



ANDRÉ ALMEIDA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E ANÁLISE DA
EXPRESSÃO DE GENES DAS ROTAS DE
BIOSSÍNTESE E SINALIZAÇÃO DO ETILENO
EM FRUTOS DE DIFERENTES CULTIVARES
DE CAFÉ (*Coffea arabica*)**

LAVRAS – MG

2011

ANDRÉ ALMEIDA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE
GENES DAS ROTAS DE BIOSÍNTESE E SINALIZAÇÃO DO
ETILENO EM FRUTOS DE DIFERENTES CULTIVARES DE CAFÉ
(*Coffea arabica*)**

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

Orientador

PhD. Antonio Chalfun Júnior

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Lima, André Almeida.

Caracterização *in silico* e análise da expressão de genes das rotas de biossíntese e sinalização do etileno em frutos de diferentes cultivares de café (*coffea arabica*) / André Almeida Lima.

– Lavras : UFLA, 2011.

124 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Antonio Chalfun Júnior.

Bibliografia.

1. Maturação. 2. Bioinformática. 3. Precocidade. 4. qRT-PCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.733

ANDRÉ ALMEIDA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE
GENES DAS ROTAS DE BIOSÍNTESE E SINALIZAÇÃO DO
ETILENO EM FRUTOS DE DIFERENTES CULTIVARES DE CAFÉ
(*Coffea arabica*)**

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

APROVADA em 28 de julho de 2011

PhD. Alan Carvalho Andrade

EMBRAPA

Prof. Dr. Antonio Paulino da Costa Netto

UFG

PhD. Antonio Chalfun Júnior, PhD
Orientador

LAVRAS – MG

2011

Dedico a Deus, luz do meu caminho e fonte de toda sabedoria, e a toda minha família que sempre me apoiou e acreditou em mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a vida e acima de tudo SAÚDE para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Luiz Carlos de Oliveira Lima e Maráisa Almeida Barbosa Lima, e irmãos, Igor Almeida Lima e Raíssa Almeida Lima, que sempre me apoiaram, me deram forças e me proporcionaram todas as condições necessárias para a conclusão de mais esta etapa de minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Agronomia/Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e orientador Antonio Chalfun Junior por todos os ensinamentos, confiança e conselhos, pela amizade e profissionalismo, e por toda dedicação e empenho que tornaram possível a formação do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas.

A todos os professores do programa de Agronomia/Fisiologia Vegetal por todos os ensinamentos e amizade e a todos os seus funcionários deste mesmo programa e também do Setor de Fisiologia Vegetal.

Ao professor Luciano Vilela Paiva e ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), onde foi desenvolvida a maior parte dos trabalhos de biologia molecular.

À Fazenda do Ministério da Agricultura e ao Procafé de Varginha, onde foram obtidos os frutos para realização deste trabalho. Agradeço também ao professor Carlos Henrique Siqueira de Carvalho da Embrapa Café por todo apoio nesse projeto.

A todos do grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP) por todo apoio, incentivo e amizade. Agradeço especialmente a

Horllys Barreto e Solange Ságio por toda a ajuda e contribuição em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também à Carla Coelho e ao Rafael Moreira pela ajuda na condução dos experimentos.

Ao professor José Donizeti Alves e ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, onde foi desenvolvido parte do trabalho. Obrigado por todo apoio Helbert Resende, Kamila Dázio e Meline Oliveira.

A todos os colegas e amigos do programa de Agronomia/Fisiologia Vegetal, em especial a Ana Catarina Lima, Leandro Lino, Luciene Oliveira, Jean Marcel, Vinícius Fernandes, Carla Coelho, Amanda Rodrigues, Helbert Rezende, Kamila Dázio, Meline Oliveira, Cynthia Oliveira, Marinês Ferreira e Michele Valquíria.

Muito obrigado a todos!

RESUMO GERAL

O café é a segunda mercadoria mais comercializada no mundo se colocando como uma importante fonte de renda e de empregos em vários países, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, o maior produtor e segundo maior consumidor mundial de café. A qualidade do café, dentre outros fatores, está diretamente associada ao estágio de maturação dos frutos na época da colheita, o qual frequentemente apresenta uma grande desuniformidade devido ao florescimento sequencial do cafeeiro. Alguns trabalhos sugerem que o café constitua um fruto climatérico indicando que o etileno apresenta um importante papel na sua maturação. As cultivares precoces de café geralmente apresentam uma maior uniformidade na maturação de seus frutos, no entanto, pouco se sabe sobre os fatores genéticos que regulam esta característica de precocidade da maturação. Assim, este trabalho teve como objetivos realizar a caracterização *in silico* de prováveis genes das rotas de biossíntese e sinalização do etileno e analisar a expressão de alguns destes genes durante a maturação de frutos de uma cultivar tardia (Acauã) e precoce (Catucaí 785-15). As sequências selecionadas a partir das buscas realizadas no banco de dados CAFEST tiveram sua similaridade analisada por árvores filogenéticas sendo que seus perfis de expressão *in silico* foram analisados por *Northerns* eletrônicos. Os frutos do cafeeiro foram coletados no período de março a junho de 2008 e 2009 em intervalos de 30 dias e as análises de expressão gênica foram feitas por qRT-PCR. O banco de dados CAFEST apresentou um grande número de sequências relacionadas aos genes envolvidos na biossíntese e sinalização do etileno, permitindo a identificação de prováveis membros destas rotas em quase todos seus pontos. As árvores filogenéticas demonstraram a alta similaridade entre as sequências encontradas no CAFEST e aquelas de outras espécies, e os *Northerns* eletrônicos detectaram suas expressões em diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições de estresse. As análises de expressão para os prováveis genes que codificam para ACO (CaACO3) e para o receptor de etileno (CaETR4) mostraram que esses genes são diferencialmente regulados durante a maturação, com elevações de seus níveis nas coletas com maior porcentagem de frutos nas colorações vermelho-claro e cereja em ambas cultivares. O provável fator de transcrição ERF (CaERF4) parece apresentar elevados níveis de expressão durante todas as coletas não sendo diferencialmente expresso durante a maturação nas cultivares em estudo.

Palavras-chave: Maturação. Bioinformática. Precocidade. ACC oxidase. Receptor de etileno. ERF.

GENERAL ABSTRACT

Coffee is the second most commercialized product in the world posing as an important source of income and jobs in several countries, mainly in developing countries such as Brazil, the largest producer and the second largest consumer of coffee in the world. Coffee quality, among other factors, is directly associated to the fruit ripening stage at harvest time, which is often highly asynchronous due to the sequential flowering found in coffee trees, and usually leads to a higher production costs and also a lower cup quality. Some studies suggest that coffee may constitute a climateric fruit indicating that ethylene plays an important role in the coffee fruit ripening process. Coffee early cultivars usually show a more uniform ripening process although little is known about the genetic factors that promote the earliness of ripening. Thus, this study aimed to *in silico* characterize the putative genes of the ethylene biosynthesis and signaling pathways and to analyze the expression of some of these genes during the fruit ripening process of a late (Acauã) and an early (Catucaí 785-15) coffee cultivars. The selected sequences obtained from the searches performed in the CAFEST database had their phylogeny assessed by phylogenetic trees and their *in silico* expression profiles were analysed by electronic Northern blots. Coffee fruits were harvested in the periods from March to June of 2008 and 2009 with an interval of approximately 30 days between each harvest and the gene expression analyses were carried out by qRT-PCR. The CAFEST database showed a high number of sequences related to the genes of the ethylene biosynthesis and signaling pathways allowing the identification of putative members from almost every step of them. The phylogenetic trees demonstrated a high similarity between the sequences found in the CAFEST and those from other species, and the electronic Northern blots detected their expression in different tissues, development stages and stress conditions. The expression analyses of the genes encoding a putative ACO (CaACO3) and a putative ethylene receptor (CaETR4) showed that these genes are differentially expressed through the ripening process, with higher expression levels found at the times in which a major percentage of fruits in the light-red and cherry colors were present for both cultivars. The putative ERF transcription factor (CaERF4) seems to show an increased expression level throughout the experiment and were not differentially expressed during the fruit ripening period of both studied cultivars.

Keywords: Ripening. Bioinformatics. Earliness. ACC oxidase. Ethylene receptor. ERF.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Fenologia do cafeeiro e aspectos do etileno na maturação de frutos	
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	O cafeeiro: aspectos botânicos e econômicos.....	16
2.2	Fenologia do cafeeiro.....	18
2.3	Etileno: biossíntese, sinalização e a maturação de frutos.....	20
2.3.1	Biossíntese.....	21
2.3.2	Sinalização.....	24
2.3.2.1	Receptores de etileno.....	26
2.3.2.2	Resposta Tríplice Constitutiva 1 (CTR1).....	29
2.3.2.3	Proteína transmembrana EIN2.....	30
2.3.2.4	Fatores de transcrição EIN3.....	31
2.3.2.5	Fatores de transcrição ERF.....	34
2.3.3	Maturação de frutos.....	36
2.3.3.1	O desenvolvimento dos frutos do cafeeiro e sua relação com o etileno.....	39
2.4	O banco de dados CAFEST.....	41
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	CAPÍTULO 2 Caracterização <i>in silico</i> dos prováveis membros das rotas de biossíntese e sinalização do etileno em café (<i>Coffea arabica</i>)	
1	INTRODUÇÃO.....	60
2	MATERIAL e MÉTODOS.....	62
2.1	Busca no banco de dados CAFEST.....	62
2.2	Análise filogenética.....	62
2.3	Análise da expressão <i>in silico</i>.....	63

3	RESULTADOS.....	64
4	DISCUSSÃO.....	77
4.1	Análises filogenéticas.....	77
4.2	Análises da expressão <i>in silico</i>	83
5	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICE.....	93
	CAPÍTULO 3 Análise quantitativa da expressão de prováveis genes das rotas de biossíntese e sinalização do etileno	
1	INTRODUÇÃO.....	98
2	MATERIAL e MÉTODOS.....	100
2.1	Condições experimentais e coleta dos frutos.....	100
2.2	Genes analisados.....	101
2.3	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	102
2.4	qRT-PCR.....	104
3	RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	107
3.1	Porcentagem da coloração dos frutos.....	107
3.2	Análises da expressão gênica por qRT-PCR.....	108
4	CONCLUSÃO.....	116
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
	REFERÊNCIAS.....	118
	ANEXOS.....	121

CAPÍTULO 1

Fenologia do cafeeiro e aspectos do etileno na maturação de frutos

RESUMO

A qualidade do café, dentre outros fatores, está diretamente associada ao estágio de maturação dos frutos na época da colheita, o qual frequentemente apresenta uma grande desuniformidade devido ao florescimento sequencial do cafeeiro, o que geralmente leva a aumentos nos custos da produção e também a uma bebida de menor qualidade. Alguns trabalhos abordando a produção de etileno e a regulação de genes envolvidos na sua biossíntese ao longo da maturação de frutos do cafeeiro, assim como estudos envolvendo a aplicação exógena de Ethephon, indicam que o café possa ser um fruto climatérico, nos quais o etileno exerce um papel essencial durante o processo de maturação. As mudanças na maturação desencadeadas pelo etileno envolvem uma complexa regulação tanto da sua biossíntese como de sua sinalização, influenciando diretamente no tempo de maturação dos frutos. As cultivares precoces de café geralmente apresentam uma maior uniformidade da maturação de seus frutos, no entanto, pouco se sabe sobre os fatores genéticos que regulam esta característica de precocidade da maturação. Assim, estudos envolvendo análises da expressão de genes envolvidos na biossíntese e sinalização do etileno ao longo da maturação de frutos do cafeeiro, apresentam uma grande importância para uma melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos na regulação do tempo de maturação, e consequentemente na uniformidade desse processo.

Palavras-chave: Biossíntese. Sinalização. Precocidade. Frutos climatéricos.

ABSTRACT

Coffee quality, among other factors, is directly associated to the fruit ripening stage at harvest time, which is often highly asynchronous due to the sequential flowering found in coffee trees, and usually leads to higher production costs and also a lower cup quality. Some studies comprising ethylene production and the regulation of ethylene biosynthesis genes during the ripening process, as well as studies relating exogenous Ethephon application indicates that coffee may constitute a climateric fruit, in which ethylene plays an essential role during the ripening process. The ripening changes triggered by ethylene involve a complex regulation of both ethylene biosynthesis and signaling and directly influences the fruit ripening time. Coffee early cultivars usually show a more uniform ripening process although little is known about the genetic factors that promote the earliness of ripening. Thus, studies involving expression analyses of ethylene biosynthesis and signaling genes through the coffee fruit ripening process shows a great importance for a better comprehension of the genetic factors involved in the regulation of the ripening time and consequently in the ripening uniformity.

Keywords: Biosynthesis. Signaling. Earliness. Climateric fruit.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, se posicionando, após o petróleo, como a segunda mercadoria mais comercializada mundialmente. O Brasil apresenta um importante papel neste contexto, sendo o maior produtor, com cerca de 30% da produção mundial, e segundo maior consumidor de café.

Originária do continente africano, o cafeeiro pertence ao gênero *Coffea* L. da família *Rubiaceae*, o qual apresenta cerca de 100 espécies identificadas (DAVIS et al., 2006). Dentre estas, somente *C. arabica* e *C. canephora*, apresentam importância econômica sendo responsáveis por 64% e 36% da produção mundial, respectivamente.

A qualidade do café, dentre outros fatores, é fortemente influenciada pelo estágio de maturação dos frutos na época da colheita, o qual apresenta uma grande desuniformidade devido ao florescimento sequencial do cafeeiro, levando a aumentos nos custos da produção e também a uma bebida de menor qualidade.

De acordo com fatores ambientais e genéticos as cultivares de café podem ser classificadas em tardias, médias e precoces. As cultivares precoces de café geralmente apresentam uma maior uniformidade da maturação de seus frutos, no entanto, pouco se sabe sobre os fatores que regulam esta característica.

Alguns estudos abordando a produção de etileno e a regulação de genes envolvidos na sua biossíntese ao longo da maturação de frutos do cafeeiro tem sugerido ser o café um fruto climatérico (PEREIRA et al., 2005; SALMONA et al., 2008). Além disso, outros estudos relatam um efeito positivo na antecipação e sincronização da maturação de frutos do cafeeiro pela aplicação exógena de Ethephon (CARVALHO et al., 2003; SCUDELER et al., 2004). Entretanto,

poucos são os estudos relacionados à regulação da biossíntese e percepção celular do etileno nesta espécie e em suas diferentes cultivares.

Uma das formas de se controlar o processo de maturação dos frutos se dá pela regulação de genes envolvidos nos últimos passos deste processo que, nos frutos climatéricos, é desencadeado pelo etileno. Apesar dos elementos essenciais à biossíntese, percepção e transdução de sinal do etileno se mostrarem conservados em diferentes espécies, estudos têm demonstrado grande variação quanto ao número e modo de regulação destes elementos ao longo do desenvolvimento dos frutos, afetando diretamente o tempo de maturação dos mesmos.

Assim, estudos envolvendo análises da expressão de genes envolvidos na biossíntese e sinalização do etileno ao longo da maturação de frutos do cafeeiro, apresentam uma grande importância para a melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos na regulação do tempo de maturação, e consequentemente na uniformidade desse processo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cafeeiro: aspectos botânicos e econômicos

O cafeeiro, espécie originária do continente africano, pertence ao gênero *Coffea* L. da família *Rubiaceae*, o qual apresenta cerca de 100 espécies identificadas (DAVIS et al., 2006). Todas as espécies conhecidas são diploides ($2n=2x=22$) e apresentam fecundação cruzada, sendo altamente autoincompatíveis devido à presença de um sistema gametofítico de incompatibilidade controlado por um gene com múltiplos alelos (CHARRIER; BERTHAUD, 1985). A espécie *Coffea arabica* L. (*C. arabica*) representa uma exceção a este contexto e consiste de um alotetraploide ($2n=4x=44$), formado pelo cruzamento natural entre *Coffea eugeniodes* e *Coffea canephora* (LASHERMES et al., 1999), reproduzindo-se, predominantemente (cerca de 90%), por autofecundação (CONAGIN; MENDES, 1961).

O cafeeiro pode atingir até quatro metros de altura e possui uma copa formada por um conjunto de ramos divididos em ortotrópicos, crescimento vertical, e plagiotrópicos, crescimento lateral (CASTRO et al., 1987). As raízes são do tipo pivotante e profunda e amplamente ramificada nas primeiras camadas do solo. As folhas são opostas e apresentam formato elíptico a lanceolado (ALVEZ; LIVRAMENTO, 2003). As flores são encontradas nos ramos laterais e se dispõem em glomérulos axilares, em número variável de 2-19 por axila, envolvidas por um caulículo formado por dois pares de brácteas. Os eixos laterais da inflorescência nascem a partir de gemas dispostas em séries descendentes nas axilas formadas pelos pares cruzados de folhas com os ramos. Cada gema dessa série desenvolve-se em um eixo curto, que termina em uma flor (REIS; CUNHA, 2010).

O fruto do cafeeiro é classificado como uma drupa que, de uma maneira simplificada, pode ser caracterizado como um fruto carnoso, indeiscente, com pericarpo nitidamente diferenciado em exocarpo, mesocarpo e endocarpo, e que envolve um ovário bilocular onde estão localizadas normalmente duas sementes (RODRIGUES, 2001; SILVA, 2002). O exocarpo (casca) é o tecido mais externo do fruto e é formado por uma única camada de células compactas, poligonais e parenquimatosas, com número variado de cloroplastos, apresentando estômatos regularmente distribuídos em sua superfície. O exocarpo apresenta coloração verde durante grande parte do desenvolvimento do fruto do cafeeiro, podendo se tornar vermelho ou amarelo ao longo da maturação, dependendo da cultivar e/ou progênie (BORÉM, 2008). O mesocarpo, também denominado de mucilagem, é um tecido de consistência gelatinosa composto por células parenquimatosas contendo feixes vasculares (xilema e floema). Em frutos verdes, consiste de um tecido rígido que, por ação de enzimas pectinolíticas, se torna mais macio durante o processo de maturação (CASTRO; MARRACCINI, 2006). O endocarpo, também denominado de pergaminho, consiste de uma película rígida e lignificada que envolve a semente. Com o desenvolvimento do endosperma, as células do endocarpo, transformam-se em escleródios, conferindo a textura lenhosa observada nos frutos maduros. A semente do cafeeiro é constituída pela película prateada ou espermoderma, envoltório mais externo da semente e de função desconhecida, endosperma, que constitui o tecido de reserva das sementes do cafeeiro, e o embrião, formado por um hipocótilo e dois cotilédones (BORÉM, 2008).

Dentre as espécies cultivadas, somente *C. arabica* e *C. canephora*, apresentam importância econômica sendo responsáveis por 64% e 36% da produção mundial, respectivamente. De acordo com dados da Organização Internacional do Café (OIC), o Brasil, maior produtor e segundo maior consumidor mundial, é responsável por cerca de 30% de toda a produção

mundial de café, com destaque para o estado de Minas Gerais, maior produtor nacional, com 50,8% de toda produção, seguido por Espírito Santo e São Paulo com 25,3% e 8%, respectivamente (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011). De acordo com a segunda estimativa da safra de café para 2011, o Brasil produzirá em torno de 44,2 milhões de sacas de café neste ano, tendo países como os Estados Unidos e a Alemanha como os principais destinos de grande parte desta produção (CONAB, 2011; CECAFE, 2011).

2.2 Fenologia do cafeeiro

O ciclo fenológico do cafeeiro apresenta uma sucessão de fases vegetativas e reprodutivas que ocorrem em aproximadamente dois anos, diferentemente da maioria das plantas que emitem as inflorescências na primavera e frutificam no mesmo ano fenológico (CAMARGO, 1985). Desta forma o cafeeiro é classificado como uma planta bienal e o ciclo fenológico para cafeeiros da espécie *C. arabica*, nas condições climáticas tropicais do Brasil, pode ser dividido em seis fases distintas (Figura 1) (CAMARGO; CAMARGO, 2001): (1) crescimento vegetativo e formação das gemas florais; (2) indução e maturação das gemas florais; (3) florada; (4) granação dos frutos; (5) maturação dos frutos; (6) repouso e senescência dos ramos terceários e quaternários.

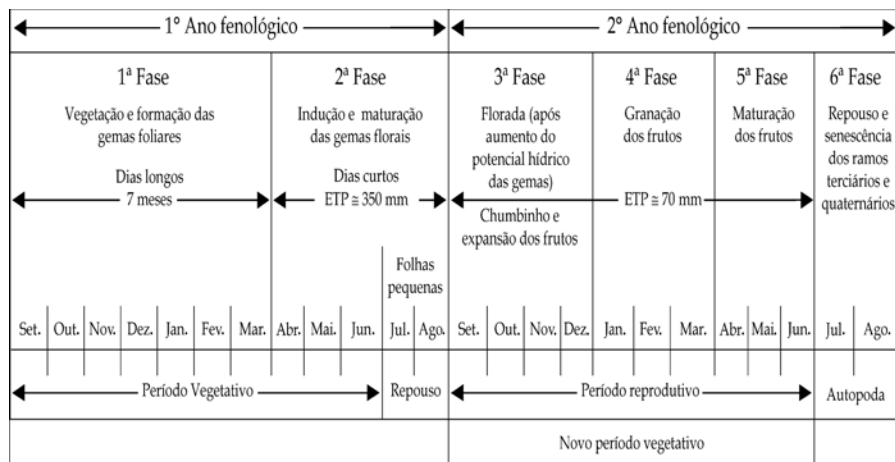


FIGURA 1 Fenologia do cafeeiro arábica, durante 24 meses, nas condições climáticas tropicais do Brasil (Adaptado de Camargo & Camargo, 2001).

O primeiro ano fenológico é caracterizado pelo crescimento vegetativo (fase 1), que normalmente ocorre de setembro a março, período caracterizado pela ocorrência de dias longos, e pela indução e maturação das gemas florais (fase 2), no período que se estende de abril a agosto e é caracterizado pela ocorrência de dias curtos. Após o completo desenvolvimento, as gemas florais entram em fase de dormência e se tornam aptas para a antese, que é promovida quando ocorre um aumento substancial de seu potencial hídrico, causado pela chuva ou irrigação. Nos dois meses finais dessa etapa, julho a agosto, as gemas dormentes produzem um par de folhas pequenas, separando o primeiro ano fenológico do segundo (MES, 1957; GOUVEIA, 1984).

O segundo ano fenológico inicia-se com a florada (fase 3), após um aumento no potencial hídrico nas gemas florais maduras, seguido da formação dos frutos (chumbinhos) e sua expansão entre setembro e dezembro. Em condições de déficit hídrico, durante a fase de dormência, os cafeeiros apresentam geralmente três floradas, onde a primeira ocorre normalmente no mês de agosto, a segunda no final de setembro/início de outubro (responsável

por mais de 90% da produção), e a terceira pode ocorrer em meados de novembro. Estas floradas desuniformes proporcionam frutos em diversos estádios de maturação durante a colheita, o que pode afetar a qualidade da bebida (REIS; CUNHA, 2010). A quarta fase corresponde ao período de granação dos frutos, onde ocorre a completa expansão dos mesmos. Durante os meses de abril a junho ocorre o processo de maturação dos frutos (fase 5), quando ocorre um pequeno aumento no tamanho dos frutos e pode-se perceber a mudança completa na coloração dos frutos. Aproximadamente 24 a 34 semanas após a antese, a maturação está completa, ou seja, as sementes estão formadas (DAMATTA et al., 2007). Durante a fase 6, julho a agosto, ocorre a autopoda, que é a morte dos ramos reprodutivos.

2.3 Etileno: biossíntese, sinalização e a maturação de frutos

O fitormônio etileno (C_2H_4) atua em uma grande variedade de processos fisiológicos e do desenvolvimento das plantas incluindo a germinação de sementes, iniciação da raiz, desenvolvimento de pelos radiculares, florescimento, determinação de sexo, maturação de frutos, senescência, e também nas respostas a estresses bióticos (como ataque de patógenos) e abióticos (como ferimento, hipoxia, seca). O etileno é produzido por todas as células dos vegetais, em taxas que variam de acordo com o tecido ou órgão e com o seu estágio de desenvolvimento, com os tecidos meristemáticos, condições de estresse, e com a maturação dos frutos, apresentando as maiores taxas de produção deste fitormônio (ABELES ET AL., 1992).

Para que se tenha um bom entendimento da ação de um determinado hormônio é necessária uma boa compreensão dos principais fatores que controlam sua ação, dos quais se podem citar a concentração, regulada pela biossíntese, degradação e conjugação; a localização, afetada pelo transporte; e a

sensibilidade (responsividade) do tecido, a qual envolve a presença de receptores e componentes de uma cadeia de transdução de sinais (DAVIES, 2003).

2.3.1 Biossíntese

O etileno é formado a partir do aminoácido metionina via S-Adenosilmetionina (AdoMet), e o precursor imediato do etileno, denominado de Ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (ADAMS; YANG, 1979). AdoMet é sintetizada a partir da metionina por ação da enzima AdoMet sintetase e a conversão de AdoMet em ACC é catalisada pela enzima ACC sintase (ACS) (KENDE, 1993). A ação da ACS produz, além do ACC, a 5-Metiltioadenosina a qual é utilizada para a síntese de uma nova metionina através do ciclo modificado da metionina ou ciclo de Yang (Figura 2) (MIYAZAKI; YANG, 1987). Um aumento na taxa respiratória fornece o ATP necessário para o ciclo de Yang e pode permitir que elevados níveis de etileno sejam produzidos na ausência de altos níveis intracelulares de metionina. A AdoMet é o principal doador de grupos metil nas plantas e está envolvido em múltiplos aspectos do metabolismo celular, como a biossíntese de poliaminas e reações de metilação que modificam lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BARRY; GIOVANNONI, 2007). Assim, apesar de haver evidências que outros genes envolvidos na síntese de metionina e no ciclo de Yang sejam diferencialmente expressos em processos como a maturação de frutos e em resposta ao etileno (ZEGZOUTI et al., 1999; ALBA et al., 2005), os dois passos comeditados com a síntese do mesmo são a formação do ACC e a sua conversão a etileno, a qual é catalisada pela enzima ACC oxidase (ACO), gerando além do etileno, CO₂ e ácido cianídrico (HCN) (YANG; HOFFMAN, 1984).

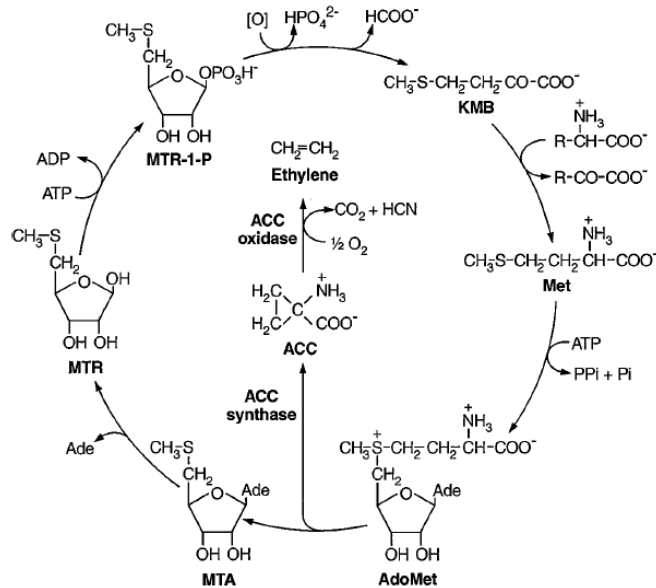


FIGURA 2 Rota biossintética do etileno e ciclo de Yang. Os significados das siglas na figura são como segue: ACC, ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico; Ade, adenina; AdoMet, S-adenosilmetionina; KMB, ácido- α -ceto- γ -metiltiobutírico; Met, L-metionina; MTA, 5'-metiltioadenosina; MTR, 5'-metiltioribose; MTR-1-P, 5'-metiltioribose-1-fosfato (BLEECKER; KENDE, 2000).

Responsável pela formação do ACC a partir do AdoMet, a enzima ACS catalisa o primeiro passo direcionado à síntese de etileno e constitui umas das etapas limitantes deste processo, tendo em vista a sua instabilidade, regulação por diversos sinais e seus baixos níveis celulares, o que sugere que a síntese de etileno seja um processo altamente regulado (BLEECKER; KENDE, 2000; ALEXANDER; GRIERSON, 2002).

A ACS é codificada por uma pequena família gênica cuja estrutura se assemelha ao subgrupo I da família das aminotransferases dependentes de piroxidal-5-fosfato (MEHTA et al., 1993), e provavelmente atua na forma de um dímero (TARUN; THEOLOGIS, 1998). Com base em suas porções C-terminal,

estudos em *Arabidopsis* sugerem a classificação das enzimas ACS em três tipos principais (YOSHIDA et al., 2005). A expressão dos membros que compõem esta família gênica é diferencialmente regulada ao longo do desenvolvimento e em respostas a diferentes estímulos (LIANG et al., 1992; OETIKER et al., 1997; BARRY et al., 2000; EL-SHARKAWY et al., 2008). A regulação da expressão dos genes *ACS* durante a maturação de frutos de tomate tem sido extensivamente estudada, em condições envolvendo a aplicação de etileno exógeno além de inibidores do mesmo, permitindo a constatação que pelo menos quatro genes *ACS* são diferencialmente expressos ao longo da maturação. Os genes *LeACS1A* e *LeACS6* estão envolvidos com a produção basal de etileno em frutos verdes e, após a aquisição da competência à maturação, os genes *LeACS1A* e *LeACS4* têm suas expressões induzidas. Estes dois genes são os grandes responsáveis pelo aumento na produção de etileno durante a maturação do tomate, e o gene *LeACS2* é essencial para a manutenção destes elevados níveis de etileno, apresentando uma elevação de sua expressão de forma etileno-dependente (BARRY et al., 2000). Além da regulação transcricional, a regulação pós-traducional destas proteínas parece exercer um importante papel (CHAE; KIEBER, 2005).

A segunda enzima importante para a biossíntese do etileno é a ACO, que promove a oxidação do ACC e a consequente formação do etileno, além de CO₂ e HCN (Figura 2) (YANG; HOFFMAN, 1984). De forma semelhante à ACS, as enzimas ACO são codificadas por uma pequena família gênica, neste caso, pertencente à superfamília Ferro-Ascorbato Oxidase (KENDE, 1993). Comumente os genes que codificam para as enzimas ACO são altamente homólogos nas suas regiões codificantes, apresentando certo grau de diferença em suas regiões não-traduzidas (UTR – *untranslated region*) (RUPERTI et al., 2001). Os genes que codificam para as enzimas ACO também têm as suas expressões espacialmente e temporalmente reguladas (CHEN et al., 2003;

ANJANASREE et al., 2005; BINNIE; MCMANUS, 2009), sendo que estudos em tomate também demonstraram que membros específicos da família ACO estão envolvidos no aumento da produção de etileno observada durante a fase climatérica da maturação do tomate (BARRY et al., 1996; NAKATSUKA et al., 1998)

2.3.2 Sinalização

Apesar de os estudos no passado terem se direcionado principalmente a aspectos relacionados à biossíntese do etileno, abordagens genômicas têm modificado esta visão e muitos estudos relacionados à biologia molecular da maturação de frutos estão vislumbrando diferentes aspectos como o controle primário da maturação acima do etileno e os componentes da cadeia de transdução de sinal do etileno (VREBALOV et al., 2002; MANNING et al., 2006; GIOVANNONI, 2007; KENDRICK; CHANG, 2008; YOO et al., 2009).

Uma vez produzido, por se tratar de um fitormônio gasoso, o etileno se difunde facilmente entre os espaços intercelulares e tecidos adjacentes. Sem a possibilidade de haver uma regulação do mecanismo de seu transporte, o controle de sua sensibilidade é um fator crítico na limitação de sua resposta em células alvo (ALONSO; ECKER, 2001), visto que um aumento na sua síntese ou a exposição ao etileno exógeno, nem sempre induz às mesmas respostas em diferentes tecidos ou estádios de desenvolvimento (GUO; ECKER, 2004).

Um dos estudos que mais contribuiu para a identificação de componentes responsáveis pela percepção e ativação das respostas promovidas pelo etileno foi a chamada resposta trílice (GUZMAN; ECKER, 1990). Plântulas crescidas no escuro, na ausência de etileno exógeno, apresentam um gancho plumular fechado, um longo e fino hipocótilo e raízes bem alongadas, enquanto que na presença de etileno exógeno, exibem a

chamada resposta tríplice, que se caracteriza pela inibição do alongamento do hipocótilo e das raízes, um espessamento radial do hipocótilo e uma curvatura exagerada do gancho plumular (GUZMAN; ECKER, 1990). Este tipo de resposta possibilitou a identificação de mutantes etileno-insensíveis (*ethylene receptor1 (etr1)*, *etr2*, *ethylene insensitive2 (ein2)*, *ein3*, *ein4*, *ein5* e *ein6*), os quais não respondem ao etileno exógeno, mutantes-constitutivos (*ethylene overproduction1 (eto1)*, *eto2*, *eto3*, *constitutive triple response1 (ctr1)* e *responsive to antagonist1 (ran1)*) os quais apresentam a resposta tríplice mesmo na ausência do etileno e os mutantes etileno-insensíveis tecidos específicos (*ethylene-insensitive root (eir1)* e *hookless (hls1)*) que apresentam o fenótipo etileno-insensível restrito a somente um tecido (JOHNSON; ECKER, 1998). Análises de epistasia dos mutantes etileno-relacionados permitiram aos pesquisadores a ordenação dos elementos básicos que compõem esta rota de sinalização, desde sua percepção à regulação transcricional (Figura 3).

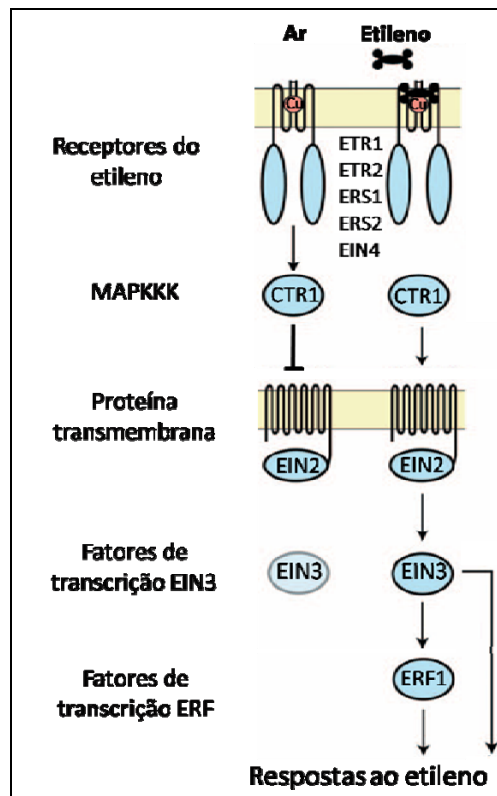


FIGURA 3 Estrutura básica da rota de sinalização do etileno demonstrando seu funcionamento na presença e na ausência de etileno. Na ausência do etileno o complexo receptores de etileno/CTR1 estão no seu modo ativo impedindo a ativação dos componentes subsequentes da rota. A ligação do etileno a este complexo promove a sua inativação, permitindo a ativação dos componentes subsequentes da rota, e consequentemente, às respostas ao etileno (Etheridge et al., 2005, modificado).

2.3.2.1 Receptores de etileno

Apesar da ampla faixa de efeitos do etileno no desenvolvimento, em todos os casos a sua ação envolve, necessariamente, a ligação a um receptor, que se coloca como um ponto chave da regulação das respostas desencadeadas pelo etileno (KLEE, 2004). O gene *ETR1* (*Ethylene Receptor 1*) foi identificado em

triagens para mutantes que bloqueiam a resposta de plântulas de *arabidopsis* ao etileno, sendo a primeira proteína a ser definitivamente atribuído o papel de um receptor de hormônios (CHANG et al., 1993). O gene *ETR1* apresenta homologia com a família procariota de transdutores de sinal conhecida como reguladores de dois componentes (CHANG et al., 1993), atua na forma de um dímero (SCHALLER et al., 1995), e sua ligação ao etileno só é permitida pela ligação de um íon cobre ao ETR1 (HIRAYAMA et al., 1999).

Estudos anteriores em *arabidopsis* demonstraram que a família de receptores nesta espécie é composta por pelo menos cinco membros: *ETR1* (CHANG et al., 1993; HUA et al., 1995), *ERS1* (*Ethylene Response Sensor1*) (HUA et al., 1995), *ERS2* (*Ethylene Response Sensor2*) e *EIN4* (*Ethylene Insensitive 4*) (HUA et al., 1998), e *ETR2* (*Ethylene Receptor 2*) (SAKAI et al., 1998). As proteínas codificadas por estes receptores se caracterizam pela presença de três domínios: o domínio sensor, localizado na extremidade N-terminal e caracterizado por abrigar o local de ligação ao etileno; o domínio GAF envolvido na interação entre os diferentes tipos de receptores (GAO et al., 2008); e o domínio histidina quinase, necessário para a interação com o próximo componente da rota de sinalização do etileno, a CTR1 (Resposta Tríplice Constitutiva1) (CLARK et al., 1998). Além disso, os receptores ETR1, ETR2, e EIN4 possuem o domínio Receptor na extremidade C-terminal, cuja função ainda não foi esclarecida (HUA et al., 1998; ZHOU et al., 2006).

Em *arabidopsis*, de acordo com as similaridades estruturais, os receptores podem ser divididos em duas subfamílias: a subfamília *ETR1-like* e a subfamília *ETR2-like*. A subfamília *ETR1-like*, composta por ETR1 e ERS1, é caracterizada por apresentar três domínios transmembrana na porção N-terminal e um domínio conservado de histidina quinase na porção C-terminal. A subfamília *ETR2-like*, que inclui ETR2, EIN4 e ERS2, possui um quarto domínio transmembrana na porção N-terminal e um domínio histidina quinase

degenerado na região C-terminal, faltando um ou mais elementos considerados necessários para atividade histidina quinase. Além disso, um membro de cada subfamília, ERS1 e ERS2, não apresentam o domínio receptor na porção C-terminal de suas proteínas, domínio este característico nos outros membros destas subfamílias (HUA et al., 1998).

Estudos envolvendo plantas de arábida apresentando mutações de perda-de-função para um ou múltiplos receptores demonstraram que os receptores de etileno são altamente redundantes em suas funções e controlam negativamente a rota de sinalização do etileno. Isto pôde ser constatado pela observação que mutantes quádruplos para receptores do etileno apresentaram um forte fenótipo de resposta constitutiva (resposta tríplice) ao etileno na ausência de etileno exógeno, sendo que algumas combinações envolvendo mutantes duplos e triplos também apresentaram esse tipo de resposta, porém de forma mais branda (HUA; MEYEROWITZ, 1998). Estes resultados sugerem que os níveis basais de etileno são suficientes para promover a inativação dos receptores restantes levando ao fenótipo de resposta tríplice nestas plantas e indicando uma correlação inversa entre os níveis dos receptores e a sensibilidade de um tecido para o etileno, de forma que é necessária uma maior quantidade de etileno para inativar elevados níveis de receptores e assim diminuir a repressão da rota de sinalização do etileno e vice-versa (KLEE, 2002).

Os receptores de etileno já foram identificados em uma grande variedade de espécies, e análises de suas expressões têm demonstrado uma grande variação de acordo com o estágio de desenvolvimento, tipo de tecido e concentração de etileno. Com relação à maturação de frutos, os receptores de etileno constituem um regulador central deste processo em frutos climatéricos, se colocando como um importante alvo de manipulação do tempo de maturação. Em tomate foram identificados seis receptores de etileno, os quais são diferencialmente expressos (KLEE, 2002). Todos receptores apresentaram baixos níveis de expressão

durante o desenvolvimento do fruto imaturo, mas durante o amadurecimento pôde ser observado um grande aumento na expressão dos receptores *NR* (*Never ripe*) ou *LeETR3*, *LeETR4* e *LeETR6* (KEVANY et al., 2007). Nesse mesmo trabalho, pôde ser constatado também que a redução nos níveis dos receptores *LeETR4* e *LeETR6* resultou em uma hipersensibilidade ao etileno, levando à maturação precoce dos frutos. Em ameixa, os baixos níveis de expressão de elementos da rota de sinalização do etileno, como o receptor *PsERS1*, associado a uma menor produção de etileno estão diretamente associados à regulação do tempo de maturação entre cultivares tardias e precoces (EL-SHARKAWY et al., 2007). Em cafeeiros, Bustamante-Porras et al. (2007) identificaram a presença de três receptores de etileno em *Coffea canephora*, *CcETR1*, *CcETR2* e *CcEIN4*, e o receptor *CcETR1* não apresentou mudanças significativas na expressão ao longo da maturação.

2.3.2.2 Resposta Tríplice Constitutiva1 (CTR1)

O próximo componente da rota de sinalização do etileno é o gene *CTR1* (*Constitutive Triple Response 1*). *CTR1* foi identificado em triagens para mutantes que constitutivamente ativavam as respostas ao etileno mesmo na sua ausência, demonstrando tratar-se de um gene que atua como um regulador negativo da rota (KIEBER et al., 1993). A porção C-terminal da proteína *CTR1* apresenta grande similaridade para com as MAPKKKs (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), presente em organismos que vão desde leveduras até humanos, sendo responsáveis pela iniciação de uma cascata MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), a qual envolve a ativação de uma MAPKK e de uma MAPK, cujo produto final é um fator de transcrição fosforilado que regula a transcrição no núcleo (KIEBER et al., 1993; HUANG et al., 2003). Apesar disso, até o momento, nenhum trabalho demonstrou definitivamente o

mecanismo exato de ação destas proteínas na rota de sinalização do etileno. Em relação à porção N-terminal da CTR1, não foi encontrada similaridade a nenhuma outra proteína descrita até o momento, mas estudos mostram que ela está envolvida com a localização destas proteínas e interação com os receptores de etileno (CLARK et al., 1998; GAO et al., 2003)

A observação de que mutações de perda-de-função no gene *CTR1* e/ou em múltiplos receptores do etileno induzem a uma ativação constitutiva das respostas ao etileno, levou a suposição de que os receptores agiam em conjunto com a CTR1 na regulação negativa da rota de sinalização do etileno, o que foi confirmado por Clark et al. (1998) que demonstraram que os receptores ETR1 e ERS1 são capazes de interagir fisicamente com CTR1 pela associação de seus domínios histidina quinase à porção N-terminal de CTR1(Figura 3).

A análise da expressão deste gene nas diferentes espécies mostra variações de acordo com o estágio de desenvolvimento, tipo de tecido e concentração de etileno. Em tomate foram identificados quatro genes *CTR1* (*LeCTR1-4*), dos quais somente *LeCTR1* apresentou um aumento durante o amadurecimento (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004). Em ameixa, a expressão do gene *PsCTR1* foi relativamente baixa no epicarpo, mesocarpo e sementes durante a maturação, apresentando um aumento na fase de amadurecimento nos três tecidos analisados (FERNANDEZ-OTERO et al., 2007).

2.3.2.3 Proteína transmembrana EIN2

Atuando após o complexo formado pelos receptores e a CTR1, o gene *Ethylene Insensitive 2 (EIN2)* é um regulador positivo da rota de transdução de sinal do etileno, com seus mutantes perda-de-função demonstrando o maior grau de insensibilidade ao etileno (ALONSO et al., 1999). O gene *EIN2* codifica uma proteína integral de membrana, localizada no retículo endoplasmático (BISSON

et al., 2009), cuja extremidade N-terminal possui 12 domínios transmembrana, e apresenta similaridade com a família de transportadores de cátions NRAMP (*Resistance-Associated Macrophage Protein*), presente em organismos que vão desde as bactérias até os humanos. A região C-terminal dessa proteína não compartilha homologia com nenhuma outra proteína de função conhecida e apresenta domínios associados a interações proteína-proteína, possuindo uma estrutura em dobra. Interessantemente, é esta região singular da proteína EIN2, a responsável pela transmissão do sinal do etileno para os elementos subsequentes da rota em *Arabidopsis*, visto que sua superexpressão foi suficiente para desencadear grande parte das respostas ao etileno (ALONSO et al., 1999).

A expressão do gene *EIN2* parece não ser alterada em resposta ao etileno (ALONSO et al., 1999; WANG et al., 2007), e de acordo com Qiao et al. (2009) a regulação pós-transcricional envolvendo, além do etileno, proteínas da família *F-box*, denominadas de ETP1 (*EIN2 Targeting Protein1*) e ETP2 (*EIN2 Targeting Protein2*), exercem um importante papel na regulação dos níveis de EIN2. Em frutos, foi observado que plantas de tomate com níveis reduzidos da expressão do gene *LeEIN2* apresentaram inibição da maturação, gerada possivelmente pela inibição de genes maturação-relacionados, como observado para o gene que codifica para a enzima Poligalacturonase (HU et al., 2010).

2.3.2.4 Fatores de transcrição EIN3

As respostas das plantas ao gás etileno são conhecidas por envolver mudanças na expressão gênica, no entanto, até a identificação e clonagem do mutante *Ethylene insensitive 3 (ein3)*, nenhuma evidência de regulação nuclear da rota de sinalização do etileno havia sido encontrada (STEPANOVA; ECKER, 2000).

As mutações de perda-de-função para o gene *EIN3* resultam em plantas com um fenótipo etileno-insensível, o que indica que *EIN3* é um regulador positivo da rota. Este fenótipo não é tão severo quanto aquele apresentado pelos mutantes *ein2*, o que provavelmente pode ser explicado pelo fato do gene *EIN3* ser membro de uma pequena família gênica em *arabidopsis*, cujas proteínas possuem funções redundantes. A família de fatores de transcrição EIN3 está presente somente nos vegetais e suas proteínas são caracterizadas por apresentarem um domínio ácido na sua porção N-terminal, uma região rica em prolina, uma estrutura em dobra, cinco domínios de aminoácidos básicos distribuídos ao longo de toda a proteína (SOLANO et al., 1998). A porção N-terminal destas proteínas é a região mais conservada entre os membros desta família, e se caracteriza por possuir o local de ligação ao DNA. Nesta região também estão localizadas a estrutura em dobra, envolvida na dimerização de EIN3 e a região rica em prolina, que provavelmente atua na manutenção da estrutura do domínio de ligação do DNA (SOLANO et al., 1998; YAMASAKI et al., 2005).

O gene *EIN3* não tem a sua expressão regulada pelo etileno em *arabidopsis* (CHAO et al., 1997) e, alguns estudos têm demonstrado que o controle pós-transcricional parece exercer um importante papel na regulação da função destes fatores de transcrição, onde duas proteínas ligadoras de ubiquitina da família F-box, EBF1 (*EIN3 binding Fbox1*) e EBF2 (*EIN3 binding Fbox2*), controlam os níveis da proteína EIN3 em resposta ao etileno (GUO; ECKER, 2003).

Os fatores de transcrição desta família estão envolvidos na regulação da expressão de alguns genes etileno-regulados, os quais se caracterizam por apresentarem sequências de regulação denominadas de elementos de resposta ao etileno (EREs). Estudos anteriores identificaram dois tipos de EREs (SOLANO et al., 1998): um primeiro tipo responsável pela regulação de genes etileno-

regulados os quais são induzidos em processos como maturação e senescência, e um segundo tipo, denominado de *GCC box*, o qual foi identificado como sendo necessário para a indução das respostas ao etileno contra o ataque de patógenos. A sequência alvo dos fatores de transcrição da família EIN3, denominada de elemento primário de resposta ao etileno (PERE) (SOLANO et al., 1998), foi localizada no promotor do gene *ERF1*, que constitui um fator de transcrição que se liga ao *GCC Box*, e mostrou compartilhar similaridade a sequências presentes em promotores de genes etileno-regulados em diferentes espécies, como *GSH1* (glutathiona-S-transferase), envolvido em processos de senescência em cravo (ITZHAKI et al., 1994), e os genes *E4* (MONTGOMERY et al., 1993) e *LeACO1* (BLUME; GRIERSON, 1997), envolvidos no processo de maturação em tomate. Estudos posteriores realizados em fumo (*Nicotiana benthamiana*) identificaram uma sequência consenso de ligação dos fatores de transcrição EIN3, denominada de ECBS (*EIL Conserved Binding Sequence*) (KOSUGI; OHASHI, 2000). Em kiwi (*Actinidia deliciosa*) ambas sequências de ligação dos fatores de transcrição EIN3 foram encontradas nos genes relacionados à maturação como: *AdACO* (ACC oxidase), *AdXET5* (Xiloglucano Endo-transglicosilase), *AdPG* (Poligalacturonase) e *AdERS1* e *AdETR1* (Receptores de etileno) (YIN et al., 2010).

Excluído:

Os fatores de transcrição EIN3 já foram analisados durante maturação em diferentes espécies como tomate (TIEMAN et al., 2001), kiwi (YIN et al., 2008; YIN et al., 2010) e banana (MBEGUIE-A-MBEGUIE et al., 2008). Em tomate pôde ser observado que estes fatores de transcrição regulam a sensibilidade ao etileno, causando grande atraso na maturação em plantas apresentando versões antisense para estes genes (TIEMAN et al., 2001). Em banana, *Ma-EIL2* apresentou indução durante o amadurecimento, sendo regulado pelo etileno (MBEGUIE-A-MBEGUIE et al., 2008), e em kiwi foi demonstrado a ativação dos promotores de *AdACO* e *AdXET* por fatores de

transcrição EIN3, no entanto, não apresentaram alterações significativas em suas expressões (YIN et al., 2008; YIN et al., 2010).

2.3.2.5 Fatores de transcrição ERF

O gene *ERF1*, identificado em *arabidopsis* como sendo um alvo direto dos fatores de transcrição da família EIN3, é um regulador positivo da rota de sinalização do etileno, visto que a sua superexpressão levou a uma ativação parcial das respostas ao etileno. Este fator de transcrição atua após a família de proteínas EIN3, pelo fato do fenótipo de sua superexpressão ter sido o mesmo, tanto nos mutantes *ein3* quanto em plantas selvagens (SOLANO et al., 1998).

Estudos de ligação *in vitro* demonstraram que *ERF1*, e todos os membros da família de proteínas de ligação ERE (EREBPs) de tabaco (OHMETAKAGI; SHINSHI, 1995), se ligam especificamente à região promotora de genes etileno-regulados, através de uma sequência altamente conservada (5'-AGCCGCC-3'), conhecida como GCC *box*. Esta ligação é realizada através da ligação do chamado domínio ERF, presente em todas as EREBPs, ao GCC *box* (HAO et al., 1998). O GCC *box* é encontrado na região promotora de muitos genes etileno-regulados, como alguns genes patógeno-relacionados, *HOOCKLESS1*, e outras EREBPs (DAVIES, 2003).

Devido à semelhança do domínio ERF encontrado no gene *ERF1* de *arabidopsis* e nas outras EREBPs de tabaco, com o domínio AP2 (*APETALA2*) encontrado no gene *AP2* em *arabidopsis* (JOFUKU et al., 1994), todas estas proteínas foram reunidas em uma grande superfamília chamada AP2/ERF. Esta superfamília de fatores de transcrição é dividida em três famílias principais, AP2 (*APETALA2*) e RAV (*Related to ABI3/VPI*) e ERF (*Ethylene Response Factors*) (RIECHMANN et al., 2000), e está envolvida na regulação transcricional de

uma variedade de processos biológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal, assim como em várias respostas a estímulos ambientais. Cada uma das três famílias que a compõem, são caracterizadas de acordo com o número e a similaridade da sequência de seus domínios AP2/ERF, o qual está envolvido na ligação ao DNA, consiste de 60 a 70 aminoácidos e está presente em todos os membros desta superfamília (NAKANO et al., 2006).

A família ERF é caracterizada por possuir um único domínio ERF, sendo subdividida em duas subfamílias: a subfamília CBF/DREB (*C-repeat/DRE-Binding Factor / Dehydration-Responsive Element Binding proteins*), cujos membros estão principalmente envolvidos nas respostas das plantas a estresses abióticos, e a subfamília ERF (*Ethylene Response Factors*), que está principalmente envolvida na resposta a estresses bióticos, como ataque de patógenos (SAKUMA et al., 2002). A subfamília ERF ainda é subdividida em quatro classes de acordo com a identidade dos aminoácidos presentes dentro do domínio ERF (FUJIMOTO et al., 2000; TOURNIER et al., 2003). O gene *ERF1* é o único membro desta família cujo papel na rota de sinalização do etileno foi totalmente estabelecido, sendo um dos alvos de ação direta dos fatores de transcrição da família EIN3. Entretanto, devido ao fato de que a superexpressão do gene *ERF1* nos mutantes *ein3* de *arabidopsis* não ser suficiente para desencadear todos os efeitos da resposta ao etileno, e devido à constatação de que várias outras proteínas desta subfamília também serem ativadas em resposta ao etileno, presume-se que os genes codificadores destas proteínas também sejam alvos diretos (PERE ou ECBS presente), ou indiretos dos fatores de transcrição da família EIN3, visto que algumas proteínas ERF também apresentam o GCC *box* podendo ser ativadas por outros membros desta subfamília.

Os ERFs apresentam um importante papel na modulação da maturação induzida pelo etileno em frutos (BAPAT et al., 2010). Frutos de tomate

contendo a versão antisense para o gene *LeERF1* sob controle do promotor *CaMV35* apresentaram uma maturação tardia quando comparado com o selvagem (LI et al., 2007). O fator de transcrição LeERF2 é um importante regulador da biossíntese de etileno pela ativação dos genes *ACS* e *ACO* de tomate (ZHANG et al., 2009b).

2.3.3 Maturação de frutos

O ciclo vital dos frutos inicia-se com a fertilização e é seguido por etapas distintas designadas de formação, crescimento, maturação e senescência (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O fitormônio etileno está diretamente relacionado com a maturação de determinados frutos, que pode ser definida como um processo altamente coordenado, geneticamente programado e irreversível, o qual envolve uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e organolépticas que leva ao desenvolvimento de frutos dispendo de atributos de qualidade desejáveis e aptos para o consumo (PRASANNA et al., 2007). Esta fase de desenvolvimento do fruto pode receber designações especiais para as fases que a antecede e/ou completa, como pré-maturação e amadurecimento, respectivamente. No estágio da pré-maturação, ocorre um aumento extensivo do volume do fruto e termina quando o desenvolvimento do mesmo é aceitável, mas não ótimo para o consumo. Já o amadurecimento, é a etapa intermediária entre o final do desenvolvimento do fruto e início da senescência, e corresponde basicamente a mudanças sensoriais: sabor, odor, cor e textura, que torna o fruto aceitável para o consumo (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Trabalhos pioneiros relacionados às bases genéticas da formação e desenvolvimento dos frutos foram realizados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (PINYOPICH et al., 2003), enquanto que pesquisas relacionadas à expansão dos frutos, maturação, ao tempo de prateleira e à

qualidade nutricional tem focado o tomate (*Solanum lycopersicum*), como modelo (GIOVANNONI, 2004, 2007). O tomate se coloca como um excelente modelo para o estudo do papel exercido pelo etileno na maturação de frutos carnosos, tendo em vista o pequeno tamanho relativo de seu genoma (~880.000.000 pb/genoma haploide), extensa caracterização de mutantes para genes relacionados ao desenvolvimento, facilidade de manipulação genética, curto ciclo de vida (~45-100 dias, dependendo da variedade e estação), e grande importância econômica (ALEXANDER; GRIERSON, 2002; GIOVANNONI, 2004).

Embora os programas bioquímicos que resultam no fenômeno da maturação variem entre as espécies, as mudanças nos frutos tipicamente incluem (GIOVANNONI, 2004): (1) modificação da coloração pela degradação da clorofila e acúmulo de carotenoides e/ou flavonoides; (2) modificação da textura pela alteração do turgor celular e da estrutura e/ou metabolismo da parede celular; (3) modificação do perfil de açúcares, ácidos orgânicos e compostos voláteis que afetam a qualidade nutricional, sabor e aroma; (4) maior susceptibilidade a patógenos oportunistas (provavelmente associado à perda da integridade da parede celular). O fitormônio etileno está diretamente relacionado ao desenvolvimento destas mudanças em um grande número de frutos, sendo o responsável pela classificação dos mesmos em dois grandes grupos: os frutos climatéricos e os frutos não-climatéricos. Os frutos climatéricos são caracterizados por apresentarem, durante a maturação, um grande aumento na biossíntese de etileno associado a uma elevação da taxa respiratória que culmina com a maturação do fruto. Estes frutos podem amadurecer na planta ou após a colheita, quando colhidos ainda imaturos, devido à elevada produção de etileno. Os frutos não-climatéricos não apresentam esta elevação na produção de etileno e na taxa respiratória e só completam o amadurecimento quando permanecem na planta (LELIEVRE et al., 1997).

De acordo com McMurchie et al. (1972), dois sistemas regulam a biossíntese de etileno nas plantas: o Sistema 1 e o Sistema 2. O Sistema 1 é operante tanto em frutos climatéricos como em não-climatéricos, assim como em tecidos vegetativos, e é responsável pela produção basal de etileno. O Sistema 2 é operante durante a maturação de frutos climatéricos e é responsável pela produção autocatalítica de etileno nesse processo. Tem sido proposto que membros específicos das famílias gênicas das enzimas ACS e ACO estejam envolvidos na manutenção e transição de ambos os sistemas, como observado em tomate (BARRY et al., 1996; NAKATSUKA et al., 1998; BARRY et al., 2000).

Apesar da classificação dos frutos em climatéricos e não-climatéricos, a qual é definida fisiologicamente com base na presença ou ausência da elevação nas taxas de síntese de etileno e da respiração no início do amadurecimento, algumas espécies podem apresentar variedades climatéricas e não-climatéricas, como o melão (PERIN et al., 2002) e pera (YAMANE et al., 2007), e outras podem incluir cultivares que apresentam um padrão climatérico suprimido, como a ameixa (ABDI et al., 1997). Os aspectos moleculares que distinguem os frutos climatéricos dos não-climatéricos são ainda pouco compreendidos, entretanto, pelo menos nas espécies que abrigam ambos os tipos de programas bioquímicos de maturação, o fenótipo não-climatérico pode representar mutações na síntese ou na sinalização do etileno, em vez de distinções mais complexas (GIOVANNONI, 2004). De acordo com esta linha de pensamento, a regulação da maturação por fatores de transcrição da família *MADS-box* em ambos os frutos climatérico (tomate) e não-climatérico (morango) (VREBALOV et al., 2002), sugere a presença de mecanismos regulatórios comuns operando no início da maturação de frutos climatéricos e não-climatéricos (GIOVANNONI, 2004).

2.3.3.1 O desenvolvimento dos frutos do cafeeiro e sua relação com o etileno

A fenologia do desenvolvimento do fruto foi caracterizada por alguns autores, (BARROS et al. 1999 citado por DAMATTA et al., 2007; MORAIS et al., 2008), sendo representada por cinco estádios diferentes. O estádio 1 ou chumbinho, caracterizado por uma baixa taxa de crescimento, porém com uma taxa respiratória elevada, ocorre entre 6 a 10 semanas após o florescimento. Nessa fase, o aumento se dá principalmente por divisão celular. O estádio 2 é caracterizado pela rápida expansão dos frutos através da expansão celular, quando ocorre um aumento em tamanho e massa fresca, e se determina o tamanho máximo do grão, ocorrendo por volta da 16ª semana. Já o estádio 3 é marcado por um crescimento lento que pode se estender por até 2 semanas, quando o tamanho final do fruto é atingido, mas a matéria seca ainda é baixa. No estádio 4 ou granação, ocorre o enchimento do endosperma, entre a 17ª e 28ª semana, a matéria seca aumenta regularmente, com pequena mudança na matéria fresca. A massa seca é depositada principalmente no grão (sementes), o qual atinge sua massa seca final quando o fruto ainda está verde. A maturidade dos grãos torna-se completa quando seu conteúdo máximo de matéria seca é atingido, assim como sua máxima capacidade de germinação. O último estádio é a maturação, onde ocorrem mudanças no pericarpo, tal como o aumento em tamanho e em matéria seca e fresca, tornando-se vermelho ou amarelo. A maturação pode se estender por um período de aproximadamente 10 semanas, da 24ª a 34ª semana após o florescimento.

Dentro do gênero *Coffea*, o tempo de desenvolvimento do fruto, iniciado a partir da antese até a maturação completa, é variável para as espécies de alto valor econômico, *C. arabica* e *C. canephora*, entre 6 a 8 e 9 a 11 meses, respectivamente. No entanto, este período pode chegar a durar mais de 12 meses como em *C. liberica* (CANNELL, 1985 citado por DAMATTA et al., 2007).

As cultivares de café arábica podem ser classificadas, de acordo com o seu período reprodutivo, em tardias, médias e precoces. Fatores ambientais como temperatura e disponibilidade hídrica estão diretamente associados a essa classificação (LAVIOLA et al., 2007; PETEK et al., 2009). Laviola et al. (2007) demonstraram que o ciclo de maturação dos frutos do cafeeiro ocorre em um período menor em altitudes menores, possivelmente devido à ocorrência de menores temperaturas máximas em altitudes mais elevadas, ocasionando uma menor velocidade das reações enzimáticas e conseqüentemente menores taxas fotossintéticas, menor respiração e menor taxa de transporte de fotoassimilados. Com relação à disponibilidade hídrica, Petek et al. (2009) demonstraram que uma diminuição da disponibilidade hídrica durante o estágio chumbinho pode acelerar este estágio de desenvolvimento do fruto e promover o início do estágio de expansão dos frutos. Isto pode resultar na formação de grãos chocos pela não formação e enchimento completo do endosperma.

Pouco se sabe sobre os fatores genéticos que regulam o tempo do período reprodutivo dos cafeeiros, sendo que alguns estudos relacionando a produção de etileno e a regulação de genes envolvidos na sua biossíntese, além da observação do efeito positivo na sincronização e antecipação da maturação dos frutos pela aplicação exógena de Ethepon, sugerem que o etileno possa estar envolvido nesse processo. Pereira et al. (2005) constataram um rápido aumento na produção de etileno em frutos verde-cana, após o final da formação do endosperma, com um decréscimo nos frutos cereja indicando uma fase climatérica da maturação. A expressão do gene *Ca-ACO* foi superior àquela encontrada nos frutos verdes em todos os estádios analisados, não apresentando uma variação significativa nos mesmos, sugerindo que a regulação pós-transcricional possa exercer um papel importante na ação desta enzima (PEREIRA et al., 2005). Salmona et al. (2008) mostraram que durante os estádios finais de desenvolvimento da semente, genes relacionados à biossíntese

(ACO) e sinalização (ETR1) do etileno apresentaram um aumento da expressão, o que corrobora com o aumento da biossíntese de etileno, observado por Pereira et al. (2005) durante a maturação. Com relação à aplicação exógena de ácido-2-cloro-etil-fosfônico, conhecido como Ethrel, Ethephon ou CEPA, composto capaz de liberar etileno por meio de uma reação química, alguns trabalhos relatam que este produto é utilizado com o intuito de uniformizar e acelerar a maturação dos frutos, antecipando e aumentando a eficiência da colheita do café (SCUDELER et al., 2004). Carvalho et al. (2003) mostraram que o uso de Ethephon proporcionou uma antecipação de 15 a 30 dias na maturação dos frutos do cafeeiro, e um aumento de aproximadamente 22% na porcentagem de frutos no estágio cereja, considerado como o estágio ideal para a colheita, uma vez que os frutos atingem a maturidade fisiológica. Além disso, não foram observadas desfolhas significativas pela aplicação do Ethephon, o qual também não interferiu na qualidade da bebida. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2009).

As cultivares de café classificadas como precoces, geralmente, apresentam uma maior uniformidade na maturação de seus frutos, no entanto, pouco se sabe sobre os fatores que influenciam esta característica, sendo que o etileno, possivelmente pode estar envolvido nesta regulação.

2.4 O banco de dados CAFEST

O projeto genoma café, desenvolvido em conjunto por várias instituições brasileiras, consiste em um banco de dados formado a partir do sequenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), as quais foram obtidas a partir de diferentes tecidos, em diferentes estágios de desenvolvimento e condições de estresse bióticos e abióticos, das espécies *Coffea arabica*, *Coffea canefora* e *Coffea racemosa*. As ESTs depositadas no banco CAFEST foram obtidas a

partir da extração do RNA total dos tecidos analisados, purificação do mRNA, obtenção do cDNA através da transcrição reversa (RT-PCR), construção das bibliotecas de cDNA, geradas a partir da fragmentação do cDNA, união destes fragmentos a vetores de clonagem e transferência para bactérias, produzindo assim um conjunto de clones contendo fragmentos superpostos de genes ativamente transcritos e possibilitando o sequenciamento desses fragmentos (VIEIRA et al., 2006).

O banco de dados CAFEST foi formado a partir do sequenciamento de 214.964 clones, escolhidos aleatoriamente de 37 bibliotecas de cDNA, os quais funcionam como etiquetas identificando genes expressos, sendo por isso chamados de ESTs, no tecido do qual o RNA foi isolado (VIEIRA et al., 2006).

Desta forma, a frequência de uma determinada sequência de DNA em uma biblioteca de cDNA depende da abundância do mRNA correspondente em um determinado tecido, tornando possível a estimativa da expressão de um dado gene de acordo com o número de vezes que seus transcritos foram sequenciados, o que permite o estudo da expressão diferencial de genes em diferentes órgãos de um mesmo organismo, promovendo um melhor entendimento de seu desenvolvimento e função.

Através de programas computacionais é possível remontar a informação inicial e, através de alinhamentos, realizado por programas como o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997), das sequências encontradas no banco de dados CAFEST com as sequências depositadas em bancos de dados públicos, é possível a comparação entre as sequências de café com aquelas encontradas em outras espécies. Desta forma, tornou-se possível a determinação do grau de similaridade entre estas sequências, fornecendo assim uma das mais importantes fontes de estudos sobre a biologia e fisiologia do cafeeiro, gerando dados essenciais para o isolamento e caracterização de genes

Excluído:

agronomicamente importantes para o melhoramento do café (VIEIRA et al., 2006).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A qualidade do café é fortemente influenciada pelo estágio de maturação dos frutos na época da colheita, o qual apresenta uma grande desuniformidade face ao florescimento sequencial do cafeeiro. As cultivares precoces de café geralmente apresentam uma maior uniformidade da maturação de seus frutos, no entanto, pouco se sabe sobre os fatores que regulam essa característica. O etileno está diretamente relacionado ao controle da maturação dos frutos climatéricos e parece exercer um importante papel na maturação dos frutos do cafeeiro. Desta forma, estudos envolvendo análises da expressão de genes envolvidos na biossíntese e sinalização do etileno, ao longo da maturação do café, apresentam grande importância para a melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos na regulação do tempo de maturação e,consequentemente, na uniformidade desse processo.

REFERÊNCIAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. JR. **Ethylene in plant biology**, 2nd edn. New York: Academic Press. 1992. 414p.
- ABDI, N. et al. Ripening behaviour and responses to propylene in four cultivars of Japanese type plums. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 21-34, Aug. 1997.
- ADAMS, D. O.; YANG, S. F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Protocols of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 76, n. 1, p. 170-74, Jan. 1979.
- ADAMS-PHILLIPS, L. et al. Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 3, p. 387-404, Feb. 2004.
- ALBA, R. et al. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 11, p. 2954-2965, Nov. 2005.
- ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 377, p. 2039-2055, Oct. 2002.
- ALONSO, J. M. et al. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in arabidopsis. **Science**, Washington, v. 284, n. 5423, p. 2148-2152, Jun. 1999.
- ALONSO, J. M.; ECKER, J. R. The Ethylene Pathway: A Paradigm for plant hormone signaling and interaction. **Sci. STKE**, La Jolla, v. 70, n. 70, p. RE1, Feb. 2001.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Jul. 1997.
- ALVEZ, J. D.; LIVRAMENTO, D. E. **Mofologia e fisiologia do cafeeiro**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 46p.

- ANJANASREE, K. N.; VERMA, P. K.; BANSAL, K. C. Differential expression of tomato ACC oxidase gene family in relation to fruit ripening. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 8, p. 1394-1399, Oct. 2005.
- BAPAT, V. A. et al. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 94-107, Jan-Feb. 2010.
- BARRY, C. S. et al. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 525-535, Apr. 1996.
- BARRY, C. S.; LLOP-TOUS, M. I.; GRIERSON, D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 3, p. 979-986, Jul. 2000.
- BARRY, C. S.; GIOVANNONI, J. J. Ethylene and fruit ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, n. 2, p. 143-159, Jun. 2007.
- BINNIE, I. E.; MCMANUS, M. T. Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase multigene family of *Malus domestica* Borkh. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n. 3, p. 348-360, Feb. 2009.
- BISSON, M. M. A. et al. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. **Biochemical Journal**, London, v. 424, n. 1, p. 1-6, Nov. 2009.
- BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p. 1-18, 2000.
- BLUME, B.; GRIERSON, D. Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 731-746, Oct. 1997.
- BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. 631p.

BUSTAMANTE-PORRAS, J. et al. Characterization of three ethylene receptor genes in *Coffea canephora* Pierre. In: **Advances in Plant Ethylene Research: Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene**, n. 7, 2007, Pisa-Italy. Editora: Springer, 2007. p. 53-56.

CAMARGO, A. P. Florescimento e frutificação do café arábica nas diferentes regiões cafeeiras do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n.7, p. 831-839, Mar. 1985.

CAMARGO, A. P.; CAMARGO, M. B. P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, jan. 2001.

CARVALHO, G. R. et al. Eficiência do ethephon na uniformização e antecipação da maturação de frutos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e na qualidade da bebida. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 98-106, Fev. 2003.

CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 175-199, Mar. 2006.

CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Potafós, 1987. 249p.

CHAE, H. S.; KIEBER, J. J. Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. **Trends in Plant Science**, London, v. 10, n. 6, p. 291-296, Jun. 2005.

CHANG, C. et al. Arabidopsis ethylene-response gene *etr1* - similarity of product to 2-component regulators. **Science**, New York, v. 262, n. 5133, p. 539-544, Oct. 1993.

CHAO, Q. M. et al. Activation of the ethylene gas response pathway in arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. **Cell**, Cambridge, v. 89, n. 7, p. 1133-1144, Jun. 1997.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILLSON, K.C. (Ed.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helms, 1985. p. 167-195.

CHEN, Y. T. et al. A novel papaya ACC oxidase gene (CP-ACO2) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence. **Plant Science**, Clare, v. 164, n. 4, p. 531-540, Apr. 2003.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CLARK, K. L. et al. Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 15, p. 9060-9060, Jul. 1998.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Segunda estimativa: maio 2009**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_10_09_04_16_boletim_ccafe_portugues_-_maio_-_2011_2o_lev..pdf>. Acesso em: 28 jun. 2011.

CONAGIN, C. H. T. M.; MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*: auto-incompatibilidade em *Coffea canephora*. **Bragantia**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 787-804, Set. 1961.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. **Resumo das exportações Junho 2011**. Disponível em: <<http://www.cncafe.com.br/ba/file/CECAFE%20%20Resumo%20das%20Exportacoes%20de%20Cafe%20JUNHO%202011.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2011.

DAMATTA, F. M.; et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 4, p. 485-510, Mar. 2007.

DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2004. 750 p.

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, 2006.

EL-SHARKAWY, I. et al. Isolation and characterization of four ethylene signal transduction elements in plums (*Prunus salicina* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 13, p. 3631-3643, Oct. 2007.

EL-SHARKAWY, I. et al. Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 8, p. 2009-2027, May. 2008.

ETHERIDGE, N.; CHEN, Y-F.; SCHALLER, G. E. Dissecting the ethylene pathway of arabidopsis. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 372-381, 2005.

FERNANDEZ-OTERO, C. I. et al. Stage- and tissue-expression of genes involved in the biosynthesis and signalling of ethylene in reproductive organs of damson plum (*Prunus domestica L. subsp insititia*). **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, n. 3-4, p. 199-208, Mar-Apr. 2007.

FUJIMOTO, S. Y. et al. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 3, p. 393-404, Mar. 2000.

GAO, Z. et al. Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville Pike, v. 283, n. 35, p. 23801-23810, Aug. 2008.

GAO, Z. Y. et al. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville Pike, v. 278, n. 36, p. 34725-34732, Sep. 2003.

GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. S170-S180, 2004.

GIOVANNONI, J. J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, n. 3, p. 283-289, Jun. 2007.

GOUVEIA, N. M. **Estudo da diferenciação e crescimento de gemas florais de Coffea arabica L:** observações sobre a antese e maturação dos frutos. 1984. 237 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GUO, H. W.; ECKER, J. R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell**, Cambridge, v. 115, n. 6, p. 667-677, Dec. 2003.

- GUO, H. W.; ECKER, J. R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Current Opinion in Plant Biology**, La Jolla, v. 7, n. 1, p. 40-49, Feb. 2004.
- GUZMAN, P.; ECKER, J. R. Exploiting the triple response of arabidopsis to identify ethylene-related mutants. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 6, p. 513-523, Jun. 1990.
- HAO, D. Y.; OHME-TAKAGI, M.; SARAI, A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville Pike, v. 273, n. 41, p. 26857-26861, Oct. 1998.
- HIRAYAMA, T. et al. Responsive-to-antagonist1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v. 97, n. 3, p. 383-393, Apr. 1999.
- HU, Z. L. et al. Co-suppression of the EIN2-homology gene *LeEIN2* inhibits fruit ripening and reduces ethylene sensitivity in tomato. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 57, n. 4, p. 554-559, Jul. 2010.
- HUA, J. et al. Ethylene insensitivity conferred by arabidopsis *ers* gene. **Science**, Washington, v. 269, n. 5231, p. 1712-1714, Sep. 1995.
- HUA, J. et al. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 8, p. 1321-1332, Aug. 1998.
- HUA, J.; MEYEROWITZ, E. M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, Cambridge, v. 94, n. 2, p. 261-271, Jul. 1998.
- HUANG, Y. F. et al. Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in arabidopsis. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 221-233, Jan. 2003.
- ITZHAKI, H.; MAXSON, J. M.; WOODSON, W. R. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-s-transferase (*gsti*) gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 19, p. 8925-8929, Sep. 1994.

JOFUKU, K. D. et al. Control of arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *apetala2*. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 9, p. 1211-1225, Sep. 1994.

JOHNSON, P. R.; ECKER, J. R. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 32, n. p. 227-254, 1998.

KENDE, H. ETHYLENE BIOSYNTHESIS. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 283-307, 1993.

KENDRICK, M. D.; CHANG, C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 5, p. 479-485, Oct. 2008.

KEVANY, B. M. et al. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **Plant Journal**, Malden, v. 51, n. 3, p. 458-467, Aug. 2007.

KIEBER, J. J. et al. CTR1, A negative regulator of the ethylene response pathway in arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein-kinases. **Cell**, Cambridge, v. 72, n. 3, p. 427-441, Feb. 1993.

KLEE, H. J. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 377, p. 2057-2063, Oct. 2002.

KLEE, H. J. Ethylene signal transduction. Moving beyond arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 2, p. 660-667, Jun. 2004.

KOSUGI, S.; OHASHI, Y. Cloning and DNA-binding properties of a tobacco *Ethylene-Insensitive3 (EIN3)* homolog. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 960-967, Feb. 2000.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica L.* genome. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 261, n. 2, p. 259-266, Mar. 1999.

LAVIOLA, B. G. et al. Alocação de fotoassimilados em folhas e frutos de cafeeiro cultivado em duas altitudes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1521-1530, Nov. 2007.

- LI, Y. C. et al. LeERF1 positively modulated ethylene triple response on etiolated seedling, plant development and fruit ripening and softening in tomato. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, n. 11, p. 1999-2008, Nov. 2007.
- LELIEVRE, J. M. et al. Ethylene and fruit ripening. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 4, p. 727-739, Dec. 1997.
- LIANG, X. W. et al. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of arabidopsis-thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 22, p. 11046-11050, Nov. 1992.
- MANNING, K. et al. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. **Nature Genetics**, New York, v. 38, n. 8, p. 948-952, Aug. 2006.
- MBEGUIE-A-MBEGUIE, D. et al. *EIN3-like* gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. *Grande naine*). **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 133, n. 2, p. 435-448, Jun. 2008.
- MCMURCHIEJ; MCGLASSO.WB; EAKS, I. L. Treatment of fruit with propylene gives information about biogenesis of ethylene. **Nature**, London, v. 237, n. 5352, p. 235-236, May. 1972.
- MEHTA, P. K.; HALE, T. I.; CHRISTEN, P. Aminotransferases - demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 214, n. 2, p. 549-561, Jun. 1993.
- MES, M. G. Studies on the flowering of *Coffea arabica* L. Various phenomena associated with the dormancy of the coffee flower buds. **Portugaliae Acta Biologica**, Lisboa, v. 5, n. 1, p. 25-44, Mar. 1957.
- MIYAZAKI, J. H.; YANG, S. F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 69, n. 2, p. 366-370, Feb. 1987.
- MONTGOMERY, J. et al. Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 13, p. 5939-5943, Jul. 1993.

MORAIS, H. et al. Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *Coffea arabica*. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 257-260, Aug. 2008.

NAKANO, T. et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 2, p. 411-432, Feb. 2006.

NAKATSUKA, A. et al. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1295-1305, Dec. 1998.

OETIKER, J. H. et al. Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 275-286, May. 1997.

OHMETAKAGI, M.; SHINSHI, H. Ethylene-inducible dna-binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 2, p. 173-182, Feb. 1995.

PEREIRA, L.F.P. et al. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 3, p. 283-289, Set. 2005.

PERIN, C. et al. Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 1, p. 300-309, May. 2002.

PETEK, R. M.; SERA, T.; FONSECA, I. C. B. Exigências climáticas para o desenvolvimento e maturação dos frutos de cultivares de *Coffea arabica*. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p.169-181, Aug. 2009.

PINYOPICH, A. et al. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. **Nature**, London, v. 424, n. 6944, p. 85-88, Jul. 2003.

PRASANNA, V.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Fruit ripening phenomena - An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 47, n. 1, p. 1-19, Sep. 2007.

- REIS, P. R.; CUNHA, R. L. **Café arábica: do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, 2010. 896p.
- RIECHMANN, J. L. et al. Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**, Washington, v. 290, n. 5499, p. 2105-2110, Dec. 2000.
- RODRIGUES, V. E. G. **Morfologia externa: organografia, organogenia vegetal**. Lavras: UFLA, 2001. 127 p.
- RUPERTI, B. et al. Characterization and expression of two members of the peach 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, n. 3, p. 336-344, Mar. 2001.
- SAKAI, H. et al. ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 10, p. 5812-5817, May. 1998.
- SAKUMA, Y. et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 290, n. 3, p. 998-1009, Jan. 2002.
- SALMONA, J. et al. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 66, n. 1-2, p. 105-124, Jan. 2008.
- SCHALLER, G. E. et al. The ethylene response mediator etr1 from arabidopsis forms a disulfide-linked dimer. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville Pike, v. 270, n. 21, p. 12526-12530, May. 1995.
- SCUDELER, F. et al. Cobertura da pulverização e maturação de frutos do cafeeiro com Ethephon em diferentes condições operacionais. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 1, p. 129-139, Out. 2004.
- SILVA, E. A. A. **Coffea (Coffea arabica cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**. 2002. 105 p. Tese (doutorado – Wageningen University, Wageningen), 2002.
- SILVA, M. F. et al. Uso do Ethrel na colheita mecanizada e seletiva de café arábica. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 178-182, Dec. 2009.

- SOLANO, R. et al. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes & Development**, New York, v. 12, n. 23, p. 3703-3714, Dec. 1998.
- STEPANOVA, A. N.; ECKER, J. R. Ethylene signaling: from mutants to molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 5, p. 353-360, Oct. 2000.
- TARUN, A. S.; THEOLOGIS, A. Complementation analysis of mutants of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase reveals the enzyme is a dimer with shared active sites. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville Pike, v. 273, n. 20, p. 12509-12514, May. 1998.
- TIEMAN, D. M. et al. Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. **Plant Journal**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 47-58, Apr. 2001.
- TOURNIER, B. et al. New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 550, n. 1-3, p. 149-154, Aug. 2003.
- VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.
- VREBALOV, J. et al. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (Rin) locus. **Science**, Washington, v. 296, n. 5566, p. 343-346, Apr. 2002.
- WANG, J. et al. Cloning and characterization of the EIN2-homology gene *LeEIN2* from tomato. **DNA Sequence**, Oxforshire, v. 18, n. 1, p. 33-38, Feb. 2007.
- YAMANE, M. et al. Differential expression of ethylene biosynthetic genes in climacteric and non-climacteric Chinese pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 220-227, Jun. 2007.
- YAMASAKI, K. et al. Solution structure of the major DNA-binding domain of *Arabidopsis thaliana* ethylene-insensitive3-like3. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 348, n. 2, p. 253-264, Apr. 2005.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 35, n. p. 155-189, Jun. 1984.

YIN, X. R. et al. Ethylene-induced modulation of genes associated with the ethylene signalling pathway in ripening kiwifruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 8, p. 2097-2108, May. 2008.

YIN, X. R. et al. Kiwifruit EIL and ERF Genes Involved in Regulating Fruit Ripening. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 3, p. 1280-1292, Jul. 2010.

YOO, S. D.; CHO, Y. H.; SHEEN, J. Emerging connections in the ethylene signaling network. **Trends in Plant Science**, London, v. 14, n. 5, p. 270-279, May. 2009.

YOSHIDA, H. et al. Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. **Bmc Plant Biology**, London, v. 5, n. 14, p. Aug. 2005.

ZEGZOUTI, H. et al. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. **Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 589-600, Jun. 1999.

ZHANG, Z. J. et al. Transcriptional Regulation of the Ethylene Response Factor LeERF2 in the Expression of Ethylene Biosynthesis Genes Controls Ethylene Production in Tomato and Tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 1, p. 365-377, May. 2009.

ZHOU, H. L. et al. Roles of ethylene receptor NTHK1 domains in plant growth, stress response and protein phosphorylation. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 580, n. 5, p. 1239-1250, Feb. 2006.

CAPÍTULO 2

**Caracterização *in silico* dos prováveis membros das rotas
de biossíntese e sinalização do etileno em café (*Coffea
arabica*)**

RESUMO

O fitormônio etileno está envolvido em uma grande variedade de processos fisiológicos e do desenvolvimento das plantas incluindo senescência, maturação de frutos e abscisão de órgãos, assim como nas respostas a estresses abióticos e bióticos. A iniciação destes processos envolve uma complexa regulação tanto da biossíntese como da capacidade das células perceberem e responderem, de maneira apropriada, ao etileno, um processo regulado tanto espacialmente como temporalmente. Apesar de poucos dados sobre o assunto, muitos autores têm categorizado o café como um fruto climatérico, sugerindo que o etileno apresenta um papel importante na iniciação e progresso da maturação. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização *in silico* dos prováveis componentes das rotas de biossíntese e sinalização do etileno em café (*Coffea arabica*). Foram realizadas buscas no banco de dados CAFEST por palavras-chave e similaridade (blastn + tblastn), e as sequências apresentando similaridade confiável foram clusterizadas, anotadas e analisadas quanto à presença de domínios conservados. Foram feitos alinhamentos múltiplos envolvendo as sequências encontradas e sequências de outras espécies relacionadas à biossíntese e sinalização do etileno, e a filogenia entre estas sequências foi avaliada pela construção de árvores filogenéticas pelo programa MEGA4. O perfil de expressão *in silico* foi avaliado por *Northerns* eletrônicos gerados pelos programas *Cluster* e *TreeView*. O banco de dados CAFEST apresentou um grande número de sequências relacionadas aos genes envolvidos na biossíntese e sinalização do etileno, permitindo a identificação de prováveis membros destas rotas em quase todos seus pontos. As árvores filogenéticas demonstraram a alta similaridade entre as sequências encontradas no CAFEST e aquelas de outras espécies, e os *Northerns* eletrônicos detectaram suas expressões em diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições de estresse.

Palavras-chave: Bioinformática. Sensibilidade. Receptores de etileno. CTR1. EIN2. EIN3. ERF.

ABSTRACT

The plant hormone ethylene is involved in several developmental and physiological processes in plants, including senescence, fruit ripening and organ abscission, as well as biotic and abiotic stress responses. Initiation of these processes involves complex regulation of both ethylene biosynthesis and the ability of cells to perceive the hormone and respond in an appropriate manner, a process which is regulated both spatially and temporally. Although the scarce data related to the subject, many authors have categorized coffee as a climateric fruit, suggesting that ethylene plays a central role in coffee ripening initiation and progress. Thus, this work aimed to *in silico* characterize the putative members of the coffee (*Coffea arabica*) biosynthesis and signaling pathways. Data mining in the CAFEST database were carried out using key-words and similarity (blastn + tblastn) searches, and the sequences showing reliable similarity were clusterized, annotated and analyzed for the presence of conserved domains. Multiple alignments comprising the sequences found in this work and sequences of ethylene biosynthesis and signaling pathways from other species were performed, and their phylogeny was assessed by phylogenetic trees constructed by the MEGA4 software. The expression profile was assessed by *in silico* Northern performed by the Cluster and TreeView programs. The CAFEST database showed a high number of sequences related to the genes of the ethylene biosynthesis and signaling pathways allowing the identification of putative members from almost every step of them. The phylogenetic trees demonstrated a high similarity between the sequences found in the CAFEST and those from other species, and the electronic Northern detected their expression in different tissues, development stages and stress conditions.

Keywords: Bioinformatics. Sensitivity. Ethylene receptors. CTR1. EIN2. EIN3. ERF.

1 INTRODUÇÃO

O fitormônio etileno desempenha um importante papel em uma grande variedade de processos fisiológicos e do desenvolvimento vegetal como germinação de sementes, alongamento do caule, maturação de frutos, senescência, e também nas respostas a estresses bióticos e abióticos. A participação em processos de grande importância agrônômica tem feito deste fitormônio um alvo de intensos estudos relacionados à sua regulação e ação.

Para que se tenha um bom entendimento da ação de um determinado hormônio é necessária uma boa compreensão dos principais fatores que controlam sua ação, dos quais se podem citar a concentração, regulada pela biossíntese, degradação e conjugação, a localização, afetada pelo transporte, e a sensibilidade (responsividade) do tecido, a qual envolve a presença de receptores e componentes de uma cadeia de transdução de sinais (DAVIES, 2003).

O etileno é produzido por todas as células dos vegetais, em taxas que variam de acordo com o tecido ou órgão e estágio de desenvolvimento, com os tecidos meristemáticos, condições de estresse, e a maturação dos frutos, apresentando as maiores taxas de produção deste fitormônio (Abeles et al., 1992). Sintetizado a partir do aminoácido metionina, os dois passos direcionados para sua biossíntese são catalisados pelas enzimas ACC sintase e ACC oxidase, que são formadas por pequenas famílias gênicas cujos diferentes membros são diferencialmente regulados ao longo do desenvolvimento.

Uma vez produzido, por se tratar de um fitormônio gasoso, o etileno se difunde facilmente entre os espaços intercelulares e tecidos adjacentes. Sem a possibilidade de haver uma regulação do mecanismo de seu transporte, o controle de sua sensibilidade é um fator crítico na limitação de sua resposta em células alvo (ALONSO; ECKER, 2001), visto que um aumento na sua síntese ou

a exposição ao etileno exógeno, nem sempre induz às mesmas respostas em diferentes tecidos ou estádios de desenvolvimento (GUO; ECKER, 2004).

As mudanças morfológicas apresentadas por plântulas crescidas no escuro na presença de etileno (Resposta Tríplice), junto a análises genéticas e moleculares, permitiram a identificação de muitos componentes-chave da rota de sinalização do etileno (*ETR1*, *ETR2*, *EIN4*, *ERS1*, *ERS2* → *CTR1* → *EIN2* → *EIN3* → *ERF*) que vão desde a percepção do etileno até à regulação transcricional.

Com a criação do banco de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) CAFEST, gerado pelo sequenciamento do transcriptoma do cafeeiro (Vieira et al., 2006), tornou-se possível a realização de buscas por sequências formadoras de genes relacionados as mais diversas características de interesse, permitindo também a determinação dos possíveis tecidos em que estes genes são expressos, além de uma estimativa desta expressão.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização *in silico* dos prováveis componentes das rotas de biossíntese e sinalização do etileno em café (*Coffea arabica*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Busca no banco de dados CAFEST

A identificação dos prováveis genes constituintes da rota de biossíntese (ACS ACO) e sinalização do etileno (*ETR1*, *ETR2*, *EIN4*, *ERS1*, *ERS2* → *CTR1* → *EIN2* → *EIN3* → *ERF*) do café, foi feita a partir de buscas no banco de dados CAFEST (<http://bioinfo04.ibi.unicamp.br>), através dos critérios de busca por palavras-chave e similaridade [(tblastn) utilizando-se de sequências homólogas publicadas no banco de dados público *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov)]. As sequências apresentando similaridade confiável ($e\text{-value} < 10^{-4}$) foram depositadas no sistema de gerenciamento e manipulação de sequências, o *GeneProject*, e clusterizadas, utilizando o programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). Após a clusterização, os contigs e singlets selecionados foram anotados e comparados contra bancos de dados públicos de proteínas para se obter maiores informações sobre as prováveis proteínas codificadas por estas sequências e eliminação de sequências falsas. Após esta etapa, as sequências selecionadas foram ainda utilizadas como moldes para uma nova procura no próprio banco de dados CAFEST, processo denominado de saturação, com intuito de estender ou completar estas sequências, ou mesmo encontrar novas sequências.

2.2 Análise filogenética

A caracterização dos prováveis genes formadores da rota de biossíntese e sinalização do etileno em café foi realizada por meio de alinhamentos múltiplos entre as sequências de proteínas codificadas pelos *contigs* e *singlets* selecionados no CAFEST e sequências homólogas publicadas, encontradas no NCBI. As ORFs (*Open Reading Frames*) das sequências selecionadas foram

obtidas pela ferramenta *ORFinder*, encontrada no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov), e as sequências de proteínas codificadas pelas mesmas foram obtidas a partir da ferramenta *translate*, encontrada no banco de proteínas ExPASy (<http://www.expasy.ch>). A partir de alinhamentos múltiplos, feitos pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), utilizando parâmetros padrão (*default*), a análise de similaridade entre estas sequências de proteínas foi feita pela geração árvores filogenéticas pelo programa MEGA4, versão 4.0 (TAMURA et al., 2007), utilizando o modelo de comparação *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), com o método de distância-P e supressão *pair-wise*. A validade das árvores quanto à distância filogenética dos *clusters*, pôde ser medida pelo teste probabilístico de *bootstraps*, com 1.000 repetições (SITNIKOVA et al., 1995).

2.3 Análise da expressão *in silico*

As análises de expressão *in silico* foram realizadas a partir da construção de Northern Eletrônicos, gerados a partir da construção de uma tabela contendo o número de vezes que cada *read* formador de um *contig* apareceu expresso em cada biblioteca. Esses dados foram então normalizados para obtenção do grau de expressão exata dos prováveis genes em cada biblioteca. O procedimento para a normalização consistiu em multiplicar cada *read* pela razão entre o número total de *reads* de todas as bibliotecas e o número de *reads* da biblioteca em que ele aparecia expresso. As sequências foram reorganizadas de acordo com os locais de expressão e seus dados foram lançados em uma matriz relacionando genes e bibliotecas. Os *contigs* e bibliotecas foram agrupados por *hierachical clustering* utilizando-se os programas *Cluster* e *TreeView* (EISEN et al., 1999). Os resultados de expressão foram apresentados em uma escala do preto ao vermelho, onde quanto mais próximo à cor vermelha maior o grau de expressão.

3. RESULTADOS

A busca por possíveis homólogos ao gene *ACS* no banco de dados CAFEST gerou um total de cinco *reads*, clusterizados em um *contig* (CaACS1) e três *singlets* (CaACS2, CaACS3 e CaACS4), onde ‘Ca’ significa *Coffea arabica*. O *contig* CaACS1 foi formado por dois *reads*, possuindo um ORF de 366pb, codificando para uma proteína de 121 aminoácidos. Já os *singlets* CaACS2, CaACS3 e CaACS4, apresentaram ORFs de 693, 372 e 288pb, codificando para proteínas de 231, 123 e 95 aminoácidos, respectivamente. As proteínas codificadas por estas sequências, apesar de apresentarem alta identidade para com ACSs de outras espécies (Tabela 1), se alinharam em porções diferentes dessas proteínas, não sendo possível gerar uma árvore filogenética envolvendo as quatro sequências encontradas neste trabalho e as ACSs de outras espécies (Figura 4). A análise da árvore filogenética envolvendo CaACS2, CaACS3 e ACS de outras espécies mostra que estas enzimas podem ser divididas em três tipos principais (YOSHIDA et al., 2005), sendo que CaACS2 e CaACS3 se mostraram mais similares às ACSs do tipo 1. O singlet CaACS4 agrupou juntamente com as ACS do tipo 2 e o *contig* CaACS1 não agrupou em nenhum dos três tipos, provavelmente devido à sua curta sequência (APÊNDICE A).

O *Northern* eletrônico mostrou que CaACS1, CaACS2, CaACS3 e CaACS4 foram expressos em tecidos vegetativos e reprodutivos, com destaque para as flores, onde foi detectada a expressão em diferentes estádios de desenvolvimento.

A busca por possíveis homólogos ao gene *ACO* no banco de dados CAFEST gerou um total de 126 *reads* relacionados a esse gene e, a análise destas sequências permitiu a identificação de pelo menos três possíveis genes *ACO* nesta base de dados, os quais foram denominados de CaACO1, CaACO2 e

CaACO3. CaACO1, CaACO2 e CaACO3 apresentaram ORFs de 879, 960 e 957pb, codificando para proteínas de 292, 319 e 318 aminoácidos, respectivamente. Essas proteínas apresentaram uma identidade entre si de 50 a 82%, e uma identidade de até 86,5% quando comparadas com ACOs de outras espécies, como encontrada entre CaACO3 e AcACO (Tabela 1). A análise filogenética evidenciou que CaACO2 e CaACO3 estão mais proximamente relacionadas com proteínas ACO encontradas em outras espécies, enquanto que CaACO1 apresentou uma maior divergência para com estas sequências (valores de identidade inferiores a 50%) e foi agrupada em um clado diferente, juntamente com CmACO2, pela qual compartilha 63% de identidade.

O *Northern* eletrônico mostrou que juntos, CaACO1, CaACO2 e CaACO3 foram expressos em 23 bibliotecas diferentes, as quais envolvem diferentes agentes estressores, estádios de desenvolvimento e tecidos, com destaque para CaACO3 que apresentou expressão elevada nas bibliotecas de frutos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 5).

TABELA 1 Comparação das sequências relacionadas às rotas de biossíntese e sinalização do etileno, encontradas no banco de dados CAFEST, com o melhor alinhamento gerado a partir do blastp destas sequências na base de dados do NCBI.

Categoria	Contig/aa	blastp	E-value	Identidade	Positivos
ACS	CaACS1/121	AAQ88100.1 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase [<i>Rosa hybrid cultivar</i>]. 480aa	2E-53	95/121 (79%)	109/121 (90%)
	CaACS2/231	AAR99392.1 ACC synthase ACS3a [<i>Nicotiana attenuata</i>]. 484aa	7E-103	173/215 (80%)	196/215 (92%)
	CaACS3/123	BAA92351.1 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase [<i>Malus x domestica</i>]. 487aa	2E-54	96/119 (81%)	109/119 (92%)
	CaACS4/95	BAA31137.1 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase [<i>Actinidia deliciosa</i>]. 467aa	1E-31	67/95 (71%)	77/95 (81%)
ACO	CaACO1/292	EEF48098.1 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, putative [<i>Ricinus communis</i>]. 308aa	8E-117	205/289 (71%)	231/289 (80%)

CaACO2/319	002275341.1	hypothetical protein isoform 2 [<i>Vitis vinifera</i>]. 326aa	3E-165	276/319 (87%)	300/319 (94%)
------------	-------------	---	--------	---------------	---------------

Tabela 1 Conclusão

Categoria	Contig/aa	blastp	E-value	Identidade	Positivos
ACO	CaACO3/318	P31237.1 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase [<i>Actinidia deliciosa</i>]. 319	8E-165	276/319 (87%)	302/319 (95%)
ETR-like	CaETR1/615	ABL63474.1 ethylene receptor isoform 1 [<i>Coffea canephora</i>]. 740aa	0.0	594/614 (96%)	601/614 (97%)
	CaERS1/246	ABL86672.1 ethylene response sensor 1. [<i>Gossypium barbadense</i>]. 441aa	2E-90	164/242 (68%)	204/242 (84%)
	CaERT4/262	AAQ90152.1 putative ethylene receptor protein [<i>Solanum tuberosum</i>]. 349aa	8E-115	205/258 (79%)	230/258 (89%)
EIN2	CaEIN2a/483	ABD65477.1 ethylene signaling protein [<i>Solanum lycopersicum</i>]. 1316aa	6E-158	288/474 (60%)	361/474 (76%)
	CaEIN2b/243	AAR08678.1 EIN2 [<i>Petunia x hybrida</i>]. 1310aa	2E-106	185/242 (76%)	211/242 (87%)
EIN3	CaEIN3/644	AAP03998.1 EIL2 [<i>Nicotiana tabacum</i>]. 616aa	0.0	493/636 (77%)	557/636 (87%)
ERF	CaERF1/264	Q40479.1 ERF2 [<i>Nicotiana tabacum</i>]. 233aa	3E-88	175/264 (66%)	199/264 (75%)
	CaERF2/304	XP_002313851.1 AP2/ERF domain-containing transcription factor [<i>Populus trichocarpa</i>]. 266aa	3E-49	128/290 (44%)	172/290 (59%)
	CaERF3/249	ERF-like transcription factor [<i>Coffea canephora</i>]. 329aa	2E-102	175/178 (98%)	177/178 (99%)
	CaERF4/218	AP2/EREBP transcription factor ERF-2 [<i>Gossypium hirsutum</i>]. 255aa	8E-43	109/225 (48%)	135/225 (60%)
	CaERF5/193	O04681.1 Pathogenesis-related genes transcriptional activator PTI5 [<i>Solanum lycopersicum</i>]. 161aa	2E-49	108/162 (66%)	119/162 (73%)
	CaERF6/404	AAP40022.1 callus-expressing factor [<i>Nicotiana tabacum</i>]. 387aa	2E-132	257/407 (63%)	304/407 (74%)
	CaERF7/387	AAP40022.1 callus-expressing factor [<i>Nicotiana tabacum</i>]. 387aa	2E-112	225/392 (57%)	276/392 (70%)
	CaERF8/222	Q9LW49.1 Ethylene-responsive transcription factor 4 [<i>Nicotiana sylvestris</i>]. 227aa	7E-55	139/237 (58%)	160/237 (67%)
	CaERF9/158	Q9SXS8.1 Ethylene-responsive transcription factor 3 [<i>Nicotiana tabacum</i>]. 225aa	7E-35	113/157 (71%)	120/157 (76%)
	CaERF10/165	XP_002300797.1 AP2/ERF domain-containing transcription factor [<i>Populus trichocarpa</i>]. 179aa	4E-33	81/138 (58%)	94/138 (68%)
	CaERF11/282	CAN66025.1 hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]. 421aa	6E-46	125/190 (65%)	144/190 (75%)
	CaERF12/252	BAF75651.1 transcription factor DcERF1 [<i>Daucus carota</i>]. 296aa	2E-50	120/246 (48%)	158/246 (64%)
	CaERF13/226	BAF75651.1 transcription factor DcERF1 [<i>Daucus carota</i>]. 296aa	1E-45	107/206 (51%)	137/206 (66%)
	CaERF14/275	XP_002325634.1 AP2/ERF domain-containing transcription factor	3E-44	131/281 (46%)	160/281 (56%)

[*Populus trichocarpa*]. 313aa

CaERF15/158	CBI15759.1	unnamed	protein	5E-42	90/128	103/128
	product	[<i>Vitis vinifera</i>].			(70%)	(80%)

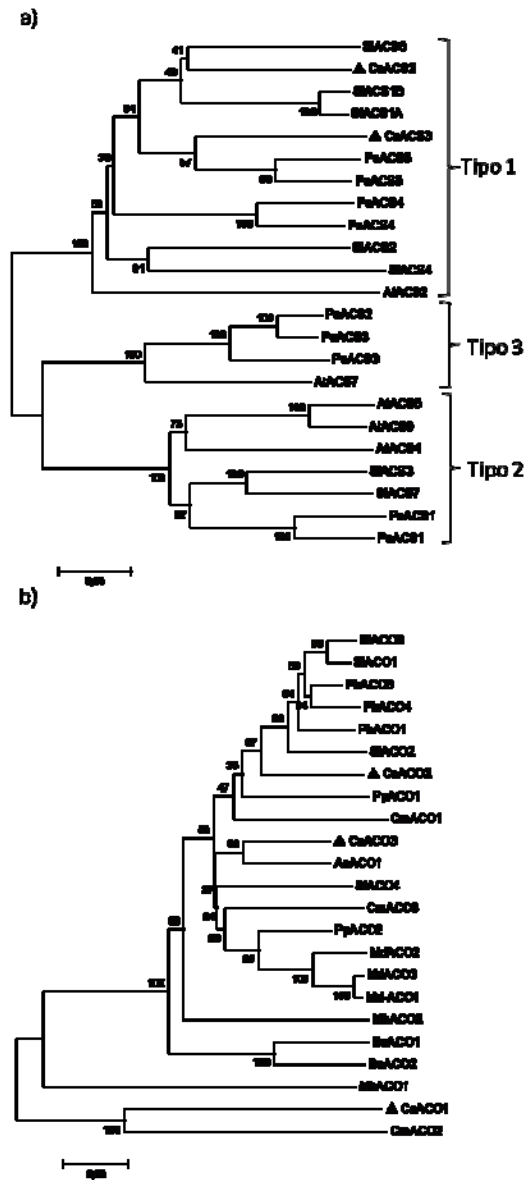


FIGURA 4 Análise filogenética envolvendo as prováveis ACSs (a) e ACOs (b) encontradas no banco de dados CAFEST (▲) e sequências homólogas destes genes obtidas na base de dados do NCBI. As árvores foram geradas

peelo programa MEGA4, a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos pelo programa ClustalW. Valores de *bootstrap* de 1.000 repetições foram utilizados para se acessar a validade das árvores. As sequências das outras espécies e seus respectivos números de acesso são como segue: (a) *Arabidopsis thaliana* [AtACS2(Q06402), AtACS4(NP179866), AtACS5(AAG50098), AtACS7(AAG48754), AtACS9(AAG48755)]; *Solanum lycopersicon* [SIACS1A(AAF97614), SIACS1B(AAF97615), SIACS2(CAA41855), SIACS3(AAB48945), SIACS4(AAA03164), SIACS6(BAA34923), SIACS7(AAC32317)]; *Pyrus comunis* [PcACS1(X87112), PcACS2(AF386519), PcACS3(AY388988), PcACS4(AF386518), PcACS5(AF386523)]; *Prunus salicina* [PsACS1(ABW03081), PsACS3(ABW03082), PsACS4(ABW03085), PsACS5(ABW03086)]; (b) *Solanum lycopersicon* [SIACO1(P05116), SIACO2(P07920), SIACO3(P24157), SIACO4(BAA34924)]; *Petunia x hybrida* [PhACO1(Q08506), PhACO3(Q08507), PhACO4(Q08508)]; *Prunus persica* [PpACO1(AAF36483), PpACO2(AAF36484)]; *Cucumis melo* [CmACO1(Q04644), CmACO2(Q43419), CmACO3(P54847)]; *Actinidia deliciosa* [AcACO1()]; *Malus domestica* [MdACO1(ABA03057), MdACO2(ABD95988), MdACO3(AAC36461)]; *Brassica oleracea* [BoACO1(Q43404), BoACO2(Q43405)]; *Musa acuminata* [MhACO1(AF0304), MhACO2(AAR00930)]

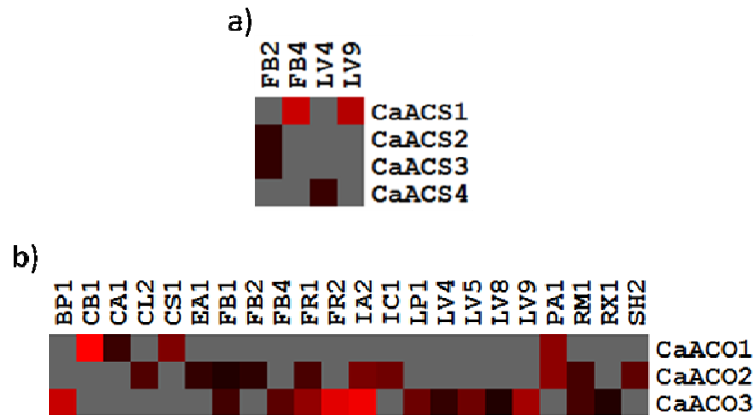


FIGURA 5 Perfil de expressão *in silico* das prováveis ACSs (a) e ACOs (b) encontradas no banco de dados CAFEST. O número normalizado de *reads* para os transcritos de cada biblioteca estão representados na escala de preto ao vermelho, onde quanto mais próximo ao vermelho maior a expressão. Os *contigs* e *singlets* estão representados nas linhas e as bibliotecas como colunas. As bibliotecas são como seguem (VIEIRA et al., 2006): células em

suspensão tratadas com acibenzolar-S-metil (BP1); células em suspensão tratadas com acibenzolar-S-methyl e brassinoesteróides (CB1); calos não embriogênicos com e sem 2,4D (CA1, IC1); hipocótilos tratados com acibenzolar-S-metil (CL2); células em suspensão tratadas com NaCl (CS1); calo embriogênico (EA1, IA2); botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento (FB1, FB2, FB4); botões florais + “*pinhead*” frutos + frutos em diferentes estádios (FR1, FR2); Plântulas e folhas tratadas com ácido aracdônico (LP1); folhas jovens de ramos ortotrópicos (LV4, LV5); folhas maduras de ramos plagiotrópicos (LV8 e LV9); calo embriogênico primário (PA1); folhas infectadas com lagartas e ferrugem (RM1); ramos infectados com *Xylella* spp. (RX1); plantas estressadas por déficit hídrico (*Pool* de tecidos) (SH2)

A busca por receptores da rota de sinalização do etileno no banco de dados CAFEST gerou um total de 14 *reads*, os quais foram clusterizados em um *contig* (CaETR1) e dois *singlets* CaERS1 e CaETR4. A análise de domínios conservados demonstrou que a proteína codificada pelo *contig* CaETR1 apresenta todos os domínios característicos dos receptores de etileno já identificados em outras espécies, como o domínio sensor localizados na porção N-terminal, o domínio GAF e o domínio histidina-quinase. Já os *singlets* CaERS1 e CaETR4 codificam para possíveis fragmentos de receptores de etileno, apresentando similaridade com os domínios GAF e histidina-quinase.

O *contig* CaETR1 apresentou um total de 12 *reads*, e um ORF (*Open Reading Frame*) de 1.848 pb, codificando para uma proteína de 615 aminoácidos. Já os *singlets* CaERS1 e CaETR4 apresentaram ORFs de 741pb e 789pb, codificando para proteínas com 246 e 262 aminoácidos, respectivamente. CaETR1 e CaERS1 apresentaram uma maior similaridade para com os receptores da subfamília *ETR1-like*, enquanto que CaETR4 com a subfamília *ETR2-like* (Figura 6) (Tabela 1). Comparados com receptores presentes na árvore filogenética (Figura 6), ao nível de aminoácidos, CaETR1 e CaERS1 apresentaram identidades variando de 70% (AtERS1) a 96% (CcETR1) e de 62,3 (LeETR2) a 65,6 (LeETR3), respectivamente. Já a CaETR4 apresentou

uma identidade variando de 52% (AtERS2) a 78% (LeETR4) com os receptores da subfamília ETR2-*like*.

Os resultados encontrados no *Northern* Eletrônico mostram que o *contig* CaETR1 foi expresso em seis bibliotecas diferentes, as quais envolvem diferentes tecidos como folhas e sementes, estádios de desenvolvimento, folhas jovens e maduras, e condições de estresse, como estresse hídrico e estresse causado por alumínio, onde também foi detectada a expressão de CaERS1. CaETR4 mostrou-se expresso somente na biblioteca de frutos (Figura 7).

Com relação ao gene CTR1, não foi possível identificar conclusivamente possíveis homólogos a este gene no CAFEST, sugerindo uma sub-representação ou um erro de montagem para este membro da rota de sinalização do etileno nesta base de dados, tendo em vista o alto grau de conservação deste elemento em outras espécies. Apesar de terem sido encontradas sequências com similaridade de até 70% para com a porção C-terminal de CTR1 descritas em outras espécies, isto não é suficiente para se propor a identificação de um possível homólogo a este gene em café. Isto se deve ao fato da porção C-terminal das proteínas CTR1 se mostrarem similares às proteínas quinase do tipo serina-treonina quinase, que apresentam grande conservação de seu domínio catalítico entre seus membros, e forma uma das três subfamílias que compõem uma das maiores famílias de proteínas nos vegetais, as família das proteínas-quinase (CHEVALIER; WALKER, 2004).

A busca por homólogos ao gene *EIN2*, gerou um total de 10 *reads*, os quais foram clusterizados em dois *contigs*, CaEIN2a e CaEIN2b. As proteínas codificadas por estes *contigs* demonstraram similaridade à porção C-terminal de *EIN2* descritas em outras espécies, sendo que esta porção não apresenta similaridade a nenhum outro domínio descrito até o momento, mas se mostra similar somente entre as proteínas *EIN2* já caracterizadas. CaEIN2a foi formado a partir de seis *reads*, apresentando um ORF de 1452pb, codificando para uma

proteína de 483 aminoácidos. CaEIN2b apresentou quatro *reads*, um ORF de 729pb, codificando para uma proteína de 243 aminoácidos. Estes fragmentos demonstraram uma alta identidade entre si (96%), e quando comparadas às proteínas EIN2 presentes na árvore filogenética (Figura 6) esta identidade foi de até 62% (LeEIN2) para CaEIN2a, e de até 75% (PhEIN2), para CaEIN2b (Tabela 1).

O *Northern* eletrônico mostrou que CaEIN2a e CaEIN2b foram expressos em cinco e três bibliotecas, respectivamente, em condições nas quais o etileno esteja possivelmente envolvido, como na resposta ao estresse causado por patógenos (RM1), além do florescimento (FB1) e maturação do fruto (FR1).

De acordo com os dados obtidos no banco de dados CAFEST, foram encontrados 53 *reads* relacionados aos fatores de transcrição EIN3, os quais foram clusterizados em quatro *contigs*. Estes *contigs* se mostraram basicamente idênticos, porém a análise de domínios conservados mostrou que somente o *contig* CaEIN3 apresentou todos os domínios característicos desta família de fatores de transcrição (CHAO et al., 1997), sendo selecionado para as análises posteriores.

O *contig* C4 foi formado a partir de 29 *reads*, apresentando um ORF de 1935pb, codificando para uma proteína prevista em conter 644 aminoácidos, a qual demonstrou uma identidade variando de 50% (MaEIL4) a 77% (NtEIL2), comparada com as proteínas EIN3 presentes na árvore filogenética (Figura 6, Tabela 1). A porção N-terminal destas sequências mostrou um alto grau de conservação, com os primeiros 300 aminoácidos de CaEIN3 possuindo uma identidade de 90%, 84,6%, e 76,6% com NtEIL2, AtEIN3 e MaEIL4, respectivamente.

O *Northern* Eletrônico mostrou que CaEIN3 foi expresso em 10 bibliotecas diferentes, envolvendo condições de estresse, biótico e abiótico,

diferentes tecidos como folhas jovens, maduras e sementes, além de flores e calos embriogênicos.

Com relação aos fatores de transcrição da família ERF foram encontrados um total de 166 *reads* os quais, após clusterização, formaram 21 *contigs* e nove *singlets*, com todas sequências apresentando o domínio ERF completo ou parcialmente completo, o qual caracteriza estes fatores de transcrição. De acordo com a identidade de aminoácidos dentro do domínio ERF, essas sequências podem ser separadas entre duas subfamílias, as quais formam a família ERF (SAKUMA et al., 2002): oito *contigs* e seis *singlets* mostraram pertencer à subfamília CBF/DREB (*C-repeat/DRE-binding factor/dehydration-responsive element binding proteins*), a qual não está envolvida na rota de sinalização do etileno; 13 *contigs* e três *singlets* mostraram pertencer à subfamília ERF, a qual participa da rota de sinalização do etileno, sendo estas sequências analisadas neste trabalho.

O alinhamento múltiplo entre os prováveis ERFs de *C. arabica* (Ca-ERFs) e ERFs descritos em outras espécies, permitiu a constatação de diversos motivos de similaridade estrutural comumente associados aos fatores de transcrição da subfamília ERF, permitindo a classificação dos Ca-ERFs nas quatro classes ERF previamente descritas (Figura 6) (FUJIMOTO et al., 2000; TOURNIER et al., 2003). A comparação do domínio ERF dos Ca-ERFs e o domínio ERF de ERFs de outras espécies mostrou um alto grau de identidade (88-98%), no entanto, a comparação envolvendo as sequências completas dessas proteínas mostrou uma considerável divergência (43-98%) entre as mesmas, indicando um baixo grau de conservação fora do domínio ERF (Tabela 1). O *Northern* eletrônico mostrou que as Ca-ERFs estão envolvidas em um grande número de processos, sendo detectada a expressão desses genes em 24 bibliotecas diferentes, as quais compreendem diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições de estresse (Figura 7).

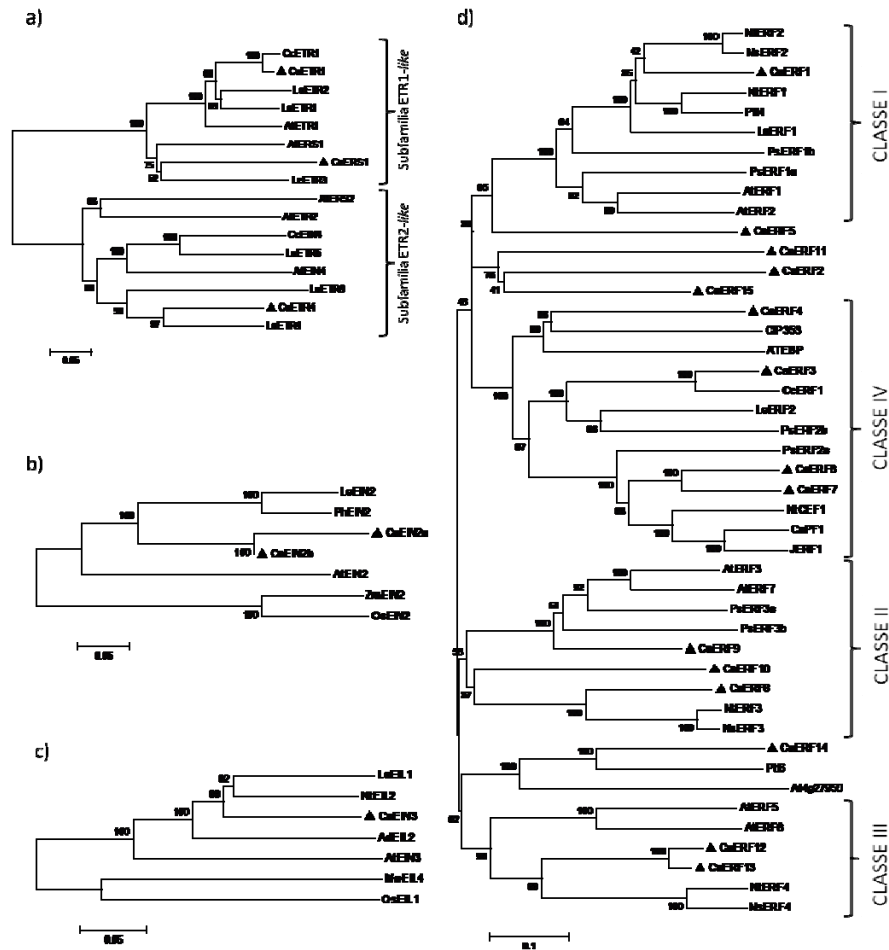


FIGURA 6 Análise filogenética envolvendo os prováveis elementos da rota da sinalização do etileno encontrados no banco de dados CAFEST (▲) e sequências homólogas, obtidas na base de dados do NCBI, relacionadas a: (a) receptores de etileno, (b) proteínas EIN2, (c) fatores de transcrição EIN3 e (d) fatores de transcrição ERF. As árvores foram geradas pelo programa MEGA4, a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos pelo programa ClustalW. Valores de *bootstrap* de 1.000 repetições foram utilizados para se acessar a validade das árvores. As sequências das outras espécies e seus respectivos números de acesso são como segue: (a) *Arabidopsis thaliana* [AtETR1(P49333), AtERS1(Q38846), AtEIN4(Q9ZTP3), AtERS2(P93825), AtETR2(O82429)]; *Coffea*

canephora [CcETR1(ABL63471), CcEIN4(ABZ89180.1)]. *Lycopersicon esculentum* [LeETR1(Q41342), LeETR2(O49187), LeETR3(Q41341), LeETR4(Q9XET8), LeETR5(Q9XET9), LeETR6(Q8RY04)] (b) *A. thaliana* [AtEIN2(AAD41076)], *Lycopersicon esculentum* [LeEIN2(AAZ95507)], *Petunia x hybrida* [PhEIN2(AAR08678)], *Zea mays* [ZmEIN2(AAR25570)], *Oryza sativa* [OsEIN2(AAQ95276)]. (c) *L. esculentum* [LeEIL1(AAK58857)], *Nicotiana tabacum* [NtEIL2(AAP03998)], *A. deliciosa* [AdEIL2(ACJ70675)], *A. thaliana* [AtEIN3(O24606)], *Musa acuminata* [MaEIL4(BAF44110)], *Oryza sativa* [OsEIL1(AAZ78349)]. (d) *A. thaliana* [AtERF1(BAA32418.1), AtERF2(BAA32419.1), AtERF3(BAA32420), AtERF5(BAA32422), AtERF6(NP_567529.1), AtERF7(|NP_188666.1), AtEBP(CAA05084), At4g27950(AAT44939.1)], *L. esculentum* [LeERF1(AAO34703), LeERF2(AAO34704), JERF1(AAK95687), Pti4(AAC50047), Pti6(AAC49741.1)], *N. tabacum* [NtERF1(Q40476), NtERF2(Q40479), NtER3F(Q40477), NtERF4(Q40478), NtCEF1(AAP40022)], *N. sylvestris* [NsERF2(Q9LW50), NsERF3(Q9LW49), NsERF4(QPLW48)], *Prunus salicina* [PsERF1a(ACM49849.1), PsERF1b(ACM49848.1), PsERF3a(ACM49845.1), PsERF3b(ACM49844.1), PsERF2a(ACM49847), PsERF2b(ACM49846)], *C. canephora* [CcERF1(AAS01337)], *Solanum tuberosum* [(BAC56862.1)], *Capsicum annuum* [CaPF1(AAP72289)].

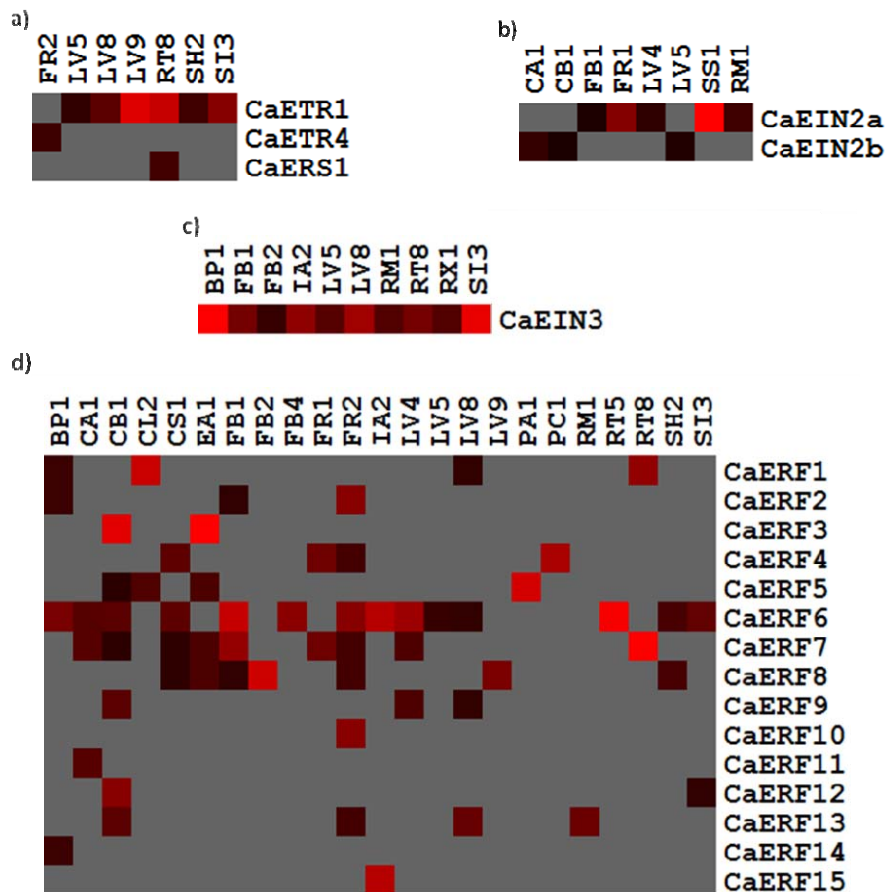


FIGURA 7 Perfil de expressão *in silico* dos prováveis membros da rota de sinalização do etileno de café: (a) receptores de etileno, (b) proteínas EIN2, (c) fatores de transcrição EIN3 e (d) fatores de transcrição ERF. O número normalizado de *reads* para os transcritos de cada biblioteca estão representados na escala de preto ao vermelho, onde quanto mais próximo ao vermelho maior a expressão. Os *contigs* e *singlets* estão representados nas linhas e as bibliotecas são como seguem (VIEIRA et al., 2006): células em suspensão tratadas com acibenzolar-S-metil (BP1); calos não embriogênicos com e sem 2,4D (CA1, PC1); suspensão de células tratadas com acibenzolar-S-methyl e brassinoesteróides (CB1); hipocótilos tratados com acibenzolar-S-metil (CL2); células em suspensão tratadas com NaCl (CS1); calo embriogênico (EA1, IA2); botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento (FB1, FB2, FB4); botões florais + “*pinhead*”

frutos + frutos em diferentes estádios (FR1, FR2); folhas jovens de ramos ortotrópicos (LV4, LV5); folhas maduras de ramos plagiotrópicos (LV8 e LV9); calo embriogênico primário (PA1); folhas infectadas com lagartas e ferrugem (RM1); raízes tratadas com acibenzolar-S-metil (RT5); células em suspensão em estresse com alumínio (RT8); ramos infectados com *Xylella* spp. (RX1); plantas estressadas por déficit hídrico (*Pool* de tecidos) (SH2); sementes em germinação (Sementes inteiras e embriões zigóticos) (SI3); plantas bem irrigadas (*Pool* de tecidos) (SS1).

4 DISCUSSÃO

4.1 Análises filogenéticas

Apesar de que algumas das sequências encontradas no banco de dados CAFEST não representarem ORFs completos, a busca por possíveis genes formadores das rotas de biossíntese e sinalização do etileno nesta base de dados mostrou-se bastante representativa, possibilitando a identificação de membros de praticamente todos os passos que compõem essas rotas.

A busca por genes relacionados à enzima ACS no banco de dados CAFEST, possibilitou a identificação de quatro sequências relacionadas a essa enzima e, apesar dos pequenos fragmentos codificados por estas sequências, a análise das mesmas possibilitou a identificação de algumas regiões conservadas presentes em ACSs de outras espécies. A partir do alinhamento múltiplo envolvendo ACSs de outras espécies e as sequências aqui encontradas, pôde ser observada a presença dos sete “boxes” conservados característicos de ACSs de outras espécies (YAMAGAMI et al., 2003; EL-SHARKAWY et al., 2008), com CaACS3 contendo os “boxes” 1 e 2, CaACS2, 3 a 6, e CaACS1 e CaACS4 apresentando o “box” 7. Em CaACS3, foi possível a identificação do aminoácido glutamato no “Box” 1, o qual está diretamente relacionado à especificidade de substrato das enzimas ACS (MCCARTHY et al., 2001). De acordo com Yoshida et al. (2005), as enzimas ACS podem ser divididas em três tipos principais de acordo com algumas características da porção C-terminal dessas proteínas. Somente o *singlet* CaACS4 possibilitou a identificação de algumas destas características, como a presença do motivo ‘WVF’ localizado imediatamente antes do motivo ‘RLSF’, os quais precedem uma curta sequência de nove resíduos ricos em aminoácidos ácidos e básicos que caracterizam as ACSs do tipo 2. De acordo com esta observação, CaACS4 se agrupou

juntamente com ACSs do tipo 2 de outras espécies (APÊNDICE A). Apesar desta classificação baseada na porção C-terminal de ACS, esta porção da proteína parece não ser essencial para a divisão dos três tipos ACS, considerando que uma árvore filogenética envolvendo somente a porção N-terminal de ACSs gerou o mesmo padrão de agrupamento encontrado na árvore filogenética envolvendo as sequências completas de ACS (APÊNDICE B). Isto corrobora para a classificação de CaACS2 e CaACS3 como membros da tipo 1.

A busca por homólogos à segunda enzima envolvida na biossíntese de etileno no CAFEST possibilitou a identificação de três possíveis ACOs (CaACO1, CaACO2 e CaACO3) nesta base de dados. O alinhamento destas sequências com ACOs de outras espécies permitiu a identificação dos 12 resíduos de aminoácidos (P4, A27, G32, H39, H186, D188, L204, Q205, G227, H243, R253, S255) característicos da superfamília Ferro-Ascorbato Oxidase (TANG et al., 1993; LIN et al., 1997), em todas sequências encontradas. De maneira semelhante às ACOs de outras espécies, algumas das sequências encontradas apresentaram uma alta identidade entre si, como entre CaACO2 e CaACO3 com 82% de identidade, e também com ACOs de outras espécies com valores de identidade de até 86,5%, como entre CaACO3 e AcACO, sendo isto evidenciado na árvore filogenética (Figura 4). Apesar da elevada identidade encontrada entre CaACO3 e CaACO2, suas sequências 3' e 5' UTR mostraram-se únicas. Já CaACO1 apresentou uma menor similaridade quando comparado com CaACO2, CaACO3 e ACOs de outras espécies, mas mostrou-se similar a CmACO2, sendo essas sequências agrupadas em um clado diferente, como observado na árvore filogenética (Figura 4).

Com relação aos receptores de etileno, trabalhos anteriores em *arabidopsis* indicaram a presença de pelo menos cinco receptores, os quais de acordo com suas similaridades estruturais e de sequência, foram divididos entre as subfamílias *ETR1-like* (*ETR1* e *ERS1*), e *ETR2-like* (*ETR2*, *ERS2* e *EIN4*)

(HUA et al., 1998). De forma similar aos receptores da subfamília *ETR1-like*, CaETR1 apresentou os três domínios transmembrana na porção N-terminal, os quais se acredita que adotarem uma estrutura em dobra que cria uma área hidrofóbica na qual o etileno se liga, além de conter todos os aminoácidos tidos como primordiais para possibilitar essa ligação (WANG et al., 2006). Além disso, CaETR1 apresentou o domínio histidina quinase totalmente conservado, contendo todos os cinco subdomínios (H, N, G1, F, G2) necessários para a atividade histidina quinase (WOLANIN et al., 2002), e que são característicos dos receptores da subfamília *ETR1-like*. Apesar de não apresentar o domínio receptor na sua porção C-terminal, como observado para os receptores do tipo ERS1 de arábido, a árvore filogenética mostrou que CaETR1 está mais proximamente relacionado com os genes do tipo ETR1 de arábido, indicando que CaETR1 possa ser um homólogo a esse gene. De acordo com isso, Bustamante-Porras et al. (2007) identificaram a presença de três receptores de etileno em *Coffea canephora*, CcETR1, CcETR2 e CcEIN4, sendo que CaETR1 apresentou uma identidade de 96% com CcETR1. Já o *singlet* CaERS1 também apresentou maior similaridade à subfamília *ETR1-like*, codificando para um fragmento do domínio histidina-quinase conservado, característico dessa subfamília. CaERS1 demonstrou uma maior identidade ao receptor do tipo ERS1 (65%) de arábido, comparado ao ETR1 (61%) desta mesma espécie, o que junto com o resultado obtido na árvore filogenética (Figura 6), corroboram para a sua classificação como um possível homólogo ao gene ERS1 de arábido. Com relação ao *singlet* CaETR4, esse se mostrou mais similar aos receptores da subfamília *ETR2-like* que, diferentemente dos receptores da subfamília *ETR1-like*, se caracterizam por apresentar quatro domínios transmembrana em suas porções N-terminal e um domínio histidina-quinase degenerado, sendo sugerido por alguns autores que estes receptores não apresentam atividade histidina-quinase, mas sim atividade serina/treonina quinase

(MOUSSATCHE; KLEE, 2004). O fragmento codificado por CaETR4 representa parte do domínio histidina-quinase característico desta subfamília, e possivelmente representa um homólogo ao gene *LeETR4*, pelo qual apresentou uma identidade de 78%.

Com relação ao gene *EIN2*, os resultados aqui encontrados mostram que CaEIN2a e CaEIN2b codificam para fragmentos relacionados à porção C-terminal de EIN2 de outras espécies. CaEIN2a e CaEIN2b apresentaram elevada similaridade entre si e a proteínas EIN2 de outras espécies, como tomate e petúnia (Figura 6), e, apesar destas sequências representarem fragmentos de pequena extensão, visto que as proteínas EIN2 possuem em média cerca de 1.300 aminoácidos, o fato da porção C-terminal de EIN2 não apresentar homologia a nenhum outro domínio descrito até o momento, sugere que as sequências aqui encontradas realmente constituam possíveis homólogos para este gene da rota de sinalização do etileno em café. De acordo com Alonso et al. (1999), a porção C-terminal de EIN2 é a responsável pela transmissão do sinal de etileno para os elementos subsequentes da rota, visto que sua superexpressão foi capaz de desencadear uma resposta constitutiva ao etileno tanto em plântulas como em plantas adultas.

Quanto aos fatores de transcrição da família EIN3, a análise de domínios conservados demonstrou que o *contig* CaEIN3 codifica para uma proteína contendo todos os domínios característicos desta família (CHAO et al., 1997). Os altos valores de *bootstrap* corroboram para grande similaridade entre CaEIN3 com fatores de transcrição EIN3 identificados em outras espécies, sendo que a árvore filogenética mostra uma clara separação entre os fatores de transcrição EIN3 de monocotiledôneas e dicotiledôneas, o que também foi encontrado por Mbeguie'-A-Mbeguie et al. (2008), onde foi demonstrado que todas as proteínas EIN3-like (EILs) identificadas nas monocotiledôneas arroz e banana foram abrigadas em *cluster* separado às sequências de dicotiledôneas, à

exceção das proteínas EIL2 e EIL3 de *Arabidopsis*. A família de fatores de transcrição EIN3 geralmente é formada por mais de um membro, como em *Arabidopsis*, tomate e tabaco que apresentam seis, quatro e quatro EILs, respectivamente, o que sugere que outros possíveis membros, além de CaEIN3 estejam presentes em café, mas não foram identificados no CAFEST.

Com relação aos fatores de transcrição da família ERF, a distinção entre os membros pertencentes à subfamília ERF e à subfamília CBF/DREB, foi feita a partir da análise de resíduos conservados de aminoácidos dentro do domínio ERF. De acordo com Sakuma et al. (2002), os aminoácidos localizados nas posições 13 e 18 do domínio ERF correspondem à valina e ao ácido glutâmico nos fatores de transcrição CBF/DREB e à alanina e ao ácido aspártico nos fatores de transcrição ERF, sendo estes aminoácidos essenciais na interação com seus elementos-cis, DRE/CRT (5'-TACCGACAT-3'/5'-TGGCCGAC-3') e GCC-box (5'-AGCCGCC-3'), respectivamente. Somente um subgrupo da subfamília ERF está envolvido nas respostas ao etileno (OHMETAKAGI; SHINSHI, 1995).

A subfamília ERF é composta por quatro classes as quais se diferenciam de acordo com a identidade de aminoácidos dentro do domínio ERF e, outros fatores como posição do domínio ERF ao longo da proteína, presença e posição de domínios ácidos e motivos que possivelmente sirvam como sinais de localização nuclear, também são utilizados na distinção destas classes (FUJIMOTO et al., 2000; TOURNIER et al., 2003). O alinhamento e a análise filogenética das sequências encontradas nesse trabalho e ERFs de outras espécies, possibilitaram a alocação de algumas destas sequências nas quatro diferentes classes de proteínas ERF previamente descritas (Figura 6) (FUJIMOTO et al., 2000; TOURNIER et al., 2003).

O *contig* CaERF1 foi classificado na classe I das proteínas ERF (Figura 6) (FUJIMOTO et al., 2000; TOURNIER et al., 2003) e, de forma semelhante

aos outros membros desta classe, a proteína codificada por CaERF1 também apresentou um domínio ERF localizado próximo à sua região central, além de um domínio N-terminal ácido e um motivo NLS (*Nuclear Localization Signal*) situados na sua porção C-terminal.

As proteínas codificadas pelos *contigs* CaERF8, CaERF9 e CaERF10 foram classificadas na classe II das proteínas ERF (Figura 6) (FUJIMOTO et al., 2000; TOURNIER et al., 2003), as quais apresentam um domínio ERF localizado na porção N-terminal de suas sequências, um motivo NLS dentro do domínio ERF, além de um domínio ácido e um motivo repressor EAR (*Associated Amphiphilic Repression*) (OHTA et al., 2001) nas suas porções C-terminal. De maneira similar, CaERF8, CaERF9 e CaERF10 também apresentaram o domínio ERF, juntamente com o NLS, na porção N-terminal de suas sequências, entretanto somente a proteína CaERF8 apresentou-se completa, permitindo a constatação da presença do domínio ácido e do motivo EAR em sua porção C-terminal.

Os *contigs* CaERF12 e CaERF13 codificam para proteínas classificadas na classe III (Figura 6) (FUJIMOTO et al., 2000; TOURNIER et al., 2003), cujos membros são caracterizados por conterem um domínio ERF localizado em torno da porção central de suas proteínas, apresentando também um domínio ácido em ambas as porções N e C-terminal, além de um segmento de oito aminoácidos (PXXSPXSP, onde X representa qualquer aminoácido) na porção C-terminal, os quais possivelmente constituem um alvo de proteínas MAP quinase (PEARSON; KEMP, 1991; FUJIMOTO et al., 2000). CaERF12 e CaERF13 apresentaram o domínio ERF e o domínio ácido N-terminal localizados de maneira similar às proteínas da classe III, no entanto suas curtas sequências não permitiram a observação do domínio ácido C-terminal nem do alvo de proteínas quinase, sugerindo que estas sequências não estejam completas.

Com relação à classe IV das proteínas ERF (Figura 6) (FUJIMOTO et al., 2000; TOURNIER et al., 2003), os *contigs* CaERF3, CaERF4, CaERF6, e CaERF7 mostraram codificar para proteínas com maior similaridade a esta classe destes fatores de transcrição, os quais apresentam um domínio ERF próximo à porção N-terminal e um motivo NLS localizado logo antes deste domínio. Além disso, um motivo [MCGGAI/L] localizado na porção N-terminal e de função desconhecida, está presente em todas as proteínas desta classe (TOURNIER et al., 2003). Todas as sequências encontradas neste trabalho apresentaram estas características mencionadas.

Os *contigs* CaERF2, CaERF5 e CaERF11 e os *singlets* CaERF14 e CaERF15 se mostraram relacionados às proteínas ERF (Tabela 1 e Figura 6), no entanto, provavelmente devido às suas curtas sequências e/ou características distintas presentes nestas sequências, não foi possível a alocação destas sequências em nenhuma das quatro classes ERF.

4.2 Análises da expressão *in silico*

O perfil de expressão *in silico* exibido pelos prováveis genes que codificam para as enzimas ACS e ACO, envolvidas na biossíntese do etileno, e para diferentes elementos da rota de sinalização do etileno, permitiu a constatação de que a maioria destes genes mostraram-se expressos em diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições, e apontaram para o importante papel deste fitormônio em processos como o florescimento e maturação de frutos do cafeeiro, assim nas respostas a estresses abióticos e bióticos.

CaACS2, CaACS3, CaACO2 e CaACO3 foram expressos em bibliotecas envolvendo tecidos florais em diferentes estádios de desenvolvimento, indicando que o etileno possa apresentar um importante papel

no florescimento do café. Estudos em *arabidopsis* demonstraram que o etileno está diretamente relacionado com o controle da transição da fase vegetativa para a reprodutiva, através da regulação de genes responsáveis pela identidade dos meristemas florais, via proteínas DELLA (ACHARD et al., 2007). Neste trabalho foi observado que plantas apresentando uma resposta constitutiva para o etileno (mutantes para o gene *ctr1*) apresentaram níveis reduzidos de giberelinas ativas, diminuindo a inativação das proteínas DELLA e causando um atraso no florescimento, tendo em vista que estas proteínas impedem a ativação dos genes *LEAFY (LFY)* e *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION CONSTANS 1 (SOC1)*. Além da expressão destes genes relacionados à biossíntese do etileno, possíveis genes pertencentes à rota de sinalização do etileno também apresentaram expressão em tecidos florais, como *CaEIN2a*, *CaEIN3*, *CaERF2*, *CaERF6*, *CaERF7* e *CaERF8*, corroborando para ação do etileno durante o florescimento do cafeeiro.

Com relação à maturação de frutos, como já descrito neste trabalho, sabe-se da importância que o etileno apresenta na maturação dos frutos climatéricos e, a detecção da expressão de *CaACO2* e *CaACO3* em bibliotecas de frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, indica que o etileno possa apresentar um importante papel na maturação do café. Além disso, genes que possivelmente fazem parte da rota de sinalização do etileno em café, como *CaETR4*, *CaEIN2a*, *CaERF2*, *CaERF4*, *CaERF6*, *CaERF7*, *CaERF8*, *CaERF10* e *CaERF13*, também foram expressos em bibliotecas de frutos, corroborando para este fato, tendo em vista o importante papel regulatório destes elementos durante a maturação de frutos de outras espécies (KEVANY et al., 2007; LI et al., 2007; ZHANG et al., 2009b; HU et al., 2010) como já descrito anteriormente.

A análise de expressão *in silico* dos prováveis receptores de etileno de café indicam o envolvimento do etileno em outros processos como na resposta a

estresses abióticos, como aquele causado por alumínio (Al) (RT8) e pelo déficit hídrico (SH2), e na germinação de sementes (SI3). O Al é o mineral mais abundante nos solos e se torna fitotóxico às plantas quando solubilizado a Al^{3+} sob condições ácidas. A inibição do alongamento da raiz é um dos primeiros sintomas da toxicidade causada pelo Al e é causado pelo aumento na síntese de etileno (SUN et al., 2007). A expressão de CaACO2 em SH2 está possivelmente relacionada ao fato da seca promover uma regulação positiva da biossíntese de etileno nos ramos, além de estimular o transporte de seu precursor ACC da raiz para os ramos através do xilema (SOBEIH et al., 2004). Com relação à germinação de sementes, uma das funções primordiais do etileno durante o processo germinativo, está na formação do gancho plumular, o qual promove a proteção do ápice e das folhas jovens das plântulas durante a penetração no solo (GUZMAN; ECKER, 1990). Além disso, sabe-se que em sementes cuja germinação é limitada pela presença do endosperma, como as sementes de café, a necessidade de amolecimento deste tecido se faz necessária, para consequente protrusão da radícula (SILVA et al., 2004). Assim um dos possíveis mecanismos de ação do etileno durante a germinação pode estar relacionado com a ativação de enzimas de quebra de parede celular, como observado em outras espécies (NASCIMENTO et al., 1999). A atividade destas enzimas pode estar sendo regulada por fatores de transcrição da família EIN3 e/ou ERF, tendo em vista que trabalhos em outras espécies já terem demonstrado a presença de seus elementos-cis na região promotora dos genes destas enzimas (YIN et al., 2010).

Os resultados de expressão *in silico* envolvendo os possíveis homólogos para *EIN2* e os fatores de transcrição da família EIN3, e os fatores de transcrição da subfamília ERF (Figura 7) corroboram com os resultados de expressão *in silico* demonstrado pelos prováveis genes da biossíntese e dos receptores de etileno encontrados neste trabalho e também apontam para o envolvimento do etileno em outros processos, como na resposta a estresses bióticos. Vários

contigs relacionados a estes pontos da rota de sinalização do etileno mostraram-se expressos em bibliotecas como RM1, RX1, BP1 e RT5, o que está provavelmente relacionado ao papel do etileno nas respostas de defesa das plantas. A biossíntese de etileno é ativada em muitas plantas em resposta ao ataque de patógenos, levando à indução de genes defesa-relacionados através de uma cascata de eventos na qual o penúltimo passo é a ativação de fatores de transcrição do tipo ERF (BROEKAERT, 2006). Dentre as moléculas induzidas pelo etileno, as proteínas Patógeno-Relacionadas (PR) são as mais bem estudadas apresentando, na região promotora de seus genes o elemento-cis necessário e suficiente para a interação com os ERFs, o GCC-box (BROEKAERT, 2006). Estudos em diferentes espécies mostraram que muitos ERFs são induzidos em resposta ao ataque de patógenos, e plantas transgênicas superexpressando esses genes apresentaram aumento na tolerância a este estresse causado por diferentes patógenos (ZHANG et al., 2009a; MENG et al., 2010). Em café, o aumento da resistência à ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, observado em plantas tratadas com acibenzolar-S-methyl (GUZZO et al., 2001), pode ter sido gerada pela ação de fatores de transcrição ERF, considerando que neste trabalho foi detectada a expressão de prováveis ERFs de café em bibliotecas como BP1 e CB1. Alguns trabalhos já relataram também a expressão de ERFs em calos (LEE et al., 2005) e sementes (PIRRELLO et al., 2006), o que também foi encontrado neste trabalho com os *contigs* CaERF7, CaERF11, CaERF3, CaERF5, CaERF8, e CaERF6 e CaERF12 sendo expressos em calos e sementes, respectivamente, indicando que estes fatores de transcrição possam estar envolvidos em processos como a diferenciação celular.

Excluído:

5 CONCLUSÃO

O banco de dados CAFEST se mostrou bastante representativo com relação aos possíveis membros formadores das rotas de biossíntese e sinalização do etileno permitindo a identificação de componentes que atuam em praticamente todos os passos destas rotas.

As análises de motivos conservados e análises filogenéticas mostraram o alto grau de conservação entre as sequências de café e aquelas de outras espécies.

Os resultados da análise de expressão *in silico* corroboram com muitas das condições e estádios de desenvolvimento onde se sabe que o etileno exerce um importante papel.

REFERÊNCIAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. JR. **Ethylene in plant biology**, 2nd ed. New York: Academic Press. 1992. 414p.
- ACHARD, P. et al. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 15, p. 6484-6489, Apr. 2007.
- ALONSO, J. M.; ECKER, J. R. The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone Signaling and Interaction. **Sci. STKE**, La Jolla, v. 70, n. 70, p. RE1, Feb. 2001.
- BUSTAMANTE-PORRAS, J. et al. Characterization of three ethylene receptor genes in *Coffea canephora* Pierre. In: **Advances in Plant Ethylene Research: Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene**, n. 7, 2007, Pisa-Italy. Editora: Springer, 2007. p. 53-56.
- CHAO, Q. M. et al. Activation of the ethylene gas response pathway in arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. **Cell**, Cambridge, v. 89, n. 7, p. 1133-1144, Jun. 1997.
- CHEVALIER, D.; WALKER, J. C. Functional genomics of protein kinases in plants. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, Columbia, v. 3, n. 4, p. 362-371, Feb. 2005.
- EISEN, M. B. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 19, p. 10943-10943, Sep. 1999.
- EL-SHARKAWY, I. et al. Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 8, p. 2009-2027, May. 2008.
- FUJIMOTO, S. Y. et al. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 3, p. 393-404, Mar. 2000.
- GUO, H. W.; ECKER, J. R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Current Opinion in Plant Biology**, La Jolla, v. 7, n. 1, p. 40-49, Feb. 2004.

- GUZMAN, P.; ECKER, J. R. Exploiting the triple response of arabidopsis to identify ethylene-related mutants. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 6, p. 513-523, Jun. 1990.
- GUZZO, S. D. et al. Protection of coffee plants against coffee leaf rusty by Acibenzolar-S-Methyl. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, p. 89-94, Jun. 2001
- HU, Z. L. et al. Co-suppression of the EIN2-homology gene *LeEIN2* inhibits fruit ripening and reduces ethylene sensitivity in tomato. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 57, n. 4, p. 554-559, Jul. 2010.
- HUA, J. et al. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 8, p. 1321-1332, Aug. 1998.
- HUANG, X. Q.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, New York, v. 9, n. 9, p. 868-877, Sep. 1999.
- KEVANY, B. M. et al. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **Plant Journal**, Malden, v. 51, n. 3, p. 458-467, Aug. 2007.
- LEE, J. H. et al. Functional characterization of NtCEF1, an AP2/EREBP-type transcriptional activator highly expressed in tobacco callus. **Planta**, New York, v. 222, n. 2, p. 211-224, Oct. 2005.
- LI, Y. C. et al. LeERF1 positively modulated ethylene triple response on etiolated seedling, plant development and fruit ripening and softening in tomato. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, n. 11, p. 1999-2008, Nov. 2007.
- LIN, C. T.; LIN, M. T.; SHAW, J. F. Cloning and characterization of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from papaya fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 2, p. 526-530, Feb. 1997.
- MBEGUIE-A-MBEGUIE, D. et al. EIN3-like gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. *Grande naine*). **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 133, n. 2, p. 435-448, Jun. 2008.

- MCCARTHY, D. L. et al. Glutamate 47 in 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is a major specificity determinant. **Biochemistry**, Washington, v. 40, n. 41, p. 12276-12284, Oct. 2001.
- MENG, X. P. et al. Isolation and Characterization of an ERF Transcription Factor Gene from Cotton (*Gossypium barbadense L.*). **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 28, n. 1, p. 176-183, Mar. 2010.
- MOUSSATCHE, P.; KLEE, H. J. Autophosphorylation activity of the arabidopsis ethylene receptor multigene family. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville Pike, v. 279, n. 47, p. 48734-48741, Nov. 2004.
- NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J. Lettuce seed germination and endo- β -mannanase are stimulated by ethylene. **HortScience**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 513, Jun. 1999.
- OHMETAKAGI, M.; SHINSHI, H. Ethylene-inducible dna-binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 2, p. 173-182, Feb. 1995.
- OHTA, M. et al. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 8, p. 1959-1968, Aug. 2001.
- PEARSON, R. B.; KEMP, B. E. Protein-kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs - tabulations. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 200, p. 62-81, Nov. 1991.
- PIRRELLO, J. et al. Sl-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, n. 9, p. 1195-1205, Sep. 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 4, n. 4, p. 406-425, Jul. 1987.
- SAKUMA, Y. et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 290, n. 3, p. 998-1009, Jan. 2002.

DA SILVA, E. A. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination. **Planta**, New York, v. 220, n. 2, p. 251-261, Dec. 2004.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branched and bootstrap tests of phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 319-333, Mar. 1995.

SOBEIH, W. Y. et al. Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2353-2363, Nov. 2004.

SUN, P. et al. Aluminum-induced ethylene production is associated with inhibition of root elongation in *Lotus japonicus* L. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 48, n. 8, p. 1229-1235, Aug. 2007.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Aug. 2007.

TANG, X. Y. et al. Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from petunia-hybrida. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 23, n. 6, p. 1151-1164, Dec. 1993.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

TOURNIER, B. et al. New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 550, n. 1-3, p. 149-154, Aug. 2003.

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

WANG, W. Y. et al. Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of arabidopsis. **Plant Cell**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 3429-3442, Dec. 2006.

WOLANIN, P. M.; THOMASON, P. A.; STOCK, J. B. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 10, p. 1-8, Sep. 2002.

YAMAGAMI, T. et al. Biochemical Diversity among the 1-Amino-cyclopropane-1-Carboxylate Synthase Isozymes Encoded by the Arabidopsis Gene Family. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville Pike, v. 278, n. 49, p. 49102-49112, Dec. 2003.

YIN, X. R. et al. Kiwifruit EIL and ERF Genes Involved in Regulating Fruit Ripening. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 3, p. 1280-1292, Jul. 2010.

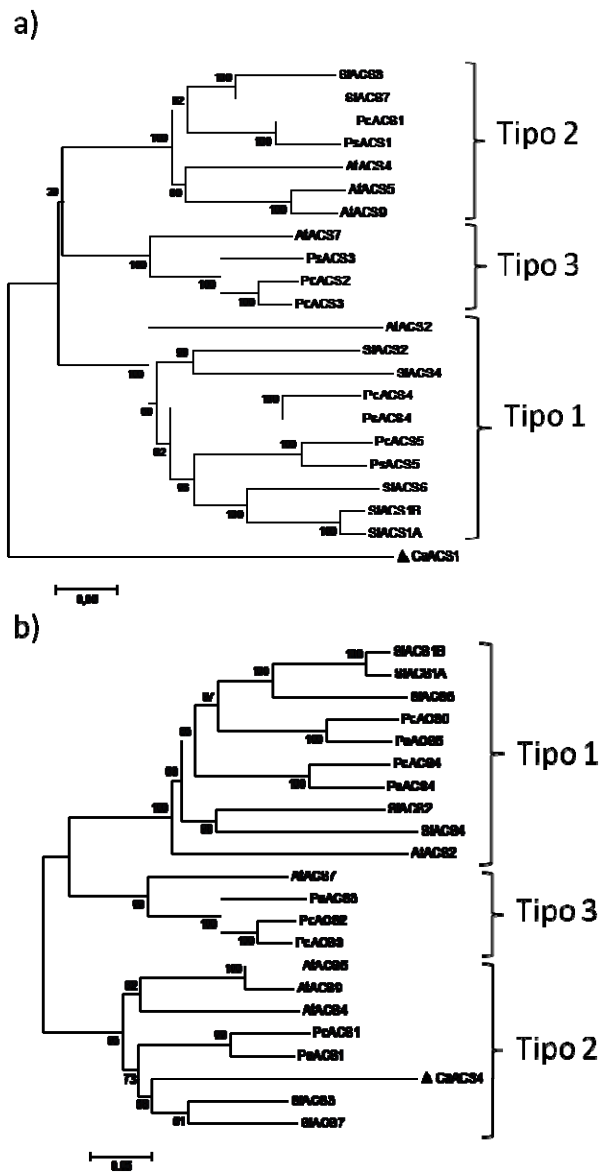
YOSHIDA, H. et al. Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. **Bmc Plant Biology**, London, v. 5, n. p. Aug. 2005.

ZHANG, G. Y. et al. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 13, p. 3781-3796, Sep. 2009a.

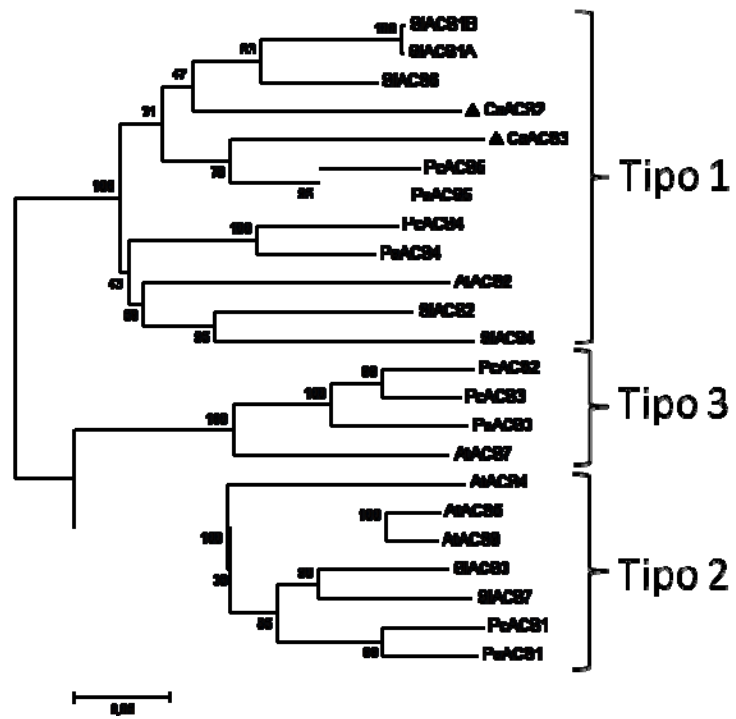
ZHANG, Z. J. et al. Transcriptional Regulation of the Ethylene Response Factor LeERF2 in the Expression of Ethylene Biosynthesis Genes Controls Ethylene Production in Tomato and Tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 1, p. 365-377, May. 2009b.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Árvores filogenéticas envolvendo sequências de proteínas ACSs de outras espécies, encontradas no NCBI e CaACS1 (a), CaACS4 (b) encontradas no CAFEST.



APÊNDICE B - Árvores filogenéticas envolvendo somente as porções N-terminal das proteínas CaACS2 e CaACS3 encontras no CAFEST, e ACSs de outras espécies encontradas no NCBI.



CAPÍTULO 3

**Análise quantitativa da expressão de prováveis genes das
rotas de biossíntese e sinalização do etileno**

RESUMO

A qualidade do café é fortemente influenciada por um grande número de fatores dentre os quais o estágio de maturação dos frutos no momento da colheita exerce uma grande influência nessa característica. Alguns trabalhos abordando a produção de etileno e a regulação de genes envolvidos na sua biossíntese ao longo da maturação de frutos do cafeeiro, além da maior sincronização da maturação pela aplicação exógena de Ethephon, indicam que o etileno exerça um importante papel na maturação do café. As cultivares precoces de café geralmente apresentam uma maior uniformidade da maturação de seus frutos, no entanto, pouco se sabe sobre os fatores genéticos que regulam esta característica de precocidade da maturação. Assim, este estudo objetivou analisar a expressão de genes relacionados às rotas de biossíntese e sinalização do etileno durante a maturação de frutos do cafeeiro em cultivares tardia (Acauã) e precoce (Catucaí 785-15). Os frutos foram coletados nos períodos de março a junho dos anos de 2008 e 2009, com uma coleta mensal em um intervalo de aproximadamente 30 dias, e a expressão analisada por qRT-PCR. As análises de expressão para os prováveis genes que codificam para ACO (CaACO3) e para o receptor de etileno (CaETR4) mostraram que esses genes são diferencialmente regulados durante a maturação, com elevações de seus níveis nas coletas com maior porcentagem de frutos nas colorações vermelho-claro e cereja em ambas cultivares. O provável fator de transcrição ERF (CaERF4) apresentou elevados níveis de expressão durante todas as coletas não sendo diferencialmente expresso durante a maturação nas cultivares em estudo.

Palavras-chave: Maturação. qRT-PCR. ACC oxidase. Receptor de etileno. ERF.

ABSTRACT

Coffee quality is strongly influenced by a great number of factors, among which the fruit ripening stage at harvest time has a major influence on this feature. Some studies comprising ethylene production and the regulation of ethylene biosynthesis genes during the ripening process, in addition to the higher fruit ripening synchronization generated by exogenous Ethephon application indicates that ethylene plays an important role on coffee fruit ripening. Coffee early cultivars usually show a more uniform ripening process although little is known about the genetic factors that promote the earliness of ripening. Thus, this study aimed to analyze the expression of genes related to the ethylene biosynthesis and signaling pathways on coffee fruits from a late (Acauã) and an early (Catucaí 785-15) cultivars. Coffee fruits were harvested in the periods from March to June of 2008 and 2009 and included one harvest in each month with an interval of approximately 30 days between them and the expression analyses were carried out by qRT-PCR. The expression analyses of the genes encoding a putative ACO (CaACO3) and a putative ethylene receptor (CaETR4) showed that these genes are differentially expressed through the ripening process, with higher expression levels found at the times in which a major percentage of fruits in the light-red and cherry colors were present for both cultivars. The putative ERF transcription factor (CaERF4) showed an increased expression level throughout the experiment and were not differentially expressed during the fruit ripening period of both studied cultivars.

Keywords: Ripening. qRT-PCR. ACC oxidase. Ethylene receptor. ERF.

1 INTRODUÇÃO

O café coloca-se hoje como uma das principais *commodities* do mundo, apresentando um importante papel na geração de renda e de empregos, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, maior produtor e segundo maior consumidor desse produto. Estima-se que o Brasil produzirá cerca de 44,2 bilhões de sacas de café em 2011, tendo países como Alemanha e Estados Unidos como os principais destinos de grande parte dessa produção (CONAB, 2011; CECAFE, 2011)

A qualidade do café é influenciada por um grande número de fatores dentre os quais o estágio de maturação dos frutos no momento da colheita exerce uma grande influência nessa característica. O cafeeiro apresenta uma grande desuniformidade na maturação de seus frutos em razão do florescimento sequencial encontrado nesta espécie, sendo que estudos direcionados a um melhor entendimento do processo de florescimento (DE OLIVEIRA et al., 2010; BARRETO, et al., 2011), assim como do processo de maturação dos frutos, podem promover um melhor entendimento dos mecanismos que regulam a uniformidade da maturação.

As cultivares precoces de café geralmente apresentam uma maior uniformidade da maturação de seus frutos, no entanto, pouco se sabe sobre os fatores que regulam essa característica. Alguns estudos envolvendo a produção de etileno e a regulação de genes envolvidos na sua biossíntese ao longo da maturação do café (PEREIRA et al., 2005; SALMONA et al., 2008), além de trabalhos relatando uma antecipação e sincronização da maturação pela aplicação exógena de Ethephon (CARVALHO et al., 2003; SCUDELER et al., 2004; SILVA, 2009), indicam que o café possa constituir um fruto climatérico, no qual o etileno exerce um papel essencial durante a maturação. Entretanto,

pouco se sabe sobre a regulação de sua biossíntese e percepção celular nessa espécie e em suas diferentes cultivares.

Desta forma, o etileno parece atuar como um importante regulador do processo de maturação dos frutos do cafeeiro e, a regulação dos genes envolvidos na sua biossíntese e sinalização podem estar envolvidas na determinação da precocidade ou não da maturação destes frutos, como já observado em outras espécies (EL-SHARKAWY et al., 2007; EL-SHARKAWY et al., 2008).

Assim, este estudo objetivou analisar a expressão de genes relacionados às rotas de biossíntese e sinalização do etileno durante a maturação de frutos do cafeeiro em cultivares precoce (Catucaí 785-15) e tardia (Acauã).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições experimentais e coleta dos frutos

O trabalho foi conduzido na Fazenda do Ministério da Agricultura em Varginha, a qual é administrada pela fundação Procafé, localizada no sul de Minas Gerais com latitude 21° 34' 00'' e longitude 45° 24' 22'', com altitude média de 1.000 m. O clima é tropical de altitude (Cwa) segundo Koppen, clima mesotérmico úmido com inverno seco, temperatura média no mês mais frio de 16° C (julho) e 23° C média do mês mais quente (fevereiro). O solo é de textura argilo arenosa e estrutura granular pequena, formando os agregados que se apresentam com pouca porosidade, ausência de cerosidade e boa permeabilidade, solo profundo e ausência de pedregulhos, pH baixo e altos teores de Al.

O experimento foi composto por um total de 36 plantas, 18 plantas para cada cultivar e seis plantas por repetição, totalizando três repetições por cultivar. As seguintes cultivares foram utilizadas para a condução do experimento:

- Acauã: proveniente do cruzamento entre Sarchimor e Mundo Novo, caracteriza-se por apresentar um porte baixo, arquitetura muito compacta, alto vigor, resistência à ferrugem, e tolerância ao fitonematóide *Meloidogyne exigua* e à seca. Quanto à produção, apresenta uma maturação tardia, com frutos vermelhos escuro, semente alongada e grande porcentagem de mocas, apresentando boa produtividade;

- Catucaí 785-15: proveniente do cruzamento entre Icatu e Catuaí, caracteriza-se por apresentar um porte baixo a médio, arquitetura compacta com plantas com menor diâmetro de saia e cônicas, bom vigor, resistência à ferrugem e ao *M. exigua*. Quanto à produção, apresenta maturação precoce, com frutos vermelhos e semente média a grande, apresentando boa produtividade;

As cultivares foram plantadas no ano de 2000 com espaçamento de 3,5 x 1,0m. A florada principal no ano de 2007 ocorreu no dia 29 de outubro, sendo que para o ano de 2008, não foi possível determinar a data exata do florescimento devido ao menor déficit hídrico encontrado nesse ano, o que ocasionou na não ocorrência de uma florada principal.

As médias de temperatura, precipitações e os níveis de disponibilidade hídrica dos solos para a Fazenda do Ministério da Agricultura em Varginha durante o período de 2007 a 2009 podem ser encontrados em anexo (ANEXO A, ANEXO B, ANEXO C).

Os frutos foram coletados nos períodos de março a junho dos anos de 2008 (Ano I) e 2009 (Ano II), com uma coleta mensal em um intervalo de aproximadamente 30 dias, totalizando quatro coletas. Os frutos foram coletados do terço médio das plantas, durante o período da manhã (9 – 12h) e nos lados ensolarados das mesmas. No ato da coleta, os frutos foram imediatamente colocados em tubos falcon 50 mL e inseridos em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenados em freezer -80°C. Além disso, em cada coleta foram colhidos uma determinada quantidade de frutos de cada uma das cultivares em estudo, dos quais foram separados, aleatoriamente, 100 frutos para determinação da porcentagem de frutos verde, verde-cana, vermelho-claro, cereja e passa.

2.2 Genes analisados

Os prováveis genes relacionados à biossíntese e sinalização do etileno escolhidos para as análises de expressão por qRT-PCR foram: CaACO3, provável ACO, CaETR4, provável receptor de etileno e CaERF4, provável fator de transcrição ERF.

A escolha destes candidatos foi baseada nos resultados obtidos pelas árvores filogenéticas e *Northerns* eletrônicos. O *contig* CaACO3 mostrou-se expressos em bibliotecas de frutos em diferentes estádios de maturação. O *singlet* CaETR4 é formado por um *read* da biblioteca de tecidos de fruto FR2 e apresentou uma maior similaridade ao receptor LeETR4, o qual apresenta um importante papel na maturação de tomate (KEVANY et al., 2007). O *contig* CaERF4 também foi expresso em bibliotecas de frutos, além de ter se agrupado na árvore filogenética em uma clado cujos membros estão particularmente associados com a maturação de frutos *LeERF2* (TOURNIER et al., 2003), *MdERF1* (WANG et al., 2007) e *PsERF2a* e *PsERF2b* (EL-SHARKAWY et al., 2009).

2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada pelo protocolo descrito por Chang et al. (1993), com algumas modificações. De acordo com as porcentagens de coloração encontradas em cada coleta, cerca de 3 a 5 frutos foram macerados em nitrogênio líquido, com o auxílio de um cadinho e pistilo, e a cada 100mg de tecido foram adicionados 800 µL do tampão de extração ((2% (p/v) CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*), 2% (p/v) PVP, 100 mM de Tris-HCL, 25 mM de EDTA, 2 M de NaCl e 2% de β –mercaptoetanol). As amostras foram então incubadas a 65°C por 20 min, sendo posteriormente adicionado a elas um volume de 800 µL clorofórmio, agitadas, e levadas à centrifuga por 10 min a 11.000 rpm (rotações por minuto) à temperatura de 4°C. O sobrenadante, padronizado em 450 µL, foi transferido para novos tubos e adicionado o mesmo volume de clorofórmio, sendo novamente agitadas e levados à centrifuga por 10 min a 11.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionado a estes Cloreto de Lítio 12 M para concentração final de 2,5 M. As

amostras foram mantidas por um período de 1 hora à temperatura de 4°C para precipitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 13.200 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi lavado com 1 mL de Cloreto de Lítio 2,5 M, seguido de nova centrifugação por 15 min a 4°C (13.200 g). Então, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 70% (v/v). As amostras foram centrifugadas por 10 min a 11.000 rpm a 4°C, sendo posteriormente descartado o etanol e feita a ressuspensão do pellet em água Milli-Q autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Todas as amostras foram tratadas com *DNase DNA free* (Ambion), em uma reação contendo 0,1 volume do tampão DNase turbo 10 X, 1 µL da enzima DNase turbo e água livre de DNase/RNase para completar o volume de 25 µL. Essa reação foi incubada a 37°C por 30 min. Posteriormente foi adicionado 0,1 volume do reagente de inativação da DNase e as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 1,5 min a 10.000 g, e o sobrenadante transferido para novos tubos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Para a avaliação da integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UVITEC FireReader XS D-77LS-20.M. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (*Nanodrop® Spectrophotometer ND- 1000*) a 260 nm com o objetivo de determinar a quantidade e qualidade.

A síntese de cDNA foi feita com kit *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi preparado um *mix* contendo 2 µL do tampão 10X da enzima, 2 µL do *primer* RT *Random Primers* 10X, 0,8 µL do *mix* dNTP (100 mM), 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada

solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse *mix*. Os tubos foram submetidos ao termociclador *Multigene Gradient* Labnet, programado com três etapas: 10 min a 25°C para o anelamento dos *primers*; 2 h a 37°C para ação da enzima e 5 min a 85°C para inativá-la. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -20°C.

2.4 qRT-PCR

A partir das sequências de CaACO3, CaETR4 e CaERF4, obtidas no estudo *in silico*, foram desenhados *primers* para o experimento de qRT-PCR utilizando o programa *Primer3* (versão 0.4.0; http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Tabela 2).

Para a análise da expressão gênica quantitativa por qRT-PCR foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems), utilizando o sistema de detecção SYBR Green e o cDNA obtido a partir de RNA extraído dos frutos. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação, foi utilizado 1,0 µL de cDNA, 0,2 µL de cada primer e 5,0 µL de *Master Mix SYBR green UDG* com ROX (Invitrogen) para um volume final 10,0 µL/amostra. Controles negativos e curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises. Todo o experimento de qRT-PCR, para cada gene em estudo, foi conduzido a partir de cDNAs diferentes obtidos a partir de três repetições biológicas, com três replicatas técnicas para cada uma, sendo os resultados normalizados usando C_{T_s} (Ciclo *Threshold*) obtidos pela expressão dos genes de referência *β-actin (ACTINA)* e *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009). O C_T foi determinado

pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (*threshold*). O método que foi usado é o do C_T comparativo. Como um dos requisitos necessários para a utilização deste método foi realizado um experimento de validação para mostrar que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referências são aproximadamente iguais (Tabela 2). Para isto foram realizadas curvas padrões para os genes em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Este procedimento também permitiu a definição da concentração de cDNA utilizada em cada reação, a qual foi de 10 ng/ μ L. A concentração de cada *primer* utilizado foi de 1,5 μ M.

TABELA 2 *Primers* utilizados na qRT-PCR (CaACO3, CaETR4, CaERF4).

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Eficiência
CaACO3 F	5' CGCAACTGTTTGAGATCACG 3'	96,08
CaACO3 R	5' CCAATCCAAGCATTAAACAAGG 3'	
CaETR4 F	5' TTGGTCCATTTCAGGAACTCG 3'	93,32
CaETR4 R	5' GCATCCTGTTTGCTTGTTG 3'	
CaERF4 F	5' TTCCAACCCCAGCCTTACTA 3'	99,84
CaERF4 R	5' TAAGCCCAGGAAAGATTCCA 3'	
Actina F	5' AATTGTCCGTGACATCAAGGAA 3'	101,86
Actina R	5' TGAGCTGCTTTGGCTGTTC 3'	
GAPDH F	5' TTGAAGGGCGGTGCAA 3'	99,89
GAPDH R	5' AACATGGGTGCATCCTTGCT 3'	

A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta C_T = C_T$ (gene alvo) - C_T (controle endógeno). A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) - ΔC_T (calibrador). O calibrador é uma amostra usada como base para resultados de expressão comparativa, sendo que neste estudo foi utilizada a coleta 1 como calibradora para CaACO3 e CaETR4, e a coleta 2 para CaERF4. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Porcentagens da coloração dos frutos

A análise da Figura 8, envolvendo as porcentagens de frutos nas colorações verde, verde-cana, vermelho-claro, cereja, e passa, para as duas cultivares durante os dois anos de estudo permitiu a observação da maior precocidade na maturação dos frutos da cultivar Catucaí 785-15, quando comparada à cultivar Acauã e, em conjunto com os dados climatológicos observados para os anos de 2007 a 2009 (ANEXO A, ANEXO B, ANEXO C), pode-se observar como os fatores climáticos estão estreitamente relacionados com a uniformidade da maturação dos frutos.

De acordo com os dados de precipitação e disponibilidade hídrica, pode ser notado que o déficit hídrico ocorrido durante o ano de 2007, nos meses de março a meados de setembro, proporcionou uma maior uniformidade na maturação dos frutos de ambas cultivares quando comparado com o ano de 2008. O maior déficit hídrico no ano de 2007 possibilitou a ocorrência de uma florada principal nesse ano, que ocorreu no final do mês de outubro, após o início das chuvas em meados de setembro. Já no ano de 2008, o déficit hídrico foi muito menos intenso e as chuvas iniciaram já em meados de agosto, não

permitindo a ocorrência de uma florada principal, ocasionando em uma maior desuniformidade da maturação no ano de 2009.






Cultivar Coletas Ano	Acauã								Catucaí-785-15							
	1ª		2ª		3ª		4ª		1ª		2ª		3ª		4ª	
	Ano I	Ano II	Ano I	Ano II	Ano I	Ano II	Ano I	Ano II	Ano I	Ano II	Ano I	Ano II	Ano I	Ano II	Ano I	Ano II
 Verde	71	52	22	23	4				61	63	18					
 Verde-cana	29	48	41	53	13				31	37	35	41	8			
 Vermelho-claro			24	14	35	29	16	8	43	25	33	6			8	
 Cereja			13	10	65	27	40	34			22	16	46	28	50	49
 Passa					27	60	50					21	58	50	43	

FIGURA 8 Porcentagens de frutos nas colorações verde, verde-cana, vermelho-claro, cereja e passa para as cultivares Acauã e Catucaí 785-15 durante as quatro coletas realizadas nos anos I e II.

3.1 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

A análise dos gráficos representando os níveis de expressão relativa dos genes analisados permite a observação de um comportamento semelhante entre a provável ACO (CaACO3) e o provável receptor de etileno (CaETR4) para ambas cultivares dentro de cada ano (Figura 9), com uma estreita relação com as porcentagens de coloração dos frutos (Figura 8).

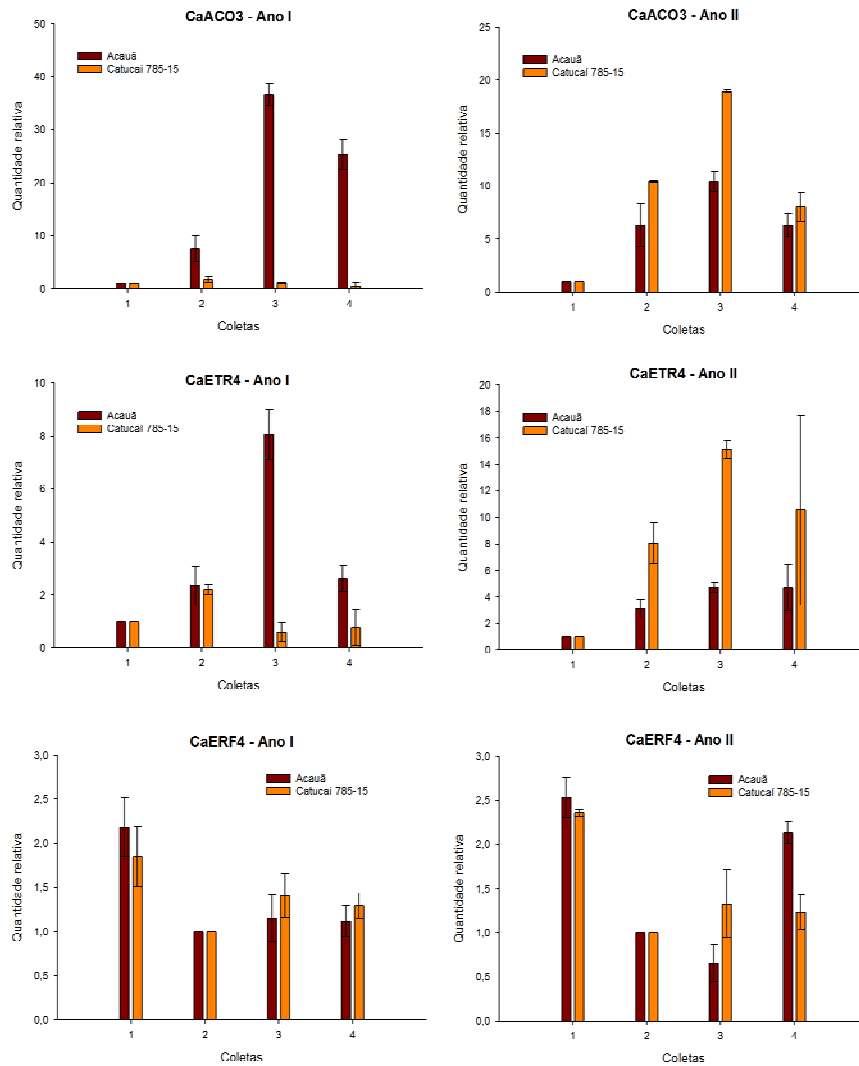


FIGURA 9 Perfil da expressão por qRT-PCR de CaACO3, CaETR4 e CaERF4 em frutos de café das cultivares Acauã e Catucaí 785-15 nas quatro coletas realizadas nos anos I e II. O eixo x representa quatro coletas de frutos realizadas de março a junho de cada ano e o eixo y representa a diferença de expressão relativa à coleta 1 para CaACO3 e CaETR4, e coleta 2 para CaERF4. Os valores de expressão de cada repetição biológica foi obtido a partir da média de três replicatas técnicas e as barras de erro representam o

desvio padrão de três repetições biológicas. Cada dado foi normalizado pela média dos valores de expressão dos genes de referência *Actina* e *GAPDH*.

Com relação à expressão de CaACO3 na cultivar Acauã no Ano I pode-se observar que CaACO3 apresentou um aumento de cerca de cinco e 35 vezes nas coletas 2 e 3, respectivamente, reduzindo sua expressão durante a coleta 4 (Figura 9). Para esse mesmo ano e cultivar, a expressão de CaETR4 apresentou um comportamento semelhante ao observado para CaACO3, com aumentos na ordem de duas e sete vezes nas coletas 2 e 3, respectivamente, em comparação com sua expressão na coleta 1, posteriormente reduzindo durante a coleta 4. Estes dados de expressão de CaACO3 e CaETR4 apresentam uma boa correlação com as colorações dos frutos (Figura 8). À medida que as porcentagens dos frutos verde e verde-cana foram diminuindo, as expressões desses genes aumentaram, sendo que o grande aumento na expressão de ambos os genes na coleta 3, pode ser explicado pela ausência de frutos verde e verde-cana, que juntos representavam 66% dos frutos na coleta anterior, e pelo fato de 100% dos frutos já se encontrarem nas colorações vermelho-claro (35%) e cereja (65%). Esses resultados indicam que os frutos nas colorações vermelho-claro e cereja são os grandes responsáveis pelo aumento da expressão observada para estes genes, com destaque para os frutos cereja que representaram 65% dos frutos nesta coleta.

Já para cultivar Catucaí 785-15 a expressão de CaACO3 e CaETR4 apresentaram pequenas variações entre as coletas do Ano I, sugerindo à primeira vista, que esses genes fossem regulados de modo bastante diferente entre as duas cultivares em estudo (Figura 9). No entanto, este resultado foi possivelmente gerado devido ao fato dos níveis de expressão de CaACO3 e CaETR4 já se mostrarem elevados durante a coleta 1, a qual foi utilizada como amostra calibradora dos valores de expressão relativa, impedindo a observação de grandes mudanças na expressão destes genes. Além disso, também deve ser

levado em consideração o fato de não ter sido observado, em nenhuma das coletas realizadas, a presença de frutos somente nas colorações vermelho-claro e cereja para esta cultivar. Isto está relacionado ao fato das mudanças relacionadas à maturação dos frutos nas cultivares precoces ocorrerem de forma mais rápida corroborando para a não observação de grandes mudanças na expressão de CaACO3 e CaETR4. Os dados de expressão no Ano II corroboram para o fato de que a regulação desses genes nas duas cultivares ocorra de modo semelhante (Figura 9).

Excluído:

Os dados de expressão de CaACO3 e CaETR4 referentes ao Ano II também indicam o envolvimento desses genes na maturação dos frutos do cafeeiro (Figura 9). CaACO3 e CaETR4 apresentaram aumentos na suas expressões ao longo das três primeiras coletas, com uma redução dos níveis de expressão de CaACO3 na coleta 4 e manutenção dos níveis de expressão da coleta 3 durante a coleta 4, para CaETR4. CaACO3 e CaETR4 se mostraram diferencialmente expressos entre as duas cultivares nas coletas 2 e 3, com os maiores níveis de expressão encontrados para a cultivar Catucaí 785-15.

No segundo ano, novamente pôde ser observado novamente uma boa relação entre as colorações dos frutos e os níveis de expressão dos genes CaACO3 e CaETR4 (Figura 8, Figura 9). À medida que as porcentagens dos frutos nas colorações verde e verde-cana foram diminuindo e as porcentagens de frutos vermelho e cereja aumentando foram detectados maiores níveis de expressão para CaACO3 e CaETR4. Entretanto, devido ao fato desse ano ter apresentado uma maturação dos frutos mais desuniforme, quando comparado com o ano anterior, não pôde ser observada grandes mudanças nos níveis de expressão desses genes de uma coleta para a outra e entre as duas cultivares.

Sendo assim, apesar de os dados de expressão para CaACO3 e CaETR4 em um primeiro momento sugerir que esses genes apresentassem papéis bastante divergentes entre as duas cultivares em estudo, os dados de expressão do

segundo ano indicam que isto parece não ocorrer, sendo que as grandes diferenças observadas entre um ano e o outro provavelmente foram geradas pelas diferenças na uniformidade da maturação entre os dois anos.

Em suma, esses resultados indicam que esses dois genes estão diretamente relacionados com a maturação dos frutos do cafeeiro, no entanto, estudos envolvendo um maior número de amostragens, feitas em um menor intervalo de tempo, se fazem necessários para se comprovar que a regulação diferencial de CaACO3 e CaETR4 possa estar relacionada com a determinação da característica de precocidade da maturação de frutos do cafeeiro.

Os resultados dos níveis de expressão para CaACO3 (Figura 9) encontrados neste trabalho corroboram com aqueles observados por Pereira et al. (2005) onde foi encontrado um aumento na expressão de *Ca-ACO* a partir do estágio verde-cana dos frutos, a qual se perdurou até o estágio passa. No entanto, provavelmente em razão desta análise ter sido realizada pela técnica de *Northern blot*, não foi possível visualizar a redução na expressão de *Ca-ACO* quando os frutos estavam no estágio passa, como encontrado na coleta 4 deste trabalho. O perfil de expressão de CaACO3 está de acordo com o perfil de produção de etileno encontrado por Pereira et al. (2005), onde foi observada uma redução nos níveis de etileno nos frutos passa.

Na literatura podem ser encontrados diversos estudos relacionando a indução da expressão de genes da ACO durante a fase de maturação dos frutos. Em tomate, foram identificados quatro genes *ACO* (*LeACO1-4*), dos quais três, *LeACO1*, *LeACO3* e *LeACO4*, são expressos em frutos. As expressões desses genes ocorrem em baixos níveis enquanto os frutos ainda se encontram imaturos, ou seja, sob o Sistema 1 de produção de etileno. Durante a maturação, são observados grandes aumentos na expressão de *LeACO1* e *LeACO4*, o que está relacionado com a transição para o Sistema 2 de produção de etileno (BARRY et al., 1996; ANJANASREE et al., 2005). Em maçã (*Malus domestica*) e pêssego

(*Prunus persica*) também foram encontrados maiores níveis de expressão dos genes *ACO* durante a maturação, sendo que dos dois e quatro genes *ACO* encontrados nessas espécies, respectivamente, somente *MdACO1* e *PpACO1* foram induzidos durante a maturação (RUPERTI et al., 2001; WIERSMA et al., 2007).

Com relação à expressão do provável receptor de etileno CaETR4 obtida neste trabalho (Figura 9), pode-se constatar uma clara expressão diferencial desse gene ao longo da maturação do café, ao contrário do resultado obtido por Bustamante-Porras et al. (2007) para o receptor de etileno *CcETR1*, o qual não apresentou variação nos níveis de expressão ao longo da maturação dos frutos de *Coffea canephora*. Em tomate, dos seis receptores de etileno identificados nessa espécie, três, LeETR3, LeETR4 e LeETR6, são induzidos durante a maturação. CaETR4 apresentou uma maior similaridade com LeETR4 (Figura 6) e os dados de expressão quantitativa encontrados neste trabalho para CaETR4, sugerem que esse provável receptor de etileno possa atuar de forma semelhante à LeETR4. Aumentos na expressão de receptores de etileno durante a maturação também podem ser encontrados em outras espécies como pêssego (RASORI et al., 2002), kiwi (YIN et al., 2008) e ameixa (EL-SHARKAWY et al., 2007),

Os aumentos nos níveis de expressão dos receptores de etileno durante a maturação dos frutos observados nas diferentes espécies citadas acima e também encontrados neste trabalho colocam-se, a princípio, como um mecanismo contraditório, considerando que os receptores de etileno atuam como reguladores negativos da rota de sinalização e, um aumento nos seus níveis tornaria os frutos menos sensíveis ao etileno. No entanto, deve-se salientar que nem sempre os níveis de transcritos de um gene representam o conteúdo de proteínas dos mesmos sendo que, no caso dos receptores de etileno de tomate, Kevany et al. 2007 mostraram que um importante mecanismo de regulação pós-traducional atua na regulação dos níveis dessas proteínas. Neste trabalho, foi demonstrado

que, apesar de observar-se uma elevação dos níveis de transcritos de *LeETR4* e *LeETR6* durante a maturação, esses níveis de expressão não corresponderam aos níveis de suas proteínas, os quais se mostraram mais elevados nos frutos imaturos. Neste mesmo trabalho, também foi demonstrado que a diminuição dos níveis dessas proteínas é induzida pelo etileno, cuja ligação ao receptor se mostrou essencial para possibilitar a degradação dessas mesmas proteínas. Assim, pode-se concluir que a sensibilidade ao etileno, durante a maturação, envolve um fino ajuste entre os níveis de etileno e os níveis de seus receptores.

Com relação ao perfil de expressão encontrado para o provável fator de transcrição ERF CaERF4, pode ser notado que esse gene não apresentou grande variação da expressão ao longo das quatro coletas, sendo ligeiramente mais expresso durante a coleta 1 em ambos os anos e cultivares (Figura 9). Apesar disso, os dados de qRT-PCR de CaERF4 indicam que esse fator de transcrição possa apresentar altos níveis de expressão em frutos do cafeeiro considerando que os menores C_T s observados em toda a análise de expressão por qRT-PCR realizada neste trabalho foram encontrados para CaERF4, o qual apresentou níveis de expressão similares ou mesmo superiores aos observados para os genes de referência *Actina* e *GAPDH*. Este resultado sugere que os alvos deste fator de transcrição possam apresentar importantes papéis em frutos do cafeeiro.

O resultado do *Northern* eletrônico de CaERF4 corrobora para seu envolvimento em frutos do cafeeiro, onde pôde ser observada a detecção de sua expressão em bibliotecas de frutos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 7). Além disso, a árvore filogenética também sugere um possível envolvimento de CaERF4 durante a maturação, considerando que CaERF4 agrupou-se em um clado cujos membros parecem estar particularmente associados à maturação de frutos, como observado para *LeERF2* (TOURNIER et al., 2003), *MdERF1* (WANG et al., 2007) e *PsERF2a* e *PsERF2b* (EL-SHARKAWY et al., 2009), os quais apresentaram expressões elevadas em

tecidos de frutos, indicando que seus alvos possam apresentar importantes papéis durante a maturação.

4 CONCLUSÃO

As análises de expressão da provável ACC oxidase (CaACO3) e do provável receptor de etileno (CaETR4) sugerem que esses genes estão diretamente relacionados com o processo de maturação dos frutos do cafeeiro, sendo diferencialmente expressos durante esse processo nas cultivares Acauã e Catucaí 785-15.

O provável fator de transcrição ERF (CaERF4) parece não ser diferencialmente expresso ao longo da maturação do café, no entanto, possivelmente apresenta elevados níveis de expressão, sugerindo possuir um importante papel regulatório em frutos do cafeeiro das cultivares Acauã e Catucaí 785-15.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo possibilitou a observação de que prováveis genes relacionados à biossíntese (CaACO3) e sinalização (CaETR4) do etileno são diferencialmente expressos ao longo da maturação dos frutos do cafeeiro das cultivares Acauã e Catucaí 785-15, além de sugerir que um provável fator de transcrição ERF (CaERF4) apresente um importante papel regulatório em frutos de café. Entretanto, estudos envolvendo um maior número de amostragens, realizadas em um menor intervalo de tempo, se fazem necessários para comprovar se a regulação diferencial de CaACO3 e CaETR4 está envolvida na determinação da precocidade da cultivar Catucaí 785-15.

Análises de expressão de CaACO3 e CaETR4 em frutos separados de acordo com seus estádios de maturação se fazem necessárias para se determinar em qual estágio estes genes são mais ou menos expressos, assim como análises de expressão em outros tecidos.

Além disso, análises da expressão do provável fator de transcrição ERF (CaERF4) em diferentes tecidos se fazem necessárias para se comprovar que este fator de transcrição realmente apresenta uma grande expressão em frutos de café.

REFERÊNCIAS

ANJANASREE, K. N.; VERMA, P. K.; BANSAL, K. C. Differential expression of tomato ACC oxidase gene family in relation to fruit ripening. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 8, p. 1394-1399, Oct. 2005.

BARRY, C. S. et al. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 525-535, Apr. 1996.

BARRETO, H. et al. *In Silico* and Quantitative Analyses of the Putative *FLC-like* Homologue in Coffee (*Coffea arabica* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/g3231303g433515k/>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **Bmc Molecular Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.

BUSTAMANTE-PORRAS, J. et al. Molecular characterization of an ethylene receptor gene (CcETR1) in coffee trees, its relationship with fruit development and caffeine content. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v. 277, n. 6, p. 701-712, Jun. 2007.

CARVALHO, G. R. et al. Eficiência do ethephon na uniformização e antecipação da maturação de frutos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e na qualidade da bebida. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 98-106, Fev. 2003.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 11, p. 113-116, Jul. 1993.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Segunda estimativa**: maio 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_10_09_04_16_boletim_ccafe_portugues_-_maio_-_2011_2o_lev..pdf>. Acesso em: 28 jun. 2011.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. **Resumo das exportações Junho 2011**. Disponível em: <
<http://www.cncafe.com.br/ba/file/CECAFE%20%20Resumo%20das%20Exportacoes%20de%20Cafe%20JUNHO%202011.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2011.

Código de campo alterado

DE OLIVEIRA, R. R. et al. *In Silico* and Quantitative Analyses of MADS-Box Genes in *Coffea arabica*. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 28, n. 3, p. 460-472, Sep. 2010.

EL-SHARKAWY, I. et al. Isolation and characterization of four ethylene signal transduction elements in plums (*Prunus salicina L.*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 13, p. 3631-3643, Oct. 2007.

EL-SHARKAWY, I. et al. Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 8, p. 2009-2027, May. 2008.

EL-SHARKAWY, I. et al. Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 907-922, Mar. 2009.

KEVANY, B. M. et al. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **Plant Journal**, Malden, v. 51, n. 3, p. 458-467, Aug. 2007.

PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica L.* **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 3, p. 283-289, Set. 2005.

RASORI, A. et al. Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 379, p. 2333-2339, Dec. 2002.

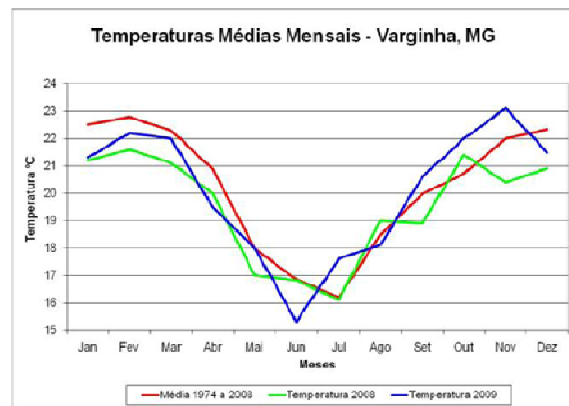
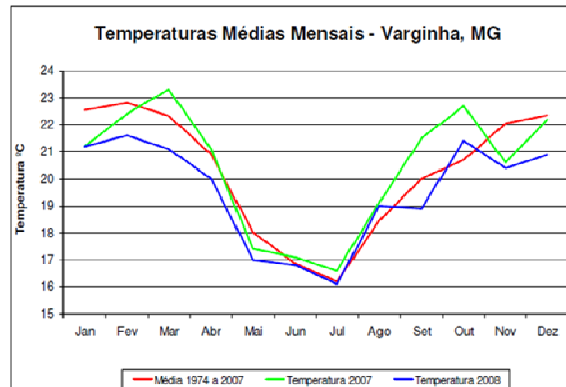
RUPERTI, B. et al. Characterization and expression of two members of the peach 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, n. 3, p. 336-344, Mar. 2001.

SALMONA, J. et al. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 66, n. 1-2, p. 105-124, Jan. 2008.

- SCUDELER, F. et al. Cobertura da pulverização e maturação de frutos do cafeeiro com Ethephon em diferentes condições operacionais. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 1, p. 129-139, Out. 2004.
- SILVA, M. F. et al. Uso do Ethrel na colheita mecanizada e seletiva de café arábica. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 178-182, Dec. 2009.
- TOURNIER, B. et al. New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 550, n. 1-3, p. 149-154, Aug. 2003.
- WANG, A. et al. MdERFs, two ethylene-response factors involved in apple fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 13, p. 3743-3748, Oct. 2007.
- WIERSMA, P. A. et al. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of 'Sunrise' and 'Golden Delicious' apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 204-211, Jun. 2007.
- YIN, X. R. et al. Ethylene-induced modulation of genes associated with the ethylene signalling pathway in ripening kiwifruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 8, p. 2097-2108, May. 2008.

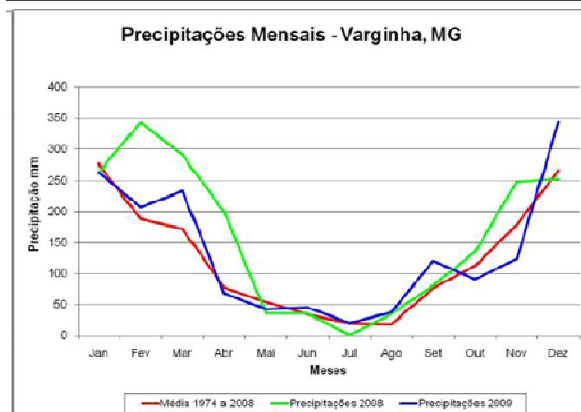
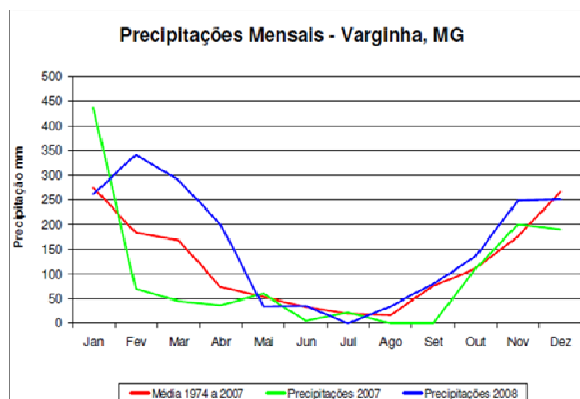
ANEXOS

ANEXO A – Valores médios das temperaturas mensais para a Fazenda do Ministério da Agricultura em Varginha, nos anos de 2007 a 2009*.



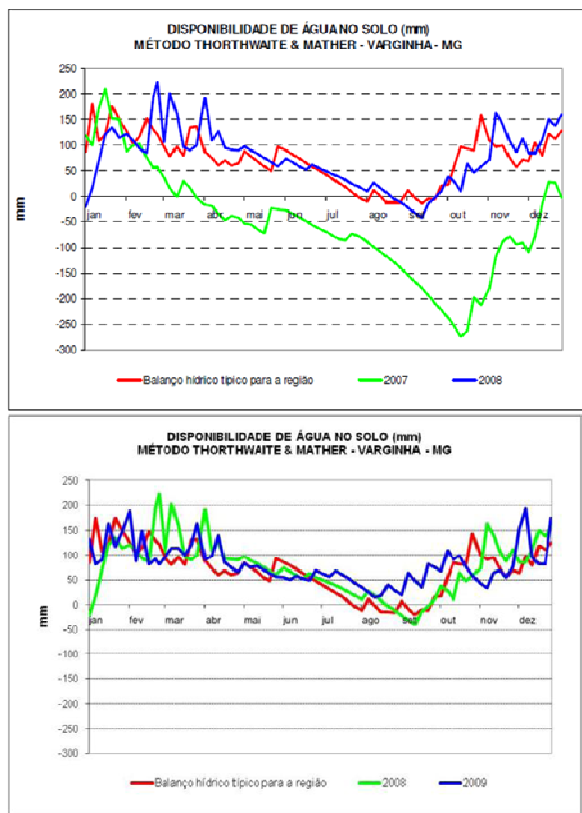
*Fonte: <http://www.fundacaoprocafe.com.br>

ANEXO B – Valores médios das precipitações mensais para a Fazenda do Ministério da Agricultura em Varginha, nos anos de 2007 a 2009*.



*Fonte: <http://www.fundacaoprocafe.com.br>

ANEXO C – Valores médios da disponibilidade média de água no solo mensais para a Fazenda do Ministério da Agricultura em Varginha, nos anos de 2007 a 2009*.



*Fonte: <http://www.fundacaoprocafe.com.br>

