiveram plantas transgênicas de *C. arabica* expressando os genes *nptII* e *uidA* sob o controle do promotor 35S CaMV. A expressão do gene *gus* foi verificada em diversos tecidos entre eles flores e frutos e a segregação do gene *uidA* foi observada na progênie. No ano seguinte, plantas transgênicas foram desenvolvidas a partir de calos embriogênicos de *C. arábica* expressando o gene heterólogo α -*AII* (inibidor da α -amilase 1 clonada de *Phaseolus vulgaris*) para resistência ao inseto *Hypothenemus hampei* (broca-do-café), três plantas apresentaram uma taxa entre 20 e 88% de inibição da α -amilase da broca-do-café (BARBOSA et al., 2010).

c) Transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

Ocampo e Manzanera (1991) foram os primeiros a demonstrar que os tecidos de *C. arabica* podem ser infectados por estirpes selvagens de *A. tumefaciens*. Outro relato de transformação genética de café usando *A. tumefaciens* foi à infecção de protoplastos com diferentes estirpes contendo os marcadores NPTII e β -glucuronidase. A expressão transiente foi demonstrada por meio de ensaios histoquímicos, mas não houve regeneração de plantas (SPIRAL; PÉTIARD, 1991).

Hatanaka et al. (1999) transformaram calos embriogênicos de *C. canephora*, utilizando a cepa de *A. tumefaciens* EHA101 carregando o plasmídeo pIG121-Hm, contendo o gene *gus*, higromicina-fosfotransferase

(*HPT*) e neomicina-fosfotransferase II (*NPTII*). Os genes *gus* e *hpt* foram detectados por PCR em plantas transgênicas.

O primeiro trabalho de transformação de café usando um gene de interesse agrônômico foi publicado nove anos mais tarde. Embriões somáticos de *C.arabica* e *C.canephora* foram transformados com *A. tumefaciens* com o objetivo de obter plantas resistentes ao inseto *Perileucoptera coffeella* (bicho-mineiro), usando o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* (LEROY et al., 2000).

Ogita et al. (2004), também, usou a cepa EHA101 carregando o plasmídeo pIG121-Hm contendo o gene *GFP*. A expressão do gene pode ser detectada em embriões somáticos regenerados e em plantas completamente regeneradas.

No mesmo ano, vinte genótipos de *C.arabica* e *C. canephora* foram transformados com dois genes, um para tolerância ao herbicida chlorsulfuron (*CSRI-1*) e o outro para o bicho mineiro (*CRYI-AC*) (LEROY; DUFOUR, 2004). Embriões somáticos de *C. canephora* foram transformados usando a cepa EHA105 de *A. tumefaciens* contendo o gene *BAR* que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio (RIBAS et al., 2005b).

As condições de transformação por agrobactéria, como a concentração da suspensão bacteriana e o tempo utilizado no cocultivo foram variáveis. A concentração bacteriana (OD600 nm) mais utilizada foi em torno de 0,5 (LEROY; DUFOUR, 2004) variando de 0,2 (RIBAS et al., 2005a) a 0,6 (HATANAKA et al., 1999). O tempo de cocultivo variou de 10 minutos (OGITA et al., 2004) a quatro dias (MISHRA; SREENATH, 2004). Outras práticas têm sido utilizadas para melhorar a infecção por *A. tumefaciens*, como por exemplo, a incubação no escuro, a utilização de acetosiringona durante o cocultivo, a sonicação, durante a infecção (RIBAS et al., 2005a), o fermento nos explantes antes da infecção (LEROY et al., 2000) e a infiltração a vácuo como método de transformação (CHANCE-MOO et al., 2006).

2.5 Hidroponia como ensaio para análises de tolerância ao alumínio em *Coffea*

A hidroponia é uma técnica de cultivo de plantas sem a adição de um substrato, utilizando água contendo nutrientes dissolvidos como fonte de subsistência. Suas inúmeras vantagens incluem o crescimento rápido, alta produtividade, fácil gerenciamento e segurança ambiental (SANTOS et al., 2013).

O estudo dos fenômenos da nutrição vegetal, como os sintomas manifestados pelas plantas em consequência da deficiência ou excesso dos elementos minerais, é extremamente facilitado pelo uso de soluções nutritivas. Isso pelo fato de controlar, com maior precisão, as quantidades e proporções dos elementos disponíveis para as plantas, sua forma química, a acidez do meio, entre outros fatores relevantes (MENDES, 1949).

Esses estudos realizados em campo apresentam algumas desvantagens, como o tempo requerido para realização do experimento, vulnerabilidade do material a condições adversas (como seca ou inundação) e a dificuldade em interpretar os dados obtidos, por meio do desempenho e desenvolvimento das plantas, em função da complexidade das interações do meio ambiente (ECHART; MOLINA, 2001).

Em estudos de caracterização de cultivares tolerantes ao Al^{3+} , onde existe uma necessidade do emprego de solos sob condições controladas, há uma enorme dificuldade de seleção de solos adequados para esse tipo de experimento, uma vez que nos solos a toxidez desse cátion pode não ser o único fator que promove o mau desenvolvimento das plantas. Além desse impasse, o primeiro sintoma causado pela toxidez do Al^{3+} é a inibição do crescimento radicular. Estudos estabelecidos em solo, com o objetivo de identificar cultivares tolerantes a esse metal, apresentam uma grande dificuldade na detecção dos sintomas primários (ECHART; MOLINA, 2001).

Em virtude dessas limitações, a maioria dos trabalhos realizados com esse objetivo são conduzidos em soluções nutritivas, podendo, assim, ter uma maior avaliação na tolerância e sensibilidade ao alumínio em diferentes culturas. O critério mais utilizado, para determinar a tolerância ao Al^{3+} , é a comparação entre o crescimento radicular de plantas submetidas à solução nutritiva com pH ácido e adição de alumínio e plantas controle crescidas em solução nutritiva na ausência deste. Outros métodos estão sendo bastante utilizados, como coloração por Hematoxilina, comparações do número de ramificações laterais e comparação do número de raízes (CAMBRAIA; CAMBRAIA, 1995).

Em café, a solução nutritiva mais utilizada em experimento com o objetivo de identificação de genótipos tolerantes é a de Hoagland e Arnon (1950). Apesar disso, para o cultivo das plantas em hidroponia, são realizados testes onde há variação na concentração da solução e na concentração de alumínio. O pH da solução nutritiva na maioria dos trabalhos realizados com café é 4,0. Outro fator importante no estabelecimento das análises de tolerância é a concentração de fósforo e esta deve ser menor nos tratamentos com alumínio, com o propósito de diminuir a precipitação do metal, uma vez que esse possui uma alta afinidade com o fósforo (BRACCINI et al., 1998; BRACCINI; MARTINEZ; BRACCINI, 2000; MENDES, 1949; MISTRO; FAZUOLI; OLIVEIRA, 2007).

Pavan e Bingham (1982) observaram que o efeito inicial da toxidez de alumínio em cafeeiros foi caracterizado por um retardo no desenvolvimento e crescimento radicular, aumento no diâmetro das raízes e diminuição no número de raízes laterais por unidade de raiz principal. Observaram, também, reduções progressivas no crescimento da parte aérea em plantas com seis meses de idade. As características da toxicidade do Al^{3+} em folhas jovens de café são o surgimento de clorose, com pontos necróticos na margem e com aspecto típico

de enrolamento. Enquanto que nas folhas velhas é possível observar uma clorose marginal progredindo para o centro do limbo.

Na literatura pesquisada não foram encontrados estudos para o estabelecimento do grau de tolerância ao alumínio utilizando plantas desenvolvidas *in vitro*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A transformação genética de plantas, com o objetivo de resistência ao alumínio, é, sem dúvida, um excelente caminho para aumentar o desempenho de plantas economicamente importantes cultivadas em solos ácidos ricos nesse metal. Esse problema afeta a maioria dos solos arados não só na América Latina, mas também em grande parte do mundo.

Vários estudos mostraram que o sintoma da toxicidade do Al, visível mais rapidamente em plantas, é a inibição do crescimento da raiz, o que resulta em danos e na redução do sistema radicular, podendo conduzir à deficiência mineral e estresse hídrico. O decrescimento da parte aérea ocorre num momento posterior e parece ser uma consequência dos danos que acontecem na raiz.

Apesar dos grandes avanços na transformação genética de café, ela, ainda, é trabalhosa, com muitas dificuldades em sua metodologia, estando longe de ser uma prática rotineira nos laboratórios. Uma transformação bem sucedida, desde a inoculação do explante até a obtenção de uma planta transgênica cultivada em casa de vegetação, leva em torno de 12 a 20 meses.

Diante dessa realidade, os estudos de expressão gênica, antes da obtenção de uma planta totalmente transformada, tornam-se essenciais. *Agrobacterium rhizogenes* é, sem dúvida, uma ferramenta de alto potencial para a realização de posteriores análises de expressão e regulação gênica. Uma vez que a aquisição de plantas transgênicas por esse método é consideravelmente mais rápida quando comparada com *Agrobacterium tumefaciens* e pelos métodos diretos de transformação, possibilitam análises funcionais em condições não axênicas. As pesquisas embasadas no melhoramento do café podem ser beneficiadas com essa técnica rápida de transformação como uma ferramenta de pesquisa, enquanto um sistema de transformação estável, de curto prazo e reprodutível é desenvolvido na cultura cafeeira. Considerando isso, as

análises de comportamento e de expressão de genes, que conferem tolerância ao alumínio em organismos geneticamente modificados, tornam-se uma etapa fundamental para posteriores transformações gênicas.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, E. V. S. et al. Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Palo Alto, n. 45, p. 532-539, Sept. 2009.

ALONSO-SALCES, R. M. et al. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, Easton, v. 57, n. 10, p. 4224-4235, May 2009.

ALPIZAR, E. et al. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. ***Plant Cell Reports***, Berlin, v. 25, p. 959-967, Apr. 2006.

ANTHONY, F. et al. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. ***Theoretical Applied Genetics***, Berlin, v. 104, n. 5, p. 959-967, Apr. 2002.

ARAGÃO, F. J. L. et al. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. ***Theoretical and Applied Genetics***, Berlin, v. 93, n. 1/2, p. 142-150, 1996.

ARROYO-HERRERA, A. et al. Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, Dordrecht, v. 94, n. 2, p. 171-180, June 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Café: história.**

Disponível em:

<<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>>. Acesso em: 10 maio 2013.

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Nutrient use efficiency in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, n. 7, p. 921-950, June 2001.

BARBOSA, A. et al. Alpha-Amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits alpha-amylases from the coffee berry borer pest. **BMC Biotechnology**, London, v. 10, n. 44, p. 1-8, June 2010.

BARRETO, H. G. et al. In silico and quantitative analyses of the putative FLCLike homologue in coffee (*Coffea arabica* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 30, n. 1, p. 29-35, Feb. 2011.

BOLSA DE MERCADORIAS & FUTUROS. **A nova bolsa**. São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.bmf.com.br>>. Acesso em: 6 dez. 2010.

BOSSELUT, N. et al. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of prunus as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 7, p. 1313-1326, July 2011.

BOXTEL, J. van et al. Transient expression of B-glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissue. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 12, p. 748-752, Oct. 1995.

BRACCINI, M. C. L. et al. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva: I., crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular (L.). **Revista Brasileira Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 22, n. 1, p. 435-442, jan. 1998.

BRACCINI, M. D. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; BRACCINI, A. D. L. E. Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução. **Bragantia**, Campinas, v. 59, n. 2, p. 221-226, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Informe estatístico do café**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/paginainicial/vegetal/estatisticas>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

BROWN, M. H.; PAULSEN, I. T.; SKURRAY, R. A. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 31, n. 1, p. 393-395, Jan. 1999.

CAMBRAIA, J.; CAMBRAIA, M. C. Avaliação de híbridos de milho quanto à tolerância ao alumínio, em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 42, n. 241, p. 297-307, jan. 1995.

CANCHE-MOO, R. L. R. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, n. 3, p. 373-377, Sept. 2006.

CARVALHO, C. H. S. et al. Cultivares de café arábica de porte baixo. In: _____. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: EMBRAPA Café, 2008. p. 157-226.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **1ª estimativa**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.abic.com.br/estat_pagricola.html>. Acesso em: 30 maio 2013.

CUNHA, W. G. et al. Obtenção de plantas de *Coffea arabica* geneticamente modificadas por bombardeamento de calos embriogênicos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, n. 73, p. 15, out. 2004.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, July 2006.

DEGENHARDT, J. et al. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 117, n. 1, p. 19-27, May 1998.

ECHART, C. L.; MOLINA, S. C. Aluminum phytotoxicity: effects, tolerance mechanisms and its genetic control. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 531-541, maio/jun. 2001.

ESWARAN, H.; REICH, P.; BEINROTH, F. Global distribution of soils with acidity. In: MONIZ, A. C. et al. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH**. São Paulo: Brazilian Soil Science Society, 1997. p. 159-164.

FAGERIA, N. K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas**. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1989. 392 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Final 2011 data and preliminary 2012 data for 5 major commodity aggregates now available**. Rome, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

FOY, C. D. General principles involved in screening plants for aluminum and manganese tolerance. In: WRIGHT, M. (Ed.). **Plant adaptation to mineral stress in problem soils**. New York: Cornell University, 1976. p. 65-72.

GAUDIN, V.; VRAIN, T.; JOUANIN, L. Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 32, n. 1, p. 11-29, Feb. 1994.

GREEN, L. S.; ROGERS, E. E. FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 136, n. 1, p. 2523-2531, Sept. 2004.

HATANAKA, T. et al. Transgenic plants of *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 2, p. 106-110, Dec. 1999.

HE, G. et al. An H²: coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 1, p. 262-265, 2004.

HENRY, T. L. A.; ALTOSAAR, M. R. I.; PHILIPPE, R. F. D. D. R. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 4, p. 382-389, Mar. 2000.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, n. 173, p. 173-195, Feb. 2001.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

HVORUP, R. N. et al. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, n. 5, p. 799-813, Sept. 2003.

INÁCIO, L.; RODRIGUES, R.; CAMPANHOLA, C. Metodologia para obtenção de plantas transformadas de *Coffea canephora* por co-cultivo de calos embriogênicos com *Agrobacterium tumefaciens*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, n. 58, p. 15, mar. 2004.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, June 1995.

KUMAR, V. et al. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairyroot phenotype. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 214-222, Mar. 2006.

LEROY, T.; DUFOUR, M. *Coffea* spp. genetic transformation. In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of the world: essential protocols**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 159-170.

LEROY, T. et al. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 4, p. 382-389, Mar. 2000.

LIMA, A. A. et al. In silico characterization of putative members of the coffee (*Coffea arabica*) ethylene signaling pathway. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 1277-1289, June 2011.

MAGALHÃES, J. V. et al. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and others species in the poaceae. **Genetics**, Austin, v. 167, n. 4, p. 1905-1914, Aug. 2004.

_____. Gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Sept. 2007.

MAGALHÃES, J. V.; GUIMARÃES, C. T. **Tolerância ao alumínio em sorgo**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2008. 4 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic, 2003. 889 p.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceas genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, n. 1/2, p. 11-24, May 2006.

MENDES, C. M. Sintomas de deficiências minerais no cafeeiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DO SOLO, 2., 1949, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 1949. 1 CD-ROM.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of coffee. **Biotechnology Research International**, Cairo, v. 2012, p. 1-17, June 2012.

MISHRA, M. K.; SREENATH, H. L. High-efficiency Agrobacterium: mediated transformation of coffee (*Coffea canephora* Pierre ex. Frohner) using hypocotyls explants. In: INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION COLLOQUIUM, 9., 2004, Bangalore. **Proceedings...** Bangalore: ASIC, 2004. p. 792-796.

MISTRO, J. C.; FAZUOLI, L. C.; GALLO, P. B. Comportamento de cultivares de café arábica em solos ácidos e corrigidos. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 37-38, 2007.

MONDEGO, J. M. C. et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 8, p. 11-30, Feb. 2011.

MORITA, Y. et al. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 42, n. 7, p. 1778-1782, July 1998.

NILSSON, O.; OLSSON, O. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 3, p. 463-473, July 1997.

OCAMPO, C. A.; MANZANERA, L. M. Advances in genetic manipulation of the coffee plant. In: INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION COLLOQUIUM, 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco: ASIC, 1991. 1 CD-ROM.

OGITA, S. et al. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 54, n. 6, p. 931-941, 2004.

OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, A. A. **CaféPoint**. Disponível em: <<http://www.cafepoint.com.br/radares-tecnicos/variedades-de-cafe/cultivares-de-cafe-arabica-desenvolvidas-pela-epamig-47444n.aspx>>. Acesso em: 10 maio 2013.

PAVAN, M. A.; BINGHAM, F. T. Toxidez de alumínio em cafeeiros cultivados em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 9, p. 1293-1302, set. 1982.

PÔSSA, K. F. **Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene sbmate, que confere tolerância ao alumínio em sorgo**. 2010. 108 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RAMAN, H. et al. Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminiumtolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 5, p. 781-791, Oct. 2005.

RENGEL, Z. Uptake of aluminum by plant cells. **New Phytologist**, Oxford, v. 134, n. 3, p. 389-406, Nov. 1996.

RIBAS, A. F. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 49, n. 4, p. 493-497, Dec. 2005a.

_____. Transformação de *Coffea arabica* com o gene da ACCoxidase em orientação antisense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: USP, 2005b. 1 CD-ROM.

RIBAS, A. F.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 83-94, Mar. 2006.

RICHARDSON, A. E. et al. Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: TURNER, B. L.; FROSSARD, E.; BALDWIN, D. S. (Ed.). **Organic phosphorus in the environment**. Wallingford: CABI, 2005. p. 165-184.

ROSILLO, A. G. et al. Optimised DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 1, p. 45-49, July 2003.

SANTOS, J. D. et al. Development of a vinasse nutritive solution for hydroponics. **Journal of Environmental Management**, New York, v. 114, p. 8-12, Jan. 2013.

SASAKI, T. et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 645-653, Mar. 2004.

SERA, T. Coffee genetic breeding at IAPAR. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 2, p. 179-199, 2001.

SILVA, M. C. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 119-147, Jan./Mar. 2006.

SPIRAL, J. et al. **Obtention de plantules de Coffea canephora Pierre (robusta) transformées par Agrobacterium rhizogenes**. Paris: Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 1993. 6 p.

SPIRAL, J.; PETIARD, V. Protoplast culture and regeneration in coffee species. In: INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION COLLOQUIUM, 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco: ASIC, 1991. p. 383-391.

STEIN, V. C. **Biotechnological approaches to improve drought tolerance of Coffea arabica**. 2009. 97 p. Thesis (Doctor in Vegetal Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

TAYLOR, G. J. The physiology of aluminum tolerance in higher plants. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 19, n. 7/12, p. 1179-1194, Nov. 1988.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, n. 3, p. 423-447, Mar. 2003.

VIDAL, R. O. et al. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in coffee species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 154, n. 3, p. 1053-1066, Nov. 2010.

VIEIRA, L. G. E. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.

WANG, Q. et al. Simultaneous overexpression of citrate synthase and phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves augments citrate exclusion and Al resistance in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 30, n. 4, p. 992-1005, Jan. 2012.

ZHANG, X. et al. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. **Botanical Studies**, Minneapolis, v. 48, n. 4, p. 435-444, Oct. 2007.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 *Transformação de Coffea arabica via Agrobacterium rhizogenes com o gene SbMATE*

Artigo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

O café é uma das mais importantes commodities mundiais, movimentando, aproximadamente, 80 bilhões de dólares ao ano. Apesar do grande volume produzido, a produção cafeeira do país não tem acompanhado a crescente demanda de consumo mundial. Por isso, pesquisas no campo da biotecnologia aplicada ao cafeeiro, com auxílio das técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro*, prospecção gênica e transformação genética, têm-se revelado importantes ferramentas de apoio aos programas de melhoramento. Vários são os problemas que devem ser solucionados para aumentar a produtividade, entre eles, o estresse causado à planta quando essas são cultivadas em solos ácidos. Nestas condições, o solo contém uma grande quantidade de alumínio, que é tóxico para planta, resultando num sistema radicular deficiente e com menor eficiência para absorção de nutrientes e água. A transformação genética de plantas com o objetivo de proporcionar tolerância ao alumínio é um excelente caminho para aumentar o desempenho de plantas economicamente importantes cultivadas em solos ácidos ricos nesse metal. Este trabalho foi realizado com a finalidade de adquirir plantas com raízes transformadas de *Coffea arabica*, contendo o gene *SbMATE*, bem como verificar se o promotor ubiquitina possui expressão em *Coffea*. Sementes de *Coffea arabica* L. da cultivar Catiguá germinadas em meio GER com 30 dias de idade foram submetidas à transformação com duas cepas (MSU e A4) de *Agrobacterium rhizogenes*. Explantes da cultivar Bourbon Amarelo, obtidos por meio de calos embriogênicos, também, foram submetidos à transformação com a cepa MSU. As plântulas da cultivar Catiguá transformadas com a cepa MSU tiveram 32% de eficiência de transformação, enquanto que essa taxa baixou para 16% nos explantes transformados com a cepa A4. A cultivar Bourbon, apesar da alta taxa de mortalidade e baixa taxa de enraizamento, obteve uma eficiência de transformação de 75%, porém essa alta taxa pode estar diretamente relacionada ao pequeno número de plantas analisadas. Por meio dos resultados obtidos, pode-se observar que a cepa MSU é mais virulenta na cultivar Catiguá quando comparada com a cepa A4 e que é possível transformar explantes vindos de embriogênese somática pelo método de corte usando *A. rhizogenes*.

Palavras-chave: *SbMATE*. *Agrobacterium rhizogenes*. Transformação Genética de *Coffea*.

ABSTRACT

Coffee is one of the most important commodities worldwide, moving approximately 80 billion dollars per year. Despite the large volume produced, the country's coffee production has not matched the growing consumer demand worldwide. Therefore, research in the field of biotechnology applied to the coffee tree, using the techniques of plant tissue culture in vitro, gene prospecting and genetic transformation, has proved as important support tool to improvement programs. There are several problems that must be solved to increase productivity, amongst them, the stress to the plant when these are grown in acid soils. Under these circumstances, the soil contains a large amount of aluminum which is toxic to the plant, resulting in a deficient root system and low efficiency in the use of nutrients and water. Genetic transformation of plants with the aim of tolerance to aluminum is an excellent way to increase the performance of economically important crops grown in acid soils rich with this metal. This work was carried out with the purpose of acquiring transformed roots of *Coffea arabica* containing the gene *SbMATE*, as well as to check if the ubiquitin originator has expression in *Coffea*. Seeds of *Coffea arabica* L. of cultivar Catiguá sprouted among GER with 30 days of age were subjected to transformation with two strains (MSU and A4) of *Agrobacterium rhizogenes*. Explants of cultivar Bourbon Amarelo obtained through embryogenic callus were also submitted to transformation with the MSU strain. The seedlings of cultivar Catiguá transformed with strain MSU had a 32% transformation efficiency, whereas this rate decreased to 16% in explants transformed with strain A4. The cultivar Bourbon, despite the high mortality rate and low rate of rooting, obtained a conversion efficiency of 75%, but this high rate can be directly related to the small number of plants analyzed. By the results obtained it can be seen that the strain MSU is most virulent with cultivar Catiguá when compared with the strain A4 and that is possible to transform explants coming from somatic embryogenesis through the cutting method A. *rhizogenes*.

Keywords: *SbMATE*. *Agrobacterium rhizogenes*. *Coffea* genetic transformation.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das mais importantes commodities mundiais, movimentando, aproximadamente, 80 bilhões de dólares ao ano. A cafeicultura, atividade de elevada importância no cenário do agronegócio brasileiro torna o Brasil o maior produtor e o segundo consumidor global. No cenário nacional, os maiores estados produtores desse grão são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná, Rondônia e Rio de Janeiro, que correspondem a 98% da produção brasileira. A produção total do país na safra 2012 fechou em 50,83 milhões de sacas beneficiadas, o que representou um acréscimo de cerca de 10% em relação à safra anterior (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013).

Apesar do grande volume produzido, a produção cafeeira do país não tem acompanhado a crescente demanda de consumo mundial. Por isso, pesquisas no campo da biotecnologia aplicada ao cafeeiro, com auxílio das técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro*, prospecção gênica e transformação genética, têm-se revelado importante ferramenta de apoio aos programas de melhoramento, possibilitando o desenvolvimento de variedades mais produtivas e, ao mesmo tempo, com boas características organolépticas (aroma, sabor e cor) e resistentes aos vários estresses bióticos e tolerantes aos abióticos (CARNEIRO, 1997; ETIENNE et al., 2002; MISHRA; SLATER, 2012; RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006; SANTOS-BRIONES; HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, 2006).

Vários são os problemas que devem ser solucionados para aumentar a produtividade, entre eles, o estresse causado à planta quando essas são cultivadas em solos ácidos, prática muito comum nas regiões que abrangem o cerrado em Minas Gerais e outros estados. Nestas condições, o solo contém uma grande quantidade de alumínio, que é tóxico para planta, resultando num sistema radicular deficiente e com menor eficiência no uso de nutrientes e água.

O Al^{3+} é a principal toxina encontrada pelas plantas em solos ácidos. Esse cátion inibe o crescimento radicular por causar danos às células do ápice da raiz (TAYLOR, 1991). É observado que várias espécies possuem mecanismos de tolerância à toxicidade causada por esse metal, podendo esses ser internos ou externos (KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004). Os mecanismos internos estão relacionados com o acúmulo do alumínio, dentro de organelas celulares, com formação de complexos não tóxicos, com a reparação rápida de quaisquer lesões sofridas, principalmente as relacionadas com estresses oxidativos, com acúmulo desse cátion nas folhas (MA et al., 2001), entre outros (METALI et al., 2011). Por outro lado os mecanismos externos limitam a absorção do Al^{3+} às raízes, minimizando interações prejudiciais com sítios sensíveis do apoplasto. Um mecanismo que possui um importante papel na detoxificação do Al externo à célula é a ativação de transportadores de membrana que liberam ácidos orgânicos pelo ápice radicular de genótipos tolerantes (KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004; MA et al., 2001; RYAN, 2001). Esses ácidos orgânicos, dentre os quais se destacam o citrato e o malato, formam complexos estáveis com o Al^{3+} presente na rizosfera, reduzindo ou mesmo anulando seus efeitos

tóxicos, uma vez que tais complexos são incapazes de atravessar a membrana plasmática (KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004). Assim, elevados níveis de exsudação de ácidos orgânicos ativados pela presença do Al têm sido correlacionados, positivamente, com a tolerância a esse cátion (MAGALHÃES et al., 2007; SASAKI et al., 2004).

Nos últimos anos houve grande avanço em relação a descobertas de genes relacionados com a tolerância ao alumínio em plantas, um desses genes é o *SbMATE* extraído de *Sorghum bicolor* que confere tolerância ao alumínio por meio da liberação de citrato (MAGALHÃES et al., 2004). Esse gene codifica um membro da família MATE (*Multidrug and Toxin Compound Extrusion Family*), um transportador de membrana, responsável pelo efluxo de citrato induzido pelo tratamento com Al, com aumento dos níveis de expressão ao longo do tempo de exposição ao Al na linhagem tolerante (MAGALHÃES et al., 2007).

A transformação genética, com o objetivo de obter plantas tolerantes ao alumínio, é um excelente caminho para aumentar o desempenho de plantas economicamente importantes cultivadas em solos ácidos ricos nesse metal (ECHART; MOLINA, 2001). Esse problema afeta grande parte dos solos arados, não só na América Latina, mas também em outras partes do mundo.

Estudos têm mostrado que o sintoma da toxicidade do Al visível mais rapidamente em plantas é a inibição do crescimento da raiz. O que resulta em danos e na redução do sistema radicular, podendo conduzir à deficiência mineral e estresse hídrico (DEGENHARDT et al., 1998). O decrescimento da parte aérea ocorre num momento posterior (KOCHIAN, 1995; RYAN; KOCHIAN, 1993) e pode ser uma consequência dos danos

que acontecem na raiz (MATSUMOTO et al., 1976). Dado isso análises de comportamento e expressão de genes que conferem tolerância ao alumínio em organismos geneticamente modificados se torna uma etapa fundamental para posteriores transformações gênicas.

Objetivou-se neste trabalho obter plantas de *Coffea arabica* geneticamente modificadas com o gene *SbMATE* via *Agrobacterium rhizogenes*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) MG.

2.1 Material Vegetal

Sementes de *Coffea arabica* L. da cultivar Catiguá foram expostas à água corrente por, aproximadamente, 1 hora para a remoção do pergaminho. Em seguida foram imersas em solução de formaldeído 1,6% por 30 minutos e, superficialmente, lavadas com água destilada autoclavada. Após o processo de lavagem foram mantidas em solução estéril de Ácido Bórico 0,5% por 72 horas e sob agitação. Os embriões foram excisados das sementes em condições assépticas e inoculados em meio GER (ETHIENE, 2005), que consiste em sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitaminas específicas para o café (10 mg.L⁻¹ de tiamina, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ de piridoxina, 2 mg.L⁻¹ de glicina), 40 g.L⁻¹ de sacarose, 10 mg.L⁻¹ de cisteína e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma Chemical Co., EUA). Eles foram mantidos na ausência de luz a 22°C em um fotoperíodo de 16 horas, durante 10 dias e transferidos para o claro nas mesmas condições durante 20 dias.

Os explantes da cultivar Bourbon Amarelo foram obtidos, por meio do protocolo de embriogênese somática desenvolvido por Teixeira et al. (2004).

2.2 Transformação de raízes de café por *Agrobacterium rhizogenes*

2.2.1 Plasmídeo

Para a transformação dos explantes, foi utilizado um plasmídeo, contendo o gene *SbMATE* sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina de milho e o terminador *NOS* (*Ubi::: SbMATE ::NOS*) (Figura, 1).

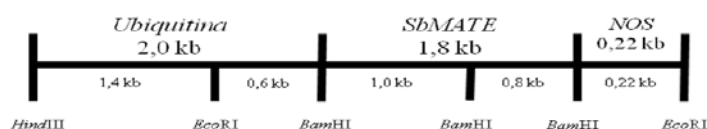


Figura 1 Vetor binário *pCAMBIA* 3301 contendo a inserção do promotor e terminador *Ubi :: NOS*, utilizado para transformação via *Agrobacterium rhizogenes*. O cassette contém em sua construção o gene de seleção fosfinothricin acetil transferase (*bar*) sob o controle do promotor e terminador 35S.

O promotor Ubiquitina e o terminador NOS foram extraídos do plasmídeo *pAHC17* (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996) e transferidos para o plasmídeo *pCAMBIA* 3301 após uma digestão total com a enzima *HindIII* (Invitrogen) e parcial com a enzima *EcoRI* (Invitrogen). O gene *SbMATE* foi obtido por transcrição reversa do mRNA das linhagens de sorgo SC283 com oligo dT e PCR utilizando os primers ($5'$ AGA GGA TCC ATG GAG GAA CACC $3'$) e ($5'$ GAC GGA TCC TCA CTG CCG AAG $3'$) contendo nas extremidades sítios para a enzima *BamHI*

(sublinhado). Após a amplificação, o fragmento gerado foi clonado no vetor TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA). Posteriormente o fragmento foi digerido parcialmente com *Bam*HI e subclonado no vetor *pCAMBIA* 3301, o qual já continha o promotor da Ubiquitina e terminador *NOS*. O plasmídeo *pCAMBIA* 3301 possui em sua estrutura o gene de seleção *bar*, que codifica para a proteína fosfotricina acetiltransferase, sob o controle do promotor constitutivo viral CaMV35S.

Esse vetor foi inserido via eletroporação (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) em *A. rhizogenes* (cepas A4 e MSU).

Para tal foi adicionado 1µL (100 ng/µL) do plasmídeo *Ubi-SbMATE-bar-NOS* a 100 µL de células competentes de *A. rhizogenes*. Essa mistura ficou incubada por 1 minuto em gelo e, posteriormente, transferido para uma cubeta de eletroporação resfriada a qual foi acoplada ao Eletroporador (2510 Eppendorf). As células bacterianas foram submetidas a um pulso de 2500 V por 5 segundos e transferidas para um tubo Eppendorf, contendo 0,5 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) líquido onde permaneceram incubadas por 1 h a 28 °C. Após a incubação, 100 µL da cultura foram plaqueados em placa de Petri contendo 30 mL de meio de cultura LB sólido suplementado com 50mg.L⁻¹ de Canamicina. As culturas foram mantidas a 28 °C, durante 48 h, para o crescimento das colônias bacterianas transformadas.

As colônias que cresceram foram selecionadas para o processo de extração de DNA plasmidial (miniprep), onde a cultura bacteriana foi incubada overnight em meio LB líquido suplementado com canamicina 50mg.L⁻¹. O conteúdo de cada tubo foi transferido para microtubos e submetido à centrifugação por 3 minutos a 16.000 g para sedimentação

das células bacterianas. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 200 µL de solução P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; RNase 100 µg/mL) e homogeneizado em vortex. Para a lise celular, 200 µL de solução P2 (SDS 1%, NaOH 200 mM) foi adicionada. A precipitação foi realizada com a adição de 200 µL de solução P3 (Acetato de Potássio 3M pH 5,5 com ácido acético glacial). Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação, a 16.000 g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante, contendo o DNA plasmidial, foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 420 µL de isopropanol. O volume dos tubos foi homogeneizado e centrifugado a 16.000 g, por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante foram adicionados 200 µL de etanol 75% para lavagem do pellet. O pellet passou novamente por uma centrifugação a 16.000 g por 5 minutos e foi seco em centrífuga a vácuo (Eppendorf Concentrator 5301). Após secagem completa, foi ressuspenso em 30 µL de água Milli-Q. Com o DNA plasmidial resultante, foi realizada a confirmação da inserção do plasmídeo na agrobactéria usando enzima de restrição. A enzima utilizada foi a BamHI, gerando 3 fragmentos (12kb, 1kb e 0,8kb). A confirmação da presença do gene SbMATE no DNA plasmidial, também, foi realizada por análise de PCR utilizando 1 Unidade de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega®), 3 µL de tampão 5X, 0,6 mMol.L-1 dNTP mix, 1,75 mM de MgCl, 0,5 ng de cada primer e 10 ng.µL-1 de DNA.

O par de primers utilizado para amplificação do gene SbMATE foi JL57F (5'GTGCTGGATCCGATCCTGAT3') e JL58R (5'CACTGCCGAAGAACTTCCA3') amplificando em um fragmento de

788pb. Para a detecção do gene bar o par de primers BARF ($5'$ AGAAACCACCTCATCCC $3'$) e BARR ($5'$ TGCACCATCGTCAACCAC $3'$) foram utilizados e amplificaram um fragmento de 407pb.

A reação foi submetida ao termociclador Eppendorf Mastercycler, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 segundos, seguidos de 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 62,5 °C, por 30 segundos; 72 °C, por 2 minutos. Após os 30 ciclos as amostras foram submetidas a uma etapa final de 3 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados e digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (m.v⁻¹) corados com 2 µL de Brometo de Etídio (0,5 µg.mL⁻¹), sob corrente elétrica de 110 V em Tampão TAE (0,001 M EDTA pH 8,0; 0,04 M TRIS pH 8,0; 0,02 M ácido acético), por um período de, aproximadamente, 90 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®).

Confirmada a inserção, uma colônia foi inoculada em meio de cultura LB líquido acrescido de canamicina 50mg.L⁻¹. Essas células bacterianas foram mantidas sob agitação de 200 rpm, durante 48 h, à temperatura de 28°C. Após seu crescimento, as células foram estocadas em glicerol 60% na proporção de 1:1 e armazenadas em freezer -80 °C.

O processo de crescimento da bactéria para transformação dos explantes foi realizado a partir de uma colônia de *A. rhizogenes* inoculada em meio de cultura LB líquido suplementado de 50 mg.L⁻¹ de Canamicina

e 100 μ M de acetosseringona. A cultura foi mantida sob agitação de 200 rpm, durante 48 h, à temperatura de 28°C. A partir desse inóculo, 1 ml foi plaqueado em meio LB sólido, mantido nas mesmas condições e contendo as mesmas concentrações de canamicina e acetosseringona. Essas placas foram utilizadas para a transformação.

2.2.2 Transformação dos explantes

Os experimentos de transformação para a cultivar Catiguá foram compostos de dois tratamentos, sendo esses a avaliação da eficiência de transformação das duas cepas (A4 e MSU). Cento e oitenta explantes, com idade de 30 dias e apresentando o mesmo estágio de desenvolvimento tiveram sua base cortada, utilizando bisturi infectado com *A. rhizogenes*, contendo o plasmídeo *pCAMBIA 3301* (Ubi-SbMATE-bar-NOS). As plantas controle foram cortadas com bisturi estéril.

A avaliação da eficiência de transformação da cepa MSU na cultivar Bourbon Amarelo, também, foi verificada. Foram utilizados 115 explantes regenerados a partir de calos embriogênicos. O procedimento de transformação foi o mesmo realizado para a cultivar Catiguá.

Os possíveis transformantes foram mantidos em cocultivo, durante 14 dias, a 17 °C no escuro em meio GER sólido, contendo 100 μ M de acetosseringona. Após o período de cocultivo os explants foram submetidos a uma lavagem com meio GER líquido contendo Timentin (500 mg.L⁻¹) por, aproximadamente, 1 hora sob agitação de 150 rpm.

Depois foram transferidos para meio GER sólido acrescido de 0.5 μM de ácido indol butírico (IBA), contendo Timentin (500 mg.L^{-1}) e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 26 ± 2 °C até o surgimento das primeiras raízes, conforme protocolo estabelecido por Alpizar et al. (2006). Após esse período, as primeiras raízes que surgiram foram excisadas e os explantes foram transferidos para meio GER com metade da concentração de sacarose, acrescido de IBA e Timentin de acordo com o protocolo estabelecido por Alpizar (2008).

2.3 Análise via PCR para detecção do gene *SbMATE*

A presença do gene *SbMATE* foi verificada via PCR a partir do DNA de raízes submetidas ao processo de transformação. O DNA foi extraído, usando o protocolo de extração CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide). Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubo Eppendorf de 2 mL, contendo 1 mL de tampão de extração (2% p/v de CTAB; 2,5% p/v de PVP-40; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) pré-aquecido a 65 °C. Foram adicionados a esse volume 2% v/v de β -mercaptoetanol, essa solução foi incubada por 40 minutos a 65 °C e centrifugada (11.000 rpm) por 10 minutos.

O volume de 600 μL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo, contendo a mesma quantidade de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v/v). Foi realizada a homogeneização e centrifugação

(11.000 rpm) por 10 minutos. A fase aquosa (aproximadamente 400 μ L) foi transferida para um tubo novo, contendo 4 μ L de Rnase A (100 μ g/mL), a solução ficou incubada a 37 °C por 30 minutos. Para a precipitação do DNA foram adicionados 400 μ L de álcool isopropílico gelado, esse material foi centrifugado durante 20 minutos (11.000 rpm).

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pellet lavado em 200 μ L de etanol 70% e ressuspendido em 30 μ L de água Milli-Q autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20° C.

A confirmação da presença do gene *SbMATE* foi realizada por análise de PCR, utilizando 1 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega®), 3 μ L de tampão 5 X, 0,6 mMol.L-1 dNTP mix, 1,75 mM de MgCl, 0,5 ng de cada *primer* 5' GTGCTGGATCCGATCCTGAT 3', 5' CACTGCCGAAGAACTTCCA 3' e 10 ng/ μ L de DNA, completando o volume final com água Milli-Q autoclavada para 15 μ L.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf® Mastercycler*, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 segundos, 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 62,5 °C, por 30 segundos e 72 °C, por 2 minutos, com uma extensão final de 2 minutos a 72 °C.

Os produtos dessas reações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando tampão TAE (90mM de Tris-Acetato e 1mM de EDTA, pH 8), os géis foram tratados com brometo de etídio (1 μ L/mL) e visualizados em fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®).

2.4 Avaliação da eficiência de transformação

A eficiência de transformação foi calculada pela proporção (p) de plantas transformadas ($p = x/n$), em que 'x' corresponde ao número de plantas transformadas confirmadas por PCR e 'n' o número de plantas que sobreviveram ao período de cocultivo (RIBAS et al., 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A construção gênica, contendo o gene de interesse *SbMATE* (*Ubi-SbMATE-bar-NOS*), foi integrada via eletroporação nas estirpes de *Agrobacterium rhizogenes* com sucesso. Essa integração foi comprovada, por meio da técnica de PCR utilizando primers específicos para o gene *bar* e *SbMATE* e por meio de digestão com a enzima de restrição *BAM* *HI*.

Foi observado o surgimento das primeiras raízes quatro semanas após a infecção com a agrobactéria contendo o plasmídeo *Ubi-SbMATE-bar-NOS*. Houve uma pequena variação de tempo no surgimento delas entre as cepas A4 e MSU e entre os genótipos Catiguá e Bourbon. Os explantes infectados com a cepa A4 começaram a surgir raízes mais cedo do que os transformados com a cepa MSU e a variedade Bourbon teve um desenvolvimento radicular tardio quando comparado com a cultivar Catiguá MG2.

Trabalhos anteriores demonstraram que as primeiras raízes de hipocótilos infectados de *Coffea arabica* geralmente não são transformadas, sendo necessária a retirada dessas para o surgimento de raízes transformadas (STEIN, 2009). Análises de PCR das primeiras raízes dos explantes infectados (dados não mostrados) no presente trabalho foram realizadas e corroboraram com resultados de trabalhos anteriores, confirmando a necessidade da retirada das raízes não transgênicas para o surgimento de raízes transgênicas.

Todas as raízes apresentaram um geotropismo normal e não foi observado nenhum distúrbio morfológico, assemelhando-se às raízes não

transformadas usadas como controle negativo. Os diâmetros das raízes controles e das transformadas foram relativamente os mesmos e a ramificação de ambas era extremamente similar. Esse mesmo resultado foi relatado por pesquisadores franceses, que realizaram análises histológicas para confirmar a semelhança de organização dos tecidos de raízes transformadas e não transformadas das cultivares IAPAR e Caturra (ALPIZAR et al., 2006). Em estudos de transformação genética com a cultivar Catuaí, também, foram observadas semelhanças quanto à morfologia entre raízes de café submetidas à transformação genética com *A. rhizogenes* MSU440 e raízes não transformadas (STEIN, 2009).

Aproximadamente 180 dias após a infecção com a agrobactéria foi avaliada a taxa de sobrevivência e de enraizamento dos explantes. Dos 180 explantes da cultivar Catiguá MG2 (CG), infectados com a cepa MSU440, 45% sobreviveram e destes 70% desenvolveram raízes e 30% não apresentaram enraizamento. Os explantes transformados com a cepa A4 apresentaram uma alta mortalidade após o cocultivo em razão do crescimento da agrobactéria. Das 180 plantas infectadas, apenas 22% sobreviveram, das sobreviventes 35% não desenvolveram raízes e 65% apresentaram raízes. Na cultivar Bourbon Amarelo, das 115 plantas infectadas, 67% sobreviveram ao cocultivo, mas somente 5% dessas enraizaram (Tabela 1).

Um dos problemas mais observados com qualquer transferência de genes mediada por *Agrobacterium* é o excesso de crescimento desta nos explantes transformados, o que provoca danos irreversíveis no tecido vegetal. Pesquisadores indianos, também, obtiveram problemas com alta proliferação da cepa A4 em embriões de *Coffea canephora*, mas

conseguiram minimizar a taxa de contaminação com a associação de cefatoxina e clavulanato de potássio (KUMAR et al., 2005).

As plântulas da cultivar Catiguá transformadas com a cepa MSU440 tiveram 32% de eficiência de transformação, enquanto que essa taxa baixou para 16% nos explantes transformados com a cepa A4. A cultivar Bourbon, apesar da alta taxa de mortalidade e baixa taxa de enraizamento, obteve uma eficiência de transformação de 75%, essa alta taxa pode demonstrar que o surgimento das raízes realmente foi induzido pela *Agrobacterium rhizogenes* uma vez que nenhum controle negativo enraizou e somente uma planta enraizada não apresentava raízes transformadas.

Tabela 1 Resposta das duas cepas utilizadas para a transformação e das 2 cultivares de *Coffea* infectadas por *A. rhizogenes* com o plasmídeo *Ubi-SbMATE-bar-NOS*

	Sobrevivência após o cocultivo	% de plantas enraizadas	% de plantas transformadas
CG/MSU	45%	70%	32%
CG/A4	22%	65%	16%
BB/MSU	67%	5%	75%

Eficiência de transformação das cepas A4 e MSU440, porcentagem de sobrevivência após o cocultivo, plantas enraizadas e transformadas das cultivares Catiguá MG2 (CG) e Bourbon Amarelo (BB).

Em *Coffea*, a frequência de transformação é consideravelmente inferior quando comparada aos sistemas de transformação de outras espécies (LEROY et al., 1997).

O resultado acima exposto foi visualizado, por meio da análise de PCR, com a amplificação de um fragmento de 788pb correspondente ao tamanho esperado para o gene *SbMATE* (Figura, 2).

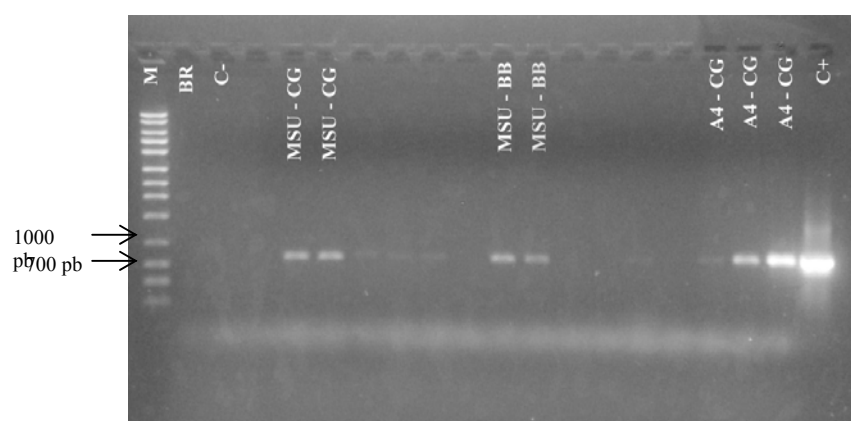


Figura 2 Gel representativo da PCR do DNA isolado de raízes de café das cultivares Bourbon e Catiguá transformadas com as cepas MSU440 e A4 contendo a construção gênica *Ubi-SbMATE-bar-NOS*. Br = controle da reação. CG = Catiguá. BB = Bourbon. C+ = plasmídeo. C- = planta não transformada.

Apesar dos avanços significativos feitos nos últimos 15 anos, a transformação de café, ainda, é demorada e trabalhosa. Além disso, um protocolo de transformação de genótipo independente, ainda, não foi atingido em café (MISHRA; SLATER, 2012). Isso explica a variabilidade da eficiência de transformação entre diferentes cepas na mesma cultivar. Alpizar et al. (2006) testaram a eficiência de infecção de cinco cepas de

A. rhizogenes e observou uma alta variação de transformação entre elas, sendo essa de 0% (8196) de infecção até 80% (A4RS).

Nota-se que na transformação genética via *A. rhizogenes* as plantas podem apresentar modificações morfológicas como: entrenós curtos, geotropismo alterado, raízes em cabeleira, entre outros. No presente estudo, a partir da análise visual das plantas transformadas, não foi observada nenhuma das modificações descritas acima. Esse resultado é semelhante aos três trabalhos mais recentes que transformaram café utilizando *A. rhizogenes* (ALPIZAR et al., 2006; KUMAR et al., 2005; STEIN, 2009). No primeiro, a espécie *Coffea canephora* foi transformada pela técnica de sonicação, utilizando a cepa A4 e foi alcançada uma eficiência de 3% de transformação (KUMAR et al., 2005), o segundo trabalho demonstrou uma eficiência de, aproximadamente, 40% na transformação de duas cultivares de *Coffea arabica* (Caturra e IAPAR-59) com a cepa A4RS (ALPIZAR et al., 2006) e o último consistiu na transformação da cultivar Catuaí Vermelho (*Coffea arabica*) com a cepa MSU obtendo 32% de eficiência (STEIN, 2009).

Nos últimos trabalhos desenvolvidos usando transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes* os principais objetivos observados foram análises de expressão gênica (HU, 2013), elucidação de vias Biossintéticas (THWE et al., 2013), produção de proteínas recombinantes (PHAM; SCHAFER; WINK, 2012), melhoramento vegetal (KAJIKAWA et al., 2012), produção de fitoquímicos (ZHAO et al., 2013) e processo de fitorremediação (GONZALEZ et al., 2013).

Em café, os objetivos dos trabalhos usando *Agrobacterium rhizogenes* estão voltados para análises de expressão de genes de interesse

agronômico. Neste trabalho foi realizada a aquisição de raízes transformadas de *Coffea arabica*, contendo o gene *SbMATE*, para posterior averiguação do comportamento das plantas de café expressando esse gene de sorgo. Também será verificado se o promotor ubiquitina possui expressão em *Coffea*, uma vez que não foram encontrados trabalhos de transformação genética em café utilizando esse promotor.

4 CONCLUSÃO

O método de infecção por corte na base e o uso das cepas MSU e A4 promoveram a transformação genética das raízes de café e a primeira

cepa proporcionou menor mortalidade das plantas. Na cultivar Catiguá, a cepa MSU440 proporcionou uma eficiência de transformação de 32%, enquanto a cepa A4 obteve uma taxa de 16% de transferência do plasmídeo binário para a planta.

É possível transformar explantes vindos de embriogênese somática pelo método de corte usando *A. rhizogenes*.

REFERÊNCIAS

ALPIZAR, E. et al. Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 7, p. 929-940, Mar. 2008.

_____. Efficient production of Agrobacterium rhizogenes-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 9, p. 959-967, Sept. 2006.

CARNEIRO, M. F. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. **Euphytica**, Wageningen, v. 96, n. 1, p. 167-172, July 1997.

CHRISTENSEN, A. H.; QUAIL, P. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Research**, London, v. 5, n. 3, p. 213-218, May 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **1ª estimativa**. Brasília, 2013. Disponível em:
<http://www.abic.com.br/estat_pagricola.html>. Acesso em: 30 maio 2013.

DEGENHARDT, J. et al. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 117, n. 1, p. 19-27, May 1998.

ECHART, C. L.; MOLINA, S. C. Aluminum phytotoxicity: effects, tolerance mechanisms and its genetic control. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 531-541, maio/jun. 2001.

ETIENNE, H. Protocol of somatic embryogenesis: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. (Ed.). **Protocols of somatic embryogenesis-woody plants**. Wageningen: Springer, 2005. p. 167-179. (Forestry Sciences Series, 77).

ETIENNE, H. et al. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 38, n. 2, p. 129-138, Mar. 2002.

GONZALEZ, O. S. et al. Brassica napus hairy roots and rhizobacteria for phenolic compounds removal. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 20, n. 3, p. 1310-1317, Mar. 2013.

HU, S. M. P. RNAi suppression and overexpression studies of hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR) and rosmarinic acid synthase (RAS) genes related to rosmarinic acid biosynthesis in hairy root cultures of *Coleus blumei*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 113, n. 3, p. 375-385, June 2013.

KAJIKAWA, M. et al. Establishment of bispyribac selection protocols for *Agrobacterium tumefaciens*- and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 145-153, Apr. 2012.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, June 1995.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils?: mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

KUMAR, V. et al. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 214-22, Mar. 2005.

LEROY, T. et al. Introduction de g`enes d'int`er`et agronomique dans l'esp`ece *Coffea canephora* Pierre par transformation avec *Agrobacterium* sp. In: INTERNATIONAL COFFEE SCIENCE ASSOCIATION COLLOQUIUM, 17., 1997, Nairobi. **Proceedings...** Paris: ASIC, 1997. p. 439-446.

MA, J. F. et al. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 273-278, June 2001.

MAGALHÃES, J. V. et al. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and others species in the poaceae. **Genetics**, Austin, v. 167, n. 4, p. 1905-1914, Aug. 2004.

_____. Gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Sept. 2007.

MATSUMOTO, et al. Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nuclei acid. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 17, p. 627-631, 1976.

METALI, F. et al. Evidence of foliar aluminium accumulation in local, regional and global datasets of wild plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 193, n. 3, p. 637-649, Feb. 2011.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of coffee. **Biotechnology Research International**, Cairo, v. 2012, n. 1, p. 1-17, June 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PHAM, N. B.; SCHÄFER, H.; WINK, M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures. **Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 537-545, Apr. 2012.

RIBAS, A. F. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 92-95, 2011.

RIBAS, A. F.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 83-94, Mar. 2006.

RYAN, P. R. et al. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 527-560, 2001.

RYAN, P. R.; KOCHIAN, L. V. Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat

(*Triticum aestivum*) differing in aluminum tolerance. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 102, n. 3, p. 975-982, July 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2028 p.

SANTOS-BRIONES, C. D. L.; HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S. M. T. Coffee biotechnology. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 18, n. 130, p. 217-227, 2006.

SASAKI, T. et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 645-653, Mar. 2004.

STEIN, V. C. **Biotechnological approaches to improve drought tolerance of *Coffea arabica***. 2009. 97 p. Thesis (Doctor in Vegetal Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

TAYLOR, G. J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, Columbia, v. 10, p. 57-93, 1991.

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

THWE, A. A. et al. Metabolomic analysis and phenylpropanoid biosynthesis in hairy root culture of tartary buckwheat cultivars. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0065349>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

ZHAO, B. et al. Enhanced production of the alkaloid nicotine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 113, n. 1, p. 121-129, Apr. 2013.

ARTIGO 2 Desenvolvimento de um método para avaliação da tolerância ao alumínio de plantas de *Coffea arabica* oriundas de culturas *in vitro*

Artigo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

Nos solos ácidos, um dos fatores que mais limitam a produção agropecuária é a toxicidade do alumínio. No Brasil, 68% dos solos têm elevada acidez, presença de Al^{3+} e baixa disponibilidade de fósforo. Nos últimos anos, foi realizado um grande número de estudos a fim de identificar plantas da mesma espécie que possuam tolerância às condições presentes em solos ácidos. Esse trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um método eficiente para a análise de expressão do gene *SbMATE* em plantas de café transformadas em meio hidropônico. Plântulas de café da cultivar Catiguá, cultivadas *in vitro*, com idade de 6 meses foram, primeiramente, retiradas do meio de cultura, lavadas com água destilada e transferidas para solução nutritiva. Os ensaios, para detectar a tolerância ao alumínio, foram realizados em casa de vegetação com temperatura diurna média de $27\pm 3^\circ\text{C}$, noturna de $20\pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, usando solução nutritiva (Hoagland), diluída a $\frac{1}{4}$ de força e modificada quanto à concentração de fósforo. O alumínio foi fornecido nas concentrações de 0 mmol. L^{-1} , $0,833 \text{ mmol.L}^{-1}$, $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $2,499 \text{ mmol. L}^{-1}$, adicionado como $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. O pH das soluções foi mantido em $4,0 \pm 0,2$, mediante ajustes diários com $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, durante o período experimental de 30 dias. Entre as concentrações de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ analisadas, a de $0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$ foi a mais eficiente, sendo possível visualizar sintomas nítidos da toxicidade do alumínio sem a perda total da planta. O período de trinta dias foi o tempo ideal para a verificação dos principais sintomas da toxicidade ao alumínio nessa concentração. Esse resultado possibilitará análises para a visualização de tolerância de plantas geneticamente modificadas de *Coffea arabica*.

Palavras-chave: Toxicidade do alumínio. Solos ácidos. Tolerância ao alumínio. Hidroponia. *Coffea arabica*

ABSTRACT

In acid soils, one of the factors that limit agricultural production is aluminum toxicity. In Brazil, 68% of the soils have high acidity, the presence of Al^{3+} and low phosphorus availability. In recent years, a great number of studies were conducted to identify plants of the same species that have tolerance to the conditions present in acid soils. This study aimed to develop an efficient method for the analysis of expression of the SbMATE gene in coffee plants transformed in hydroponic environment. Coffee seedlings of the cultivar Catiguá in vitro with age of 6 months were first removed from the culture environment, washed with distilled water and transferred to a nutrient solution. The testing for tolerance to aluminum were conducted in a greenhouse with an average daytime temperature of $27\pm 3^\circ\text{C}$, at night to $20\pm 3^\circ\text{C}$ and photoperiod of 12 hours, using nutrient solution (Hoagland) diluted to $\frac{1}{4}$ of strength and modified on the phosphorus concentration. Aluminum was provided in concentrations of 0 mmol. L^{-1} , $0,833 \text{ mmol.L}^{-1}$, $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$ and $2,499 \text{ mmol. L}^{-1}$, added as $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. The solutions pH was maintained at $4,0 \pm 0,2$ by daily adjustment with $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ during the experimental period of 30 days. Amongst the concentrations of $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ analyzed, that of $0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$ was the most efficient, being possible to visualize clear symptoms of aluminum toxicity without total loss of the plant. The period of thirty days was the perfect time to check the main symptoms of aluminum toxicity at this concentration. This result enables analysis to display tolerance of genetically modified plants of *Coffea arabica*.

Keywords: Aluminum toxicity. Acid soils. Aluminum tolerance. Hydroponics. *Coffea arabica*.

1 INTRODUÇÃO

Um dos fatores que mais limitam a produção agropecuária é a toxicidade do alumínio nos solos ácidos. No Brasil, 68% dos solos têm elevada acidez, presença de Al^{3+} e baixa disponibilidade de fósforo (GUIMARÃES, 2005).

A técnica mais utilizada para contornar esse problema é a adição de calcário no solo (calagem), tornando o alumínio menos solúvel. Porém, a incorporação do calcário em níveis subsuperficiais do solo é muito difícil (MARTINS et al., 1999). Frente essa dificuldade, o crescimento do sistema radicular restrito reduz a absorção de água e nutrientes pelas plantas, com conseqüente decréscimo da produção.

Nos últimos anos, foi realizado um grande número de estudos a fim de identificar plantas da mesma espécie que possuam tolerância às condições presentes em solos ácidos. Após a identificação de genótipos tolerantes, eles podem ser utilizados na incorporação dessa característica em outras cultivares/progêneses agronomicamente promissoras, mas sensíveis ao alumínio tóxico do solo. Para que isso ocorra, o primeiro passo seria estabelecer um sistema rápido e preciso para a seleção de um grande número de plantas.

Diferentes métodos de seleção têm sido empregados, para avaliação da tolerância ao alumínio, como o estabelecimento de culturas em solos sob condições controladas e culturas cultivadas em soluções nutritivas. O controle adequado do balanço mineral do solo para que

determinado nível de alumínio possa ser reproduzido de um experimento para outro é extremamente complicado e trabalhoso. Com isso, o emprego de soluções nutritivas torna-se uma possibilidade muito mais eficiente, rápida e precisa para a seleção de genótipos ou em estudos específicos de fisiologia e nutrição de plantas, graças à facilidade que esse método oferece na avaliação da parte aérea e do sistema radicular (DELHAIZE; RYAN, 1995). Esse método, também, permite melhor controle das variáveis não experimentais, sendo possível avaliar um grande número de genótipos em um curto período (AUGUSTO; SOUZA, 2001). Este método tem sido utilizado com sucesso em várias espécies, tais como café (BRACCINI et al., 1998b; BRACCINI; MARTINEZ; BRACCINI, 2000; MISTRO; FAZUOLI; OLIVEIRA, 2007) trigo (PORTALUPPI et al., 2010), arroz (VICENTE, 1998), soja (AUGUSTO; SOUZA, 2001), sorgo (MAGALHAES et al., 2004, 2007), milho (BOHNEN et al., 2002; MARTINS et al., 1999; PÔSSA, 2010).

A hidroponia é uma técnica de cultivo de plantas sem solo, onde as raízes recebem uma solução nutritiva balanceada que contém água e todos os nutrientes essenciais ao desenvolvimento da planta. Nesta técnica, as plantas são colocadas em canais ou recipientes por onde circula uma solução nutritiva, composta de água pura e de nutrientes dissolvidos em quantidades individuais que atendam a necessidade de cada espécie vegetal cultivada. Na solução nutritiva, deve-se fazer um controle rigoroso para manter suas características e periodicamente é feito um monitoramento de pH e da concentração de nutrientes, assim as plantas crescem sob as melhores condições possíveis.

A caracterização específica da toxicidade do alumínio pode ser realizada pelo método de hidroponia, uma vez que experimentos em solos podem apresentar outros fatores potenciais ligados à toxicidade, como os teores elevados de ferro e manganês e a deficiência de fósforo e de molibdênio (PORTALUPPI et al., 2010).

Espécies de cafeeiro apresentam diferentes níveis de tolerância ao Al^{3+} , essa tolerância é verificada pelo desenvolvimento radicular normal em soluções nutritivas apresentando concentrações tóxicas de alumínio em cultivares tolerantes (BRACCINI et al., 1998a).

Dentro da pesquisa bibliográfica realizada, não foi verificado nenhum trabalho que realize a identificação de tolerância ao alumínio na cultivar Catiguá MG2 e, também, não há relatos de análises de tolerância ao alumínio com plântulas advindas de culturas *in vitro*.

Esse trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a capacidade de crescimento radicular de plantas obtidas *in vitro* do genótipo Catiguá MG2 de *Coffea arabica* cultivadas em hidroponia, em diferentes concentrações de alumínio. A fim de obter uma concentração específica de Al^{3+} para posteriores análises de plantas transgênicas, expressando o gene *SbMATE* extraído de sorgo, o qual confere tolerância ao alumínio por meio da exsudação de citrato pelo ápice radicular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS:

O experimento de cultivo hidropônico foi conduzido em casa de vegetação de responsabilidade do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) MG.

2.1 Obtenções de explantes

Sementes de *Coffea arabica* L. da cultivar Catiguá foram mantidas em água corrente por, aproximadamente, 1 hora para a remoção do pergaminho. Em seguida foram imersas em solução de formaldeído 1,6% por 30 minutos e superficialmente lavadas com água destilada autoclavada. Após o processo de lavagem foram mantidas em solução estéril de Ácido Bórico 0,5% por 72 horas e sob agitação. Os embriões foram excisados das sementes em condições assépticas e inoculados em meio GER (ETHIENE, 2005), que consiste em sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), vitaminas específicas para o café (10 mg.L⁻¹ de tiamina, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg.L⁻¹ de piridoxina, 2 mg.L⁻¹ de glicina), 40 g.L⁻¹ de sacarose, 10 mg.L⁻¹ de cisteína e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma Chemical Co., EUA). Os explantes foram mantidos na ausência de luz a 22°C durante 10 dias e transferidos para o claro em um fotoperíodo de 16 horas durante 20 dias. Após o surgimento da primeira raiz os explantes foram transferidos para meio GER acrescido de 0.5 µM de ácido indol butírico (IBA) com a concentração de sacarose diminuída para 20 g.L⁻¹ por 5 meses tendo o meio renovado a cada 15 dias.

2.2 Montagem do experimento de hidroponia

Plântulas de café da cultivar Catiguá estabelecidas *in vitro* com idade de 6 meses foram, primeiramente retiradas do meio de cultura, lavadas com água destilada e transferidas para solução nutritiva.

A solução utilizada foi a de Hoagland e Arnon (1950) e as plântulas foram submetidas à solução com $\frac{1}{4}$ de força (Tabela 1) por 15 dias. Ao final desse período, houve a troca da solução para $\frac{1}{2}$ força (Tabela 1). O pH da solução foi mantido a 5.5 durante todo o processo de adaptação das plantas em meio hidropônico.

O experimento de adaptação das plantas ao meio hidropônico foi conduzido em bandejas escuras e opacas de 5 litros, com dez plantas de café por bandeja. Foram utilizadas condições sem aeração, com troca de solução a cada três dias.

As plantas permaneceram nessas condições por, aproximadamente, 30 dias e depois foram direcionadas para o experimento da avaliação de tolerância ao alumínio.

2.3 Avaliação da tolerância ao Al em solução nutritiva

Os ensaios, para detectar a tolerância ao alumínio, foram realizados em casa de vegetação com temperatura diurna média de $27\pm 3^{\circ}\text{C}$, noturna de $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, usando solução nutritiva (Hoagland) diluída a $\frac{1}{4}$ de força e modificada quanto à concentração de fósforo, utilizando-se uma concentração 10 vezes menor

(Tabela 2). O alumínio foi fornecido nas concentrações de 0 mmol. L⁻¹, 0,833 mmol.L⁻¹, 1,666 mmol.L⁻¹ e 2,499 mmol. L⁻¹, adicionado como AlK(SO₄)₂.12H₂O. O pH das soluções foi mantido em 4,0 ± 0,2 mediante ajustes diários com HCl 0,1 mol L⁻¹ durante o período experimental de 30 dias. As soluções nutritivas não foram aeradas, porém eram renovadas a cada três dias. A concentração de fósforo (0,025 mmol L⁻¹) e o pH da solução foram mantidos baixos para minimizar as possíveis precipitações com o alumínio.

Tabela 2 Solução nutritiva usada para a adaptação das plantas antes de serem submetidas ao alumínio.

MACRONUTRIENTES	¼ DE FORÇA	½ DE FORÇA	ELEMENTO
KNO ₃	1,5 mmol. L ⁻¹	3 mmol. L ⁻¹	N/K
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1 mmol. L ⁻¹	2 mmol. L ⁻¹	Ca
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 mmol. L ⁻¹	1 mmol. L ⁻¹	P
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 mmol. L ⁻¹	0,5 mmol. L ⁻¹	Mg/S
MICRONUTRIENTES	¼ DE FORÇA	½ DE FORÇA	ELEMENTO
KCl	0.0005 mmol. L ⁻¹	0.001 mmol. L ⁻¹	Cl
H ₃ BO ₃	0,025 mmol. L ⁻¹	0,05 mmol. L ⁻¹	B
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,002 mmol. L ⁻¹	0,004 mmol. L ⁻¹	Mn
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,002 mmol. L ⁻¹	0,004 mmol. L ⁻¹	Zn
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0001 mmol. L ⁻¹	0,0002 mmol. L ⁻¹	Cu
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,0001 mmol. L ⁻¹	0,0002 mmol. L ⁻¹	Mo
OUTROS	¼ DE FORÇA	½ DE FORÇA	ELEMENTO
Fe(Na)EDTA	0,02 mmol. L ⁻¹	0,01 mmol. L ⁻¹	Fe/Na

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com seis repetições e os tratamentos foram compostos por soluções nutritivas contendo diferentes níveis de alumínio. Em cada repetição utilizaram-se seis plântulas.

Tabela 2 Solução nutritiva usada para a realização da curva contendo os diferentes níveis de alumínio.

MACRONUTRIENTES	¼ DE FORÇA MODIFICADA	ELEMENTO
KNO ₃	1,845 mmol. L ⁻¹	N/K
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1 mmol. L ⁻¹	Ca
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 mmol. L ⁻¹	P
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 mmol. L ⁻¹	Mg/S
MICRONUTRIENTES	¼ DE FORÇA MODIFICADA	ELEMENTO
KCl	0.0005 mmol. L ⁻¹	Cl
H ₃ BO ₃	0,025 mmol. L ⁻¹	B
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,002 mmol. L ⁻¹	Mn
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,002 mmol. L ⁻¹	Zn
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0001 mmol. L ⁻¹	Cu
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,0001 mmol. L ⁻¹	Mo
OUTROS	¼ DE FORÇA MODIFICADA	ELEMENTO
Fe(Na)EDTA	0,01 mmol. L ⁻¹	Fe/Na

Antes das plantas serem submetidas às soluções nutritivas acrescidas de Al³⁺, avaliou-se o comprimento total da raiz principal de cada uma e contou-se o número de ramificações laterais nesta raiz. O mesmo procedimento foi realizado ao final do experimento (30 dias) nos quais as plantas ficaram expostas ao Al³⁺. A fim de estabelecer a

porcentagem de redução do comprimento radicular nas três concentrações utilizadas, verificou-se a média das seis plantas dos quatro tratamentos, tanto para o número de ramificações laterais (MNRL), quanto para o comprimento radicular (MCR).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O uso de solução nutritiva a ¼ de força mostrou-se eficiente para avaliação da toxicidade do alumínio nas plantas analisadas. Muitos trabalhos empregam solução nutritiva completa para avaliar essa toxicidade nas plântulas, porém a avaliação da atividade química desse metal pode ser dificultada na presença de outros íons (CLARK; BROWN, 1974; DUQUE-VARGAS et al., 1994; FURLANI; FURLANI, 1991).

A redução do nível de fósforo nas soluções nutritivas, utilizadas para a realização da curva, foi essencial para evitar a precipitação do alumínio. Foram realizados testes com plantas submetidas à aeração constante e sem aeração (dados não mostrados) e nenhuma diferença apreciável foi notada entre os sistemas radiculares nas duas séries. Em estudos comprovam-se que a aeração não é indispensável para o desenvolvimento do cafeeiro jovem em meio hidropônico (MENDES, 1949).

Foi possível observar a susceptibilidade da cultivar Catiguá MG2 aos três níveis de Al^{3+} administrados ($0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$, $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $2,499 \text{ mmol.L}^{-1}$), por meio do engrossamento das raízes, redução do crescimento radicular, diminuição de raízes absorventes e necrose do ápice radicular (Figura, 4).

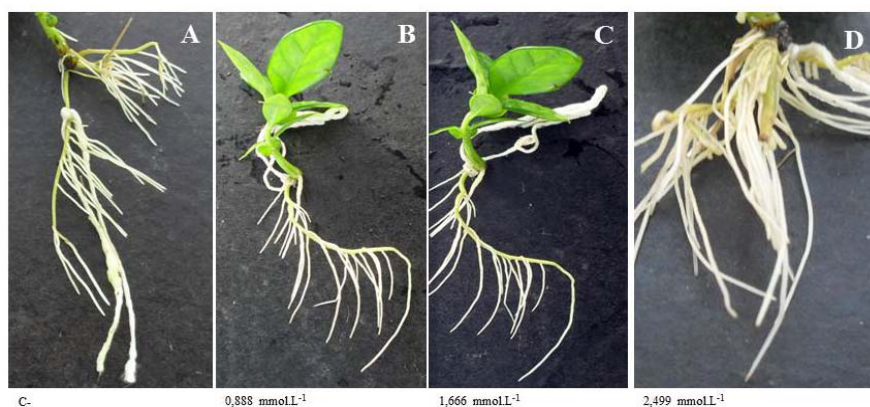


Figura 1 Aspecto do sistema radicular das plantas antes do contato com a solução nutritiva contendo Al^{3+} . A = Controle negativo (soluções sem a adição de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); B = $0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$; C = $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$; D = $2,499 \text{ mmol.L}^{-1}$.

A redução na emissão de raízes absorventes e a necrose do ápice das raízes já existentes foram dois dos primeiros sintomas observados no sistema radicular das plantas submetidas ao alumínio (Figura, 2). No sétimo dia de contato com o alumínio, no tratamento $2,499 \text{ mmol.L}^{-1}$ de Al^{3+} (maior dosagem) observou-se que as raízes começaram a apresentar uma coloração castanho clara e um início de necrose nos ápices. As plantas submetidas às outras concentrações de alumínio, dentro desse período, comportaram-se como o tratamento controle, onde as raízes possuíam coloração, espessura e ramificações normais. No décimo quinto dia de contato com o íon Al^{3+} , as plantas imersas na concentração de $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$ apresentaram inibição no desenvolvimento das raízes laterais (Figura, 2), foi observado aos 30 dias de contato com o alumínio um aumento da espessura das raízes e um início de necrose no ápice radicular (Figura, 3), em todas as plantas submetidas à presença de Al^{3+} .

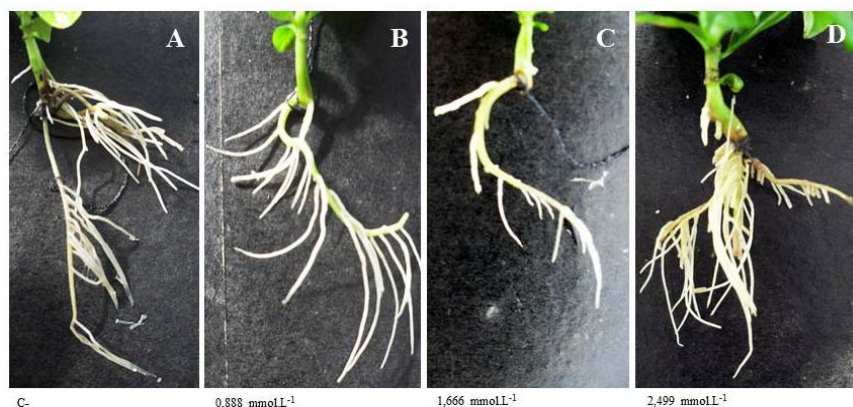


Figura 2 Aspecto do sistema radicular das plantas submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após 15 dias de contato. A = Controle negativo (soluções sem a adição de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); B = $0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$; C = $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$; D = $2,499 \text{ mmol.L}^{-1}$.

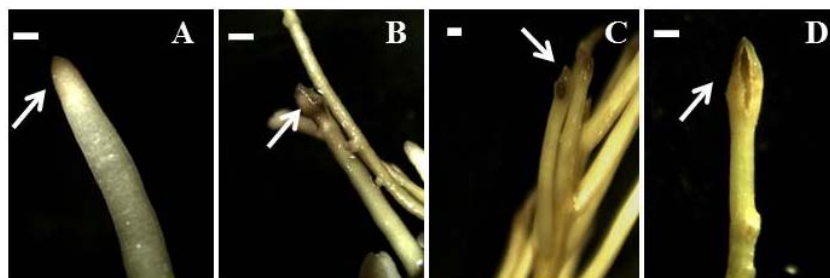


Figura 3 Ápices radiculares após 30 dias de exposição ao Al^{3+} . A = Controle negativo (soluções sem a adição de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); B = $0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$; C = $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$; D = $2,499 \text{ mmol.L}^{-1}$. Barra referente a um milímetro.

No período de quinze dias, grande parte das raízes cultivadas na maior concentração estabelecida neste estudo ($2,499 \text{ mmol.L}^{-1}$ de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) apresentaram uma coloração castanho em todo o seu

comprimento e as raízes absorventes possuíam um aspecto quebradiço (Figura, 2D). O sistema radicular do controle negativo não desenvolveu necrose e permaneceu com coloração normal (Figura, 2A). Somente após 15 dias de exposição ao Al^{3+} , às plantas submetidas à menor concentração deste começaram a apresentar sintomas, suas raízes estavam visualmente mais grossas e com um início de necrose no ápice (Figura, 2B).

Outros estudos, também, verificaram que a toxicidade de alumínio afeta, principalmente, o crescimento das raízes, inibindo o alongamento do eixo principal, aumentando a espessura dessas, apresentando uma coloração castanho e um aspecto quebradiço e, em alguns casos, é verificado o aparecimento de manchas necróticas (BENNET; BREEN, 1991; MACHADO, 1997).

Após os trinta dias corridos do experimento, todas as plantas submetidas às soluções nutritivas acrescidas de $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ apresentavam sintomas nítidos de toxicidade ao alumínio (Figura, 4). Foi observada formação de raízes curtas, grossas, amarronzadas e quebradiças, com ramificações finas e escassas como descritas por Foy (1976) e Kochian (1995). As plantas cultivadas na solução controle não apresentaram nenhuma injúria descrita acima (Figura, 4A).

Pesquisadores brasileiros desenvolveram um trabalho com o objetivo de identificar genótipos de café arábica tolerantes à toxicidade de alumínio, empregando-se soluções nutritivas. Os sintomas de toxidez foram mais evidentes nas raízes, começando a manifestar-se cerca de 20 dias após a instalação do experimento, por meio de engrossamento e amarelecimento das pontas das raízes. As ramificações laterais apresentaram sintomas mais tarde, sendo esses caracterizados pelo maior

diâmetro, pela superfície externa irregular e pelo menor tamanho, não passando de 4 a 6 mm de comprimento. As raízes das plantas controle eram longas, filiformes, de superfícies externas lisas e de coloração mais clara (MISTRO; FAZUOLI; OLIVEIRA, 2007).



Figura 4 Aspecto do sistema radicular das plantas submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após 30 dias de contato. A = Controle negativo (soluções sem a adição de $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$); B = $0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$; C = $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$; D = $2,499 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Os sintomas de toxidez de alumínio em cafeeiros, observados no presente trabalho, corroboram com os relatados por Londoño e Valencia (1983), Martinez e Monnerat (1991) e Pavan e Bingham (1982). As anormalidades morfológicas observadas no sistema radicular do cafeeiro são típicas da injúria provocada pelo alumínio e foram verificadas em outras espécies, tais como trigo, milho, feijão e sorgo (BALIGAR et al., 1993; BENNET; BREEN; FEY, 1986; CAMARGO; OLIVEIRA, 1981; MASSOT; POSCHENRIEDER; BARCELÓ, 1992).

O critério mais utilizado, para medir a toxicidade ao Al, é a comparação do crescimento das raízes de plantas crescidas em solução nutriente com pH ácido e uma concentração adequada de Al com plantas controles crescidas na ausência de Al. A maior raiz de todas as plantas usadas no experimento foram identificadas, marcadas e medidas antes de serem submetidas à curva. As ramificações laterais presentes nas raízes marcadas foram contabilizadas. O mesmo procedimento foi realizado após 30 dias de submissão à curva. A concentração de 0,888 mmol. L⁻¹ teve uma redução do crescimento radicular de 30 %, a concentração de 1,666 mmol.L⁻¹ reduziu em 52% e a concentração de 2,499 mmol. L⁻¹ de 77%, enquanto o controle apresentou um aumento de 2% (Tabela 3). A literatura expõe que a toxicidade do alumínio atua primeiramente no sistema radicular das plantas retardando o crescimento e o desenvolvimento das raízes, aumentando seu diâmetro e promovendo uma diminuição do número de raízes laterais. Essa redução do crescimento radicular ocorre pelo fato do alumínio se ligar a componentes das membranas celulares e ao grupo fosfato do ácido desoxirribonucleico, reduzindo permeabilidade da membrana e a atividade de replicação e transcrição. Sendo assim o comprimento radicular é uma das características mais relevantes aos estudos de análises da toxidez do alumínio (DELHAIZE; RYAN, 1995; FAQUIN, 1997; MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997; PAVAN; BINGHAN, 1982).

Foi analisada a redução no número das ramificações laterais das plantas submetidas ao alumínio e as concentrações mais baixas de Al³⁺ apresentaram uma menor redução sendo esta de 23% na concentração de 0,888 mmol.L⁻¹ e 28% na de 1,666 mmol.L⁻¹. Na maior concentração

administrada, houve uma redução de 64% no número de raízes absorventes, em relação ao controle, que apresentou um aumento de 28% nas ramificações identificadas (Tabela 3).

Tabela 3 Médias do comprimento radicular e do número de ramificações presentes na raiz principal antes do contato das plantas com o Al^{3+} e após 30 dias de crescimento das plantas em solução nutritiva contendo Al^{3+} .

Tratamentos	MCR1	MCR2	%	MRL1	MRL2	%
C-	4,1	4,2	> 2%	11,3	15,8	> 28%
0,888 mmol.L⁻¹	5,0	3,5	< 30%	11,0	8,5	< 23%
1,666 mmol.L⁻¹	8,1	3,9	< 52%	8,1	5,8	< 28%
2,499 mmol.L⁻¹	13,8	3,1	< 77%	13,8	5,0	< 64%

Análise da porcentagem de redução do crescimento radicular nas três dosagens de $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ comparadas com o controle (solução sem adição de Al).
MCR1 = Média do comprimento radicular no tempo 0;
MCR2 = Média do comprimento radicular após 30 dias;
MRL1 = Média das ramificações laterais no tempo 0;
MRL2 = Média das ramificações laterais após 30 dias.

Pavan e Bingham (1982) relataram que a toxicidade do alumínio na parte aérea do cafeeiro é caracterizada pelo surgimento de clorose, com pontos necróticos na margem e com aspectos típicos de enrolamento, nas folhas jovens. Como mostrado na Figura 5, nas plantas submetidas às concentrações de $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Figura, 5C) e $2,499 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Figura, 5D), esses sintomas foram notados após 30 dias. O enrolamento das folhas jovens na concentração de $1,666 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Figura, 5C) é bem nítido. Na concentração mais baixa de alumínio administrada nesse estudo é possível observar o começo de clorose nas folhas jovens (Figura, 5B), já na maior concentração é visualizada uma clorose marginal progredindo para o centro do limbo das folhas (Figura, 5D). Não foi observada nenhuma necrose nos tratamentos com alumínio e as plantas controle não apresentaram nenhum tipo de injúria (Figura, 5A).

Diante desses resultados foi escolhida a concentração de $0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$ para a realização da análise das plantas geneticamente modificadas. Apesar de esperar a superexpressão do gene nas plantas de café transformadas, o teste no sistema hidropônico necessita ser realizado com uma dosagem que não seja letal à planta controle, mas que desenvolva sintomas visíveis da toxicidade do alumínio. Assim, a distinção de plantas moderadamente tolerantes, tolerantes e altamente tolerantes poderá ser visualizada, já que é provável a expressão do gene ser a mesma para todos os indivíduos transformados. Essa pesquisa contribuiu para o estabelecimento de um protocolo de sistema hidropônico para plantas *in vitro* de *Coffea arabica* da cultivar Catiguá MG2 e mostrou a sensibilidade dessa variedade à toxicidade do alumínio.



Figura 5 Comparação da parte aérea das plantas submetidas a concentrações crescentes de alumínio após 30 dias de contato. A = Controle negativo (soluções sem a adição de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); B = $0,888\text{mmol.L}^{-1}$; C = $1,666\text{ mmol.L}^{-1}$; D = $2,499\text{ mmol.L}^{-1}$.

4 CONCLUSÃO

A introdução de explantes *in vitro* diretamente em meio hidropônico é possível e altamente viável. A solução nutritiva Hoagland, administrada em uma forma mais diluída, apresentou-se muito eficiente para o cultivo de café em sistemas de hidroponia. A aeração da solução nutritiva não é indispensável para o desenvolvimento do cafeeiro advindo de cultura de tecidos em meio hidropônico.

Entre as concentrações de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ analisadas, a de $0,888 \text{ mmol.L}^{-1}$ foi a mais eficiente, sendo possível visualizar sintomas nítidos da toxicidade do alumínio sem a perda total da planta. O período de trinta dias foi o tempo ideal para a verificação dos principais sintomas da toxicidade ao alumínio nessa concentração. Esse resultado possibilita análises para a visualização de tolerância de plantas geneticamente modificadas de *Coffea arabica*.

Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um método eficiente para a análise de expressão do gene *SbMATE* em plantas de café transformadas em meio hidropônico.

REFERÊNCIAS

AUGUSTO, L.; SOUZA, C. Reação de genótipos de soja ao alumínio em hidroponia e no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1255-1260, out. 2001.

BALIGAR, V. C. et al. Soil aluminium effects on uptake, influx, and transport of nutrients in sorghum genotypes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 150, n. 2, p. 271-277, Mar. 1993.

BENNET, R. J.; BREEN, C. M. The aluminium signal: new dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. **Plant and Soil**, The Hague, v. 134, n. 1, p. 153-166, July 1991.

BENNET, R. J.; BREEN, C. M.; FEY, M. V. Aluminium toxicity and induced nutrient disorders involving the uptake and transport of P, K, Ca and Mg in *Zea mays* L. **South African Journal of Plant Soil**, Pretoria, v. 3, p. 11-17, 1986.

BOHNEN, H. et al. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 19-24, fev. 2002.

BRACCINI, M. C. L. et al. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva: I., crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular (L.). **Revista Brasileira Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 22, n. 1, p. 435-442, jan. 1998a.

_____. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva: II., teores de P, Ca e Al e eficiência ao P E Ca. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 22, n. 1, p. 443-450, jan. 1998b.

BRACCINI, M. D. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; BRACCINI, A. D. L. E. Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução. **Bragantia**, Campinas, v. 59, n. 2, p. 221-226, 2000.

CAMARGO, C. E. O.; OLIVEIRA, O. F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva no solo. **Bragantia**, Campinas, v. 40, p. 21-31, 1981.

CLARK, R. B.; BROWN, J. C. Differential phosphorous uptake by phosphorous stressed maize inbreds. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 506-508, 1974.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 2, p. 315-321, 1995.

DUQUE-VARGAS, J. et al. Inheritance of tolerance to soil acidity in tropical maize. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 50-54, Jan./Feb. 1994.

ETIENNE, H. Protocol of somatic embryogenesis: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: JAIN, S. M.;

GUPTA, P. (Ed.). **Protocols of somatic embryogenesis-woody plants**. Wageningen: Springer, 2005. p. 167-179. (Forestry Sciences Series, 77).

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 227 p.

FOY, C. D. General principles involved in screening plants for aluminum and manganese tolerance. In: WRIGHT, M. (Ed.). **Plant adaptation to mineral stress in problem soils**. New York: Cornell University, 1976. p. 65-72.

FURLANI, P. R.; FURLANI, A. M. C. Tolerância a alumínio e eficiência a fósforo em milho e arroz: características independentes. **Bragantia**, Campinas, v. 50, n. 2, p. 331-340, 1991.

GUIMARÃES, C. T. **Caracterização da variabilidade genética e alélica da tolerância ao alumínio em gramíneas para sua utilização em programas de melhoramento**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2005. 41 p.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology**

and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, June 1995.

LONDOÑO, M. E. A.; VALENCIA, A. G. Toxicidad de aluminio en plantas de café. **Cenicafé**, Chinchina, v. 34, p. 61-97, 1983.

MACHADO, P. L. O. de A. **Considerações gerais sobre a toxicidade de alumínio nas plantas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 22 p. (Documentos, 2).

MAGALHÃES, J. V. et al. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and others species in the poaceae. **Genetics**, Austin, v. 167, n. 4, p. 1905-1914, Aug. 2004.

_____. Gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Sept. 2007.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MARTINEZ, H. E. P.; MONNERAT, P. H. Níveis crescentes de alumínio em duas variedades de café cultivadas em solução nutritiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO

SOLO, 23., 1991, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: SBCS/UFRGS, 1991. p. 109.

MARTINS, R. P. et al. Eficiência de índices fenotípicos de comprimento de raiz seminal na avaliação de plantas individuais de milho quanto à tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1897-1904, out. 1999.

MASSOT, N.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Differential response of three bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars to aluminum. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 293-298, Jan. 1992.

MENDES, C. M. Sintomas de deficiências minerais no cafeeiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DO SOLO, 2., 1949, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 1949. 1 CD-ROM.

MISTRO, J. C.; FAZUOLI, L. C.; GALLO, P. B. Comportamento de cultivares de café arábica em solos ácidos e corrigidos. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 37-38, 2007.

MISTRO, J. C.; FAZUOLI, L. C.; OLIVEIRA, A. C. B. de. Avaliação de cultivares de café arábica em diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2007, Águas de Lindóia.

Anais... Águas de Lindóia: USP, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10820/1789>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PAVAN, M. A.; BINGHAM, F. T. Toxidez de alumínio em cafeeiros cultivados em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 9, p. 1293-1302, set. 1982.

PORTALUPPI, R. et al. Tolerância de genótipos de cereais de inverno ao alumínio em cultivo hidropônico e em campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 178-185, jan. 2010.

PÔSSA, K. F. **Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene sbmate, que confere tolerância ao alumínio em sorgo**. 2010. 108 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

VICENTE, F. M. P. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 9-15, jan. 1998.