

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Atributos fenológicos, agronômicos e expressão gênica durante a  
frutificação do cafeeiro**

**Cristiana de Gaspari-Pezzopane**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia**

**Piracicaba**

**2007**

**Cristiana Gaspari-Pezzopane**  
**Engenheira Agrônoma**

**Atributos fenológicos, agronômicos e expressão gênica durante frutificação do  
cafeeiro**

**Orientador:**  
**Prof. Dr. JOSÉ LAÉRCIO FAVARIN**

**Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia. Área de concentração:  
Fitotecnia**

**Piracicaba**  
**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Gaspari-Pezzopane, Cristiana de  
Atributos fenológicos, agronômicos e expressão gênica durante frutificação do  
cafeeiro / Cristiana de Gaspari-Pezzopane. - - Piracicaba, 2007.  
105 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Café 2. Expressão gênica 3. Fenologia 4. Fruto – Desenvolvimento 5.  
Influência climática 6. Marcador molecular I. Título

CDD 633.73

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

Ao meu marido RICARDO,  
com muito amor

**DEDICO**

Aos meus pais e irmãos

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tornar tudo possível.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Centro de Café “Alcides Carvalho” do Instituto Agrônomo de Campinas por permitir a realização do projeto em seus campos experimentais e laboratórios.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. José Laércio Favarin e à Dra. Mirian Perez Maluf pela orientação, dedicação e valiosa amizade.

Ao Dr. Oliveiro Guerreiro Filho pelo apoio na condução e avaliação dos experimentos e pela amizade.

Aos demais professores da ESALQ e pesquisadores do Centro de Café “Alcides Carvalho”, pelo apoio e ajuda, em especial à D. Ivone e Dr. Luiz Carlos Fazuoli que contribuíram para que este estudo se concretizasse.

Aos professores, funcionários e alunos do programa de Pós Graduação em Fitotecnia, pelo apoio e ajuda durante todo o curso, em especial à Luciane Aparecida Lopes Toledo.

Aos colegas de curso pela divertida e saudável convivência.

Aos colegas de laboratório, pela convivência e palavras de incentivo.

Aos amigos Paula, Roberta, Thais, Marcos, Milene, Valéria, Ne, Michelle, Carla e Gisa pela ajuda na concretização deste e, principalmente, pelos grandes momentos que passamos juntos durante esta etapa.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos, amigos e familiares que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao meu marido Ricardo, por sua contribuição na condução e avaliação do trabalho, por seu amor e apoio incondicional nessa etapa da minha vida.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Importância econômica do café no Brasil.....	20
2.2 O cafeeiro: origem, classificação botânica e biologia da reprodução.....	20
2.3 Cultivares de <i>Coffea arabica</i> .....	21
2.4 Fenologia do cafeeiro.....	23
2.5 Desenvolvimento dos frutos do cafeeiro.....	26
2.6 Expressão gênica diferencial no desenvolvimento dos frutos de café .....	28
2.7 Melhoramento do cafeeiro e o genoma do café .....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Avaliações fenológicas e agronômicas .....	32
3.1.1 Avaliações fenológicas .....	32
3.1.1.1 Desenvolvimento fenológico.....	33
3.1.1.2 Porcentagem de frutos maduros na colheita.....	33
3.1.2 Avaliações agronômicas.....	34
3.1.2.1 Produção e rendimento .....	34
3.1.2.2 Tipos de sementes .....	35
3.1.2.3 Tamanho dos grãos.....	35
3.1.3 Análise estatística .....	36
3.2 Expressão gênica.....	36
3.2.1 Busca de ESTs em banco de dados de café.....	36
3.2.2 Coleta de material vegetal e isolamento de RNA total .....	37
3.2.3 Síntese de cDNA.....	38
3.2.4. Amplificação por PCR e eletroforese.....	38
3.2.5 Clonagem e sequenciamento.....	39

3.2.6 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Avaliações Fenológicas e Agronômicas.....	42
4.2 Expressão gênica.....	48
4.2.1 Data-mining.....	49
4.2.2 Análise da expressão gênica por RT-PCR e PCR em tempo real.....	52
4.2.2.1 Grupo de genes relacionados com o desenvolvimento do embrião.....	52
4.2.2.2 Grupo de genes relacionados com os componentes químicos dos frutos.....	60
4.3 Considerações Gerais.....	87
CONCLUSÕES.....	92
REFERENCIAS.....	93
ANEXO.....	104

## RESUMO

### **Atributos fenológicos, agronômicos e expressão gênica durante a frutificação do cafeeiro**

As características relacionadas à frutificação do cafeeiro são altamente influenciadas pelo ambiente. Portanto, a associação de análises agronômicas, fenológicas e genômicas são necessárias para o entendimento desse processo. Esses estudos fazem parte do programa de melhoramento genético do café, com o objetivo de obter plantas com maior uniformidade de maturação, duração de ciclo e bebidas específicas. Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram estabelecer padrões agronômicos e fenológicos comparativos entre diferentes cultivares e safras de café, caracterizar genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento dos frutos de cafeeiro arábica e correlacionar genes diferencialmente expressos com atributos fenológicos e agronômicos. Os estudos foram realizados no Centro de Café do IAC em Campinas, SP. As cultivares de *Coffea arabica* utilizadas foram: Mundo Novo, Catuaí Vermelho, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce, nas safras de 2004/2005 e 2005/2006. Os atributos fenológicos foram avaliados com base no desenvolvimento do ciclo fenológico e na porcentagem de frutos maduros na colheita. As avaliações agronômicas foram avaliadas baseadas nas características tecnológicas do produto como, produção e rendimento, tipos de sementes e tamanho dos grãos. A expressão gênica diferencial foi avaliada por método semi-quantitativo e quantitativo RT-PCR em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos. Sequências de genes específicos foram identificadas por buscas em bancos de dados do Programa Genoma Café e no Genbank, possibilitando a construção de oligonucleotídeos específicos para cada gene. Em geral, os resultados das análises confirmaram a influência ambiental no desenvolvimento dos frutos do cafeeiro, especialmente as variações hídricas e de temperatura. Diferenças significativas foram identificadas entre as cultivares, em relação aos atributos fenológicos e agronômicos, principalmente na safra 2005/2006 quando foi possível discriminar as cultivares quanto à duração do ciclo fenológico. A expressão gênica durante o desenvolvimento dos frutos, seguiu padrão similar entre as cultivares, mesmo comparando diferentes anos agrícolas. Conseqüentemente, essas análises permitiram a identificação de genes candidatos a serem usados como marcadores genéticos das fases de frutificação de *C. arabica*, como: crescimento (PAL, CHS e manB), transição do crescimento para o início da maturação (csp1, GLA e ER5), maturação e amadurecimento (CS, AAT, ACS, ACO, ETR e ICL) e transição da maturação para o amadurecimento (PAL). Esses genes marcadores em associação com atributos agronômicos e fenológicos, podem ser utilizados como parâmetros moleculares para a definição de estádios adequados à colheita, assegurando composição final específica dos frutos e da qualidade da bebida.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; Fases do desenvolvimento dos frutos; Fenologia; Genes expressos; Influência climática; Marcadores moleculares

## ABSTRACT

### Phenological and agronomic attributes and gene expression during the fruit development of the coffee tree

Coffee fruit development and ripening are biological processes largely influenced by environmental conditions. Therefore, the association of agronomic, phenologic and genomic analyses is necessary for a broad comprehension of these processes. This type of approach is already part of coffee breeding programs, which aimed the development of coffee cultivars bearing maturation uniformity, controlled life cycle and specific cup qualities. In this context, the main objectives of this dissertation are to establish comparative patterns of fruit ripening among different coffee cultivars, to characterize gene expression during fruit development, and to correlate possible differential gene expression with agronomic and phenologic traits. All investigations were performed at the experimental field of the Coffee Center/IAC, Campinas, SP. The *Coffea arabica* cultivars Mundo Novo, Catuaí Vermelho, Icatu Vermelho, Obatã and Icatu Precoce, years 2004/2005 and 2005/2006, were evaluated regarding phenologic cycle and percentage of cherry fruits at harvesting time. Agronomic traits evaluated included productivity and outturn, type of seeds and grain size. Differential gene expression was evaluated through semi-quantitative and quantitative RT-PCR, in all stages of fruit development. Sequences of selected genes were identified through blast searches in the database of the Coffee Genome EST Project and the Genbank, and used to design gene-specific primers. In general, analyzed results confirmed the environmental influence over fruit development, especially temperature variations during evaluated seasons. Significant differences were identified among cultivars regarding phenologic and agronomic traits, especially in the year 2005/2006 where life cycle duration allowed cultivar discrimination. Gene expression during fruit development followed a similar pattern among evaluated cultivars, even when comparing different harvesting years. Therefore, these patterns allowed the identification of candidate genes for use as genetic markers of *C. arabica* fruit development phases, such as growing (PAL, CHS and manB), transition from growing to maturation (csp1, GLA, ER), maturation and ripening (CS, AAT, ACS, ACO, ETR, ICL) and transition from maturation to ripening (PAL). These gene-markers, in association with agronomic and phenological traits, may be used as molecular parameters for the definition of best colleting stage, ensuring specific final coffee fruit composition and cup quality.

Keywords: *Coffea arabica* L.; Fruit development stages; Phenology; Gene expression; Ripening; Climate influence; Molecular markers

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquematização das seis fases fenológicas do cafeeiro arábica, durante 24 meses, nas condições climáticas tropicais do Brasil, extraído de Camargo e Camargo (2001).....	23
Figura 2 - Escala de notas para o desenvolvimento fenológico do cafeeiro, extraído de Pezzopane et al. (2003) .....	25
Figura 3 - Fases de maturação de frutos de café identificadas na colheita: verde, verde-cana, cereja, passa e seco.....	34
Figura 4 - Fases de desenvolvimento dos frutos de cafeeiro coletados para caracterização gênica: ovário fecundado (ov), fruto chumbinho (ch), fruto em expansão (ex), fruto verde (v), frutos verde-cana (vc), fruto cereja (c) e endosperma maduro (en).....	37
Figura 5 - Épocas de ocorrência de estádios fenológicos em cafeeiro (0-gema dormente; 1-gema entumescida; 2-abotoado; 3-florada; 4-pós-florada; 5-chumbinho; 6-expansão dos frutos; 7-fruto verde; 8-fruto verde-cana; 9-fruto cereja; 10-fruto passa; 11-fruto seco), para a florada principal, nos anos agrícolas de 2004/05 (A) e 2005/06 (B), para o município de Campinas, SP.....	44
Figura 6 - Balanço hídrico e temperatura para o período de julho de 2004 a junho de 2006, para o município de Campinas, SP.....	45
Figura 7 – Análise de componentes principais das variáveis fenológicas associadas às cultivares Obatã (OB), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Mundo Novo (MN) e Icatu Precoce (IP) nas safras 2004/05 e 2005/06. Representadas no plano 1-2.....	46
Figura 8 - Análise de componentes principais das variáveis agronômicas associadas às cultivares Obatã (OB), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Mundo Novo (MN) e Icatu Precoce (IP), nas safras 2004/05 e 2005/06. Representadas no plano 1-3.....	47

- Figura 9 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene GN pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 53
- Figura 10 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene SCR pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 54
- Figura 11 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene STM pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 55
- Figura 12 – Quantificação da expressão do gene STM nos frutos de cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)..... 55
- Figura 13 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ARF pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce, nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+). 56

- Figura 14 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ASN1 pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+)..... 57
- Figura 15 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ABA3/FLACCA pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 59
- Figura 16 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene cat pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 60
- Figura 17 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene MS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 61

- Figura 18 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene TS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 62
- Figura 19 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene CS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e menor (-). 63
- Figura 20 – Quantificação da expressão do gene CS nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)..... 63
- Figura 21 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene 4cl pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 64
- Figura 22 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene CCoAOMT1 pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)... 65

- Figura 23 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene PAL pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 67
- Figura 24 - Quantificação da expressão do gene PAL nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)..... 67
- Figura 25 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene CHS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+). 69
- Figura 26 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene IFS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 70
- Figura 27 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene AAT pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e menor (-). 71

- Figura 28 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene GLA pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e menor (-). 72
- Figura 29 – Quantificação da expressão do gene GLA nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)..... 73
- Figura 30 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene manB pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+)..... 74
- Figura 31 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ACS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 76
- Figura 32 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ACO pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 77

- Figura 33 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ERF pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+). 78
- Figura 34 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ETR pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 79
- Figura 35 – Quantificação da expressão do gene ETR nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)..... 80
- Figura 36 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene GR pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 81
- Figura 37 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene DH pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 82

- Figura 38 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ER5 pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)..... 83
- Figura 39 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene csp1 pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e menor (-) 84
- Figura 40 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ICL pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+). 86
- Figura 41 – Quantificação da expressão do gene ICL nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)..... 87

**LISTA DE ABREVIATURAS**

cDNA	DNA complementar
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DEPC	dietil pirocarbonato
dNTP	dioxiribonucleotídeo trifosfato
EDTA	etilenodiamina tetra acetato dissódico
EST	seqüências expressas (“Expressed Sequence Tag”)
HCl	hidróxido de cloro
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
KCl	cloreto de potássio
LB	Luria-Bertani
LiCl	cloreto de lítio
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
MOPS	ácido 3-morfolino-propanossulfônico
PCR	reação de polimerase em cadeia
PVP	polivinilpirrolidona
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
RT-PCR	Transcriptase reversa por reação de polimerase em cadeia
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -Dgalactoside

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* L. possui aproximadamente 100 espécies, cujo centro de origem é o Continente Africano. Apenas as espécies *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café robusta ou conilon) são cultivadas comercialmente. As demais espécies são importantes em programas de melhoramento genético vegetal, por serem fontes de variabilidade genética, principalmente para resistência aos fatores bióticos e abióticos.

Os frutos da espécie *C. arabica* são os mais consumidos, devido as suas características organolépticas que são preferidas pelos consumidores do que da espécie *C. canephora*. Dessa maneira, aproximadamente 70% dos grãos de café comercializados são do tipo arábica e 30% restantes de café robusta.

O Brasil é o maior produtor mundial de café, com uma produção anual (safra 2006/2007) da ordem de 40,6 milhões de sacas. Minas Gerais é o principal Estado produtor de cafeeiro arábica e o Espírito Santo o maior produtor de café robusta. O Estado de São Paulo ocupa a terceira posição 10% da produção nacional.

As plantas da espécie *C. arabica* são alotetraplóides ( $2n = 44$  cromossomos), autofértil e se reproduzem por autofecundação. Essa espécie possui grande número de cultivares disponíveis no mercado, apesar da diversidade genética ser relativamente pequena. Isso se deve ao fato de serem plantas autógamas e, também, por terem sido introduzidos poucos representantes da espécie no Brasil.

O ciclo fenológico do cafeeiro é composto pelas fases vegetativa e reprodutiva. A fase reprodutiva se caracteriza por apresentar várias floradas uma principal, seguida de outras, cujo número varia de um ano para outro, de acordo com a variação climática, da variabilidade genética e de questões relacionadas ao manejo. Esse comportamento do cafeeiro provoca a desuniformidade da maturação, o que ocorre também dentro de uma mesma florada. A diferença de maturação traz inconvenientes à colheita, além de prejudicar a qualidade final da bebida.

Dessa maneira, o conhecimento do comportamento de cultivares em relação ao seu ciclo e a uniformidade de maturação é essencial para fornecer subsídios aos estudos de melhoramento genético para características agrônômicas como a uniformidade de

maturação dos frutos e a duração do ciclo (precoce, média e tardia). Para isso, devem ser estudadas safras consecutivas, submetidas a condições climáticas distintas, bem como os genes envolvidos no crescimento e maturação dos frutos de café. Entretanto, são poucos os trabalhos que identificam os genes expressos nos diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos do cafeeiro, o que já acontece com outras culturas.

As características relacionadas à frutificação do cafeeiro são altamente influenciadas pelo ambiente dessa maneira, torna-se necessária à associação de estudos genéticos e comportamentais da planta. Portanto, as análises genômicas associadas com as análises agronômicas e fenológicas para a caracterização do padrão genético de crescimento e maturação dos frutos do cafeeiro, servirão como base para o delineamento de programas de melhoramento, com vistas à obtenção de plantas com maior uniformidade de maturação e características de bebidas específicas.

Essa pesquisa foi realizada com os seguintes objetivos: (i) estabelecer padrões agronômicos e fenológicos comparativos do desenvolvimento de frutos do cafeeiro entre diferentes cultivares e safras, (ii) identificar genes com expressão diferencial durante o desenvolvimento dos frutos entre as cultivares e as safras; (iii) quantificar a expressão de genes-chave durante as fases fenológicas do cafeeiro, (iv) correlacionar genes diferencialmente expressos durante o crescimento e a maturação dos frutos com as características fenológicas e agronômicas e (v) identificar genes para servir como marcadores de fases de desenvolvimento dos frutos do cafeeiro arábica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância econômica do café no Brasil

O Brasil domina o mercado internacional de café, com produção anual (safra 2005/2006) da ordem de 40,6 milhões de sacas, das quais 31,0 milhões são de cafeeiro arábica (76,4%) e 9,6 milhões, de robusta (23,6%). A área cultivada com café no Brasil é de 2,30 milhões de hectares, dos quais 2,1 milhões estão em produção e 165,8 mil hectares em formação (CONAB, 2007). O setor responde por, aproximadamente, 2 milhões de empregos diretos, o que justifica sua importância sócio-econômica.

Os principais Estados produtores são: Minas Gerais com 49,5% da produção do País, das quais 99,9% são grãos de cafeeiro arábica e o Espírito Santo em segundo lugar (21,3%), em que somente 2,2 milhões são grãos de arábica (quarto lugar entre estados produtores) e 6,5 milhões de grãos robusta (primeiro lugar entre os Estados produtores) e, em terceiro lugar aparece São Paulo, que produz apenas café arábica, com 10,8% da produção nacional (CONAB, 2007).

A expansão cafeeira no país foi possível graças às condições de solo e clima, bem como à diversificação de materiais genéticos pela seleção de cultivares altamente produtivas e adaptadas às diversas condições. O Brasil possui hoje 103 cultivares de *C. arabica* e 10 cultivares de *C. canephora* registradas no Ministério da Agricultura e do Abastecimento, único país no mundo a cultivar duas espécies em escala comercial.

### 2.2 O cafeeiro: origem, classificação botânica e biologia da reprodução

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, tribo *Coffeae* e gênero *Coffea*, o qual possui 103 espécies cujo Centro de Origem é na África, assim distribuídas: África Continental (41 espécies), Ilha de Madagascar (59 espécies) e Ilha de Mascarenhas (3 espécies) (BRIDSON; VERDCOURT, 1988; DAVIS et al., 2006). Recentes estudos moleculares e morfológicos identificaram 10 gêneros da tribo *Coffeae* além do gênero *Coffea*: *Argocoffeopsis*, *Belonophora*, *Calycosiphonia*, *Diplospora*, *Discospermum*, *Nostolachma*, *Psilanthus*, *Tricalysia*, *Sericanthe* e *Xantonnea* Pierre ex Pit. (DAVIS et al., 2006)

A espécie *Coffea arabica* é originária da Etiópia, Sudão e Quênia, e a espécie *Coffea canephora* oriunda de regiões tropicais e subtropicais da África (CHEVALIER, 1947; CHARRIER, 1978; DAVIS et al., 2006). As demais espécies são provenientes das Ilhas de Madagascar e Mascarenhas (BRIDSON, 1982; BRIDSON, 1987; BRIDSON, 1994; BRIDSON; VERDCOURT, 1988; DAVIS et al., 2006). Dentre essas espécies, apenas *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre são utilizadas comercialmente, enquanto as demais são importantes em programas de melhoramento, por serem fontes de variabilidade genética, principalmente para a tolerância a fatores bióticos e abióticos.

A espécie *C. canephora* é diplóide com  $2n = 22$  cromossomos, possui auto-incompatibilidade do tipo gametofítica (CONAGIN; MENDES, 1961), o que a torna alógama, reproduzindo-se por fecundação cruzada. A espécie *C. arabica* é a única tetraplóide ( $2n = 44$  cromossomos) e multiplica-se, predominantemente, por autofecundação, em que a fecundação cruzada varia a uma taxa média da ordem de 10% (CARVALHO; MÔNACO, 1962), em razão das condições climáticas e da ação de polinizadores.

Estudos recentes sugerem que *C. arabica* seja um alotetraplóide formado pela hibridação entre *C. eugenioides* e *C. canephora*, ambas diplóides e que sofreram duplicação após o cruzamento (LASHERMES et al., 1999). Isso explicaria a baixa divergência genética encontrada entre *C. arabica* e as espécies de origem.

No Brasil, encontra-se um dos principais bancos de germoplasma ativos de *Coffea*, localizado no Centro de Café “Alcides Carvalho” do Instituto Agrônomo na cidade de Campinas, possuindo 16 espécies, centenas de híbridos intra e interespecíficos, introduções da Etiópia, mutantes e variedades comerciais, e ainda três espécies do gênero *Psilanthus* (EIRA et al., 2007).

### **2.3 Cultivares de *Coffea arabica***

A diversificação dos materiais genéticos aconteceu em resposta às diferenças das condições edafoclimáticas das regiões produtoras. Dessa maneira, o Instituto Agrônomo (IAC), na cidade de Campinas, iniciou em 1932, um programa de melhoramento do cafeeiro, responsável pelo lançamento de muitas variedades cultivadas (CARVALHO; FAZUOLI, 1993).

No início, o objetivo era selecionar progênies de maior produtividade, depois direcionou para redução de custos de produção, a partir da obtenção de plantas de porte baixo e ou tolerantes a doenças, pragas e nematóides. Atualmente, os objetivos do melhoramento do cafeeiro, além dos citados anteriormente são: qualidade do produto, uniformidade de maturação, agregação de valor por meio de materiais com baixo teor de cafeína, bem como tolerância a fatores abióticos como, por exemplo, ao estresse hídrico (CARVALHO; FAZUOLI, 1993).

Das 103 cultivares de *C. arabica*, registradas no Ministério da Agricultura e Abastecimento, 90% foram desenvolvidas pelo IAC, com destaque para as cultivares: Mundo Novo, Catuaí, Icatu e Obatã.

A cultivar Mundo Novo é uma das mais plantadas no Brasil, devido à sua rusticidade, elevada produção e boa qualidade de bebida. Essa cultivar é oriunda de cruzamento natural, provavelmente, entre as cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho, ambas as espécies de *C. arabica*. As plantas selecionadas passaram por seleções para solucionar alguns defeitos, como: plantas muito alta e pouco produtiva e frutos desprovidos de uma ou das duas sementes (CARVALHO; FAZUOLI, 1993).

As cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo foram obtidas pela hibridação entre cultivares de *C. arabica*, Caturra Amarelo e Mundo Novo, selecionadas por serem plantas vigorosas e com boa produtividade. Os cruzamentos deram origem às plantas de frutos amarelos e vermelhos, bastante produtivas, vigorosas e de porte baixo, o que torna a colheita bem mais econômica (CARVALHO; FAZUOLI, 1993).

A cultivar Icatu é derivada do cruzamento interespecífico entre uma planta tetraplóide da cultivar Robusta (*C. canephora*) e uma de Bourbon Vermelho (*C. arabica*). Objetivou transferir as características de tolerância à ferrugem, produtividade e pericarpo menos espesso, da cultivar de *C. canephora*, para cultivar de *C. arabica*. Após o cruzamento, vários retrocruzamentos foram feitos com Mundo Novo, para que as características da espécie *C. arabica* fossem restauradas, originando a cultivar Icatu Vermelho. Outros retrocruzamentos foram feitos com a cultivar Bourbon Amarelo, cujo resultado foi a seleção do Icatu Amarelo e Icatu Precoce (CARVALHO; FAZUOLI, 1993).

Uma das últimas cultivares lançadas pelo programa de melhoramento do IAC foi a Obatã, derivada do cruzamento de Vila Sarchi (*C. arabica*) com o Híbrido de Timor (cruzamento natural entre *C. arabica* cv. Típica e *C. canephora*) e, posterior, cruzamento natural com Catuaí Vermelho. Essa cultivar apresenta elevada resistência à ferrugem, porte baixo, internódios curtos, folhas largas, frutos grandes e vermelhos com maturação tardia e boa qualidade de bebida (FAZUOLI et al., 2002).

## 2.4 Fenologia do cafeeiro

A fenologia compreende o estudo de eventos periódicos da vida da planta em função da sua reação às condições do ambiente, como por exemplo, manejo cultural, temperatura, precipitação e fertilidade do solo.

O ciclo fenológico do cafeeiro apresenta duas fases, as quais ocorrem simultaneamente: vegetativa e reprodutiva. Em razão disso, as plantas demora dois anos para completar o ciclo, o que não ocorre com a maioria das plantas, que florescem e frutificam no mesmo ano fenológico. Esse acontecimento é chamado de bienalidade, que Camargo e Camargo (2001) descrevem como a sucessão dessas fases (vegetativa e reprodutiva) em cafeeiros arábica, nas condições climáticas do Brasil (Figura 1).

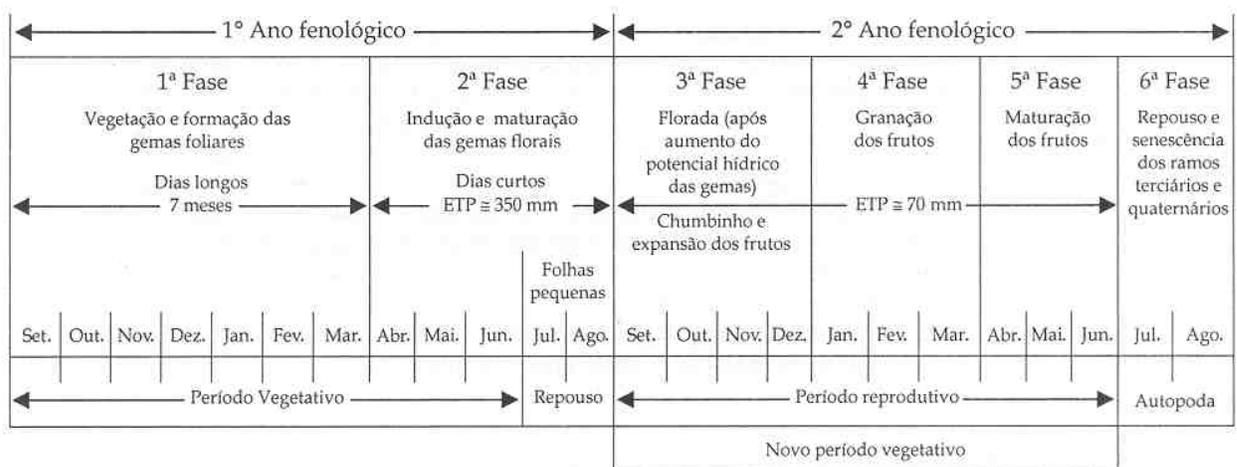


Figura 1 – Esquemática das seis fases fenológicas do cafeeiro arábica, durante 24 meses, nas condições climáticas tropicais do Brasil, extraído de Camargo e Camargo (2001)

O ciclo fenológico foi subdividido em seis fases distintas: (1) vegetação e formação das gemas foliares; (2) indução e maturação das gemas florais; (3) florada; (4) granação dos frutos; (5) maturação dos frutos e (6) repouso e senescência dos ramos terciários e quaternários.

No primeiro ano são formados os ramos vegetativos, com gemas axilares nos nós, que depois são induzidas e se transformam em gemas reprodutivas (GOUVEIA, 1984). Esse processo é determinado por condições ambientais como a interação entre a redução do fotoperíodo e temperaturas amenas (CAMARGO, 1985; CAMARGO; CAMARGO, 2001; CAMAYO-VELEZ et al., 2003; RENA; MAESTRI, 1987).

Após a indução, a gema floral amadurece, entram em dormência e se torna apta à antese, que ocorre, principalmente, após chuva ou irrigação (RENA; MAESTRI, 1987).

O segundo ano fenológico inicia-se com a florada, seguida pela formação dos frutos, compreendida pelas fases de crescimento: chumbinhos, expansão e granação, seguida pela fase de maturação. O estresse hídrico durante as fases de crescimento dos frutos afeta a granação e resulta em frutos pequenos (peneira baixa), bem como poderá formar frutos chochos (frutos desprovidos de uma ou das duas sementes). Na maturação dos frutos, a ocorrência de deficiências hídricas moderadas poderá beneficiar a qualidade da bebida (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

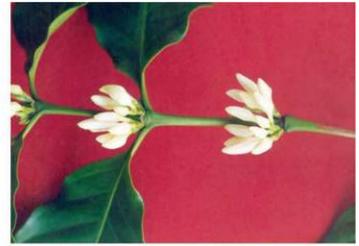
A fase reprodutiva é detalhada por Pezzopane et al. (2003) em que utiliza escala para a avaliação fenológica do cafeeiro arábica, por meio de imagens das fases que variam de 0 a 11, como: gema floral dormente (0); gema floral entumecida (1); botão floral abotoada (2); florada ou antese (3); pós-florada com queda de pétalas (4); fruto "chumbinho", no início do crescimento após a fecundação (5); frutos em expansão (6); grão verde, com formação do endosperma e granação dos frutos (7); grão verde cana, corresponde ao início da maturação devido à mudança de cor (8); fruto cereja completou a maturação (9); fruto passa - início da senescência (10); e fruto seco (11) (Figura 2).



0 - Gema dormente



1 - Gema entumescida



2 - Abotoado



3 - Florada



4 - Pós-florada



5 - Chumbinho



6 - Expansão dos frutos



7 - Grão verde



8 - Verde cana



9 - Cereja



10 - Passa



11 - Seco

Figura 2 - Escala de notas para o desenvolvimento fenológico do cafeeiro, extraído de Pezzopane et al. (2003)

Durante a fase reprodutiva, as etapas podem ocorrer mais de uma vez, ou seja, o cafeeiro arábica, além da florada principal, apresenta sucessivas floradas em razão da variação climática, da variabilidade genética (RENA; MAESTRI, 1987) e, em razão do manejo, como: a irrigação (RIBEIRO et al., 2004; MATIELLO; GARCIA, 2006) e arborização (LUNZ, 2006). Esse acontecimento faz com que a maturação seja desigual inclusive dentro da mesma florada. A diferença de maturação entre e dentro das floradas dificulta a colheita, tornando-a onerosa e prejudicial à qualidade da bebida, pois se não houver a separação dos frutos, com diferentes estádios de maturação, antes da secagem, o produto final apresentará defeitos.

## **2.5 Desenvolvimento dos frutos do cafeeiro**

O desenvolvimento de um fruto compreende uma série de eventos desde o início do crescimento até a sua morte, cujas fases são: crescimento, maturação, amadurecimento e senescência. O crescimento é responsável pelo aumento de tamanho do fruto. A maturação resulta na maturidade fisiológica, quando o fruto continua seu desenvolvimento mesmo que separado da planta. Durante o amadurecimento ocorre uma série de processos que resultam em características estéticas e de qualidade, evidenciadas por mudanças na composição, coloração, textura, sabor e aroma. A senescência se caracteriza por uma série de eventos que provoca a morte celular (CASTRO et al., 2005; NATCHTIGAL et al., 1997).

O fruto do cafeeiro é uma drupa com duas lojas de polinização independente as quais originam duas sementes. Os frutos maduros são formados pelo exocarpo (casca), responsável pela expressão da coloração do fruto do café durante o desenvolvimento; mesocarpo (polpa ou mucilagem), rico em açúcar e água. Durante a maturação o açúcar diminui, provavelmente, devido a modificações da pectina; endocarpo (pergaminho), tecido duro e lignificado; película prateada (testa ou resto de tegumento) e o endosperma (tecido triplóide que contém as reservas para consumo do embrião). O embrião encontra-se inserido no endosperma. (ANTUNES FILHO; CARVALHO, 1954; COSTE, 1959; DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Juntos, o exocarpo, mesocarpo e endocarpo constituem o pericarpo.

O desenvolvimento dos frutos de café é um processo longo, que pode variar de 6 a 8 meses para as cultivares de *C. arabica* e 9 a 11 meses para as cultivares *C. canephora*. Após a fecundação ocorre o desenvolvimento do perisperma (fase maternal), caracterizado pela divisão e alongação das suas células (perisperma) e pelo início da divisão das células do endosperma. Essas fases correspondem aos frutos chumbinho e em expansão, e na seqüência há o desenvolvimento do endosperma, com a alongação das células deste tecido (endosperma). Nessa fase, chamada de grão verde, o perisperma desaparece gradualmente, substituído pelo endosperma. Finalmente, ocorre a fase de maturação do pericarpo (fases verde-cana e cereja), em que se verifica o endurecimento do endosperma e a alteração da cor do pericarpo, pelo acúmulo gradual de proteínas de reserva, sacarose e polissacarídeos complexos, as quais são as principais reservas da semente, além da degradação da clorofila e produção de pigmentos (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006; PEZZOPANE et al., 2003).

Em relação à fisiologia da maturação dos frutos de cafeeiro, Pereira et al. (2005) observaram que nos frutos verde-cana há um rápido crescimento na produção de etileno, que decresce nos frutos cereja, o que indica serem os frutos climatéricos. Tais frutos são aqueles em que a maturação é acompanhada por um aumento na respiração e na produção de etileno (CASTRO et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004).

As modificações bioquímicas que levam à maturação de frutos climatéricos incluem o aumento na atividade de enzimas responsáveis pela biossíntese de etileno, SAM sintase (S-Adenosil-mationina), ACC sintase (ácido 1-carboxílico 1-amino ciclopropano) e ACC oxidase, assim como a degradação da parede celular, o acúmulo de pigmentos, a formação de aroma e de metabólicos secundários (CASTRO et al., 2005).

A giberelina, o ácido abscísico, a auxina e a citocinina também estão relacionadas com o processo de maturação. Durante esse processo há diminuição da concentração de giberelina e aumento de ácido abscísico e a presença de auxina retarda a maturação, enquanto que o aumento de citocinina antecipa o processo (CASTRO et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004).

## 2.6 Expressão gênica diferencial no desenvolvimento dos frutos de café

Durante o processo de crescimento, maturação e amadurecimento dos frutos de cafeeiro, vários genes são ativados como aqueles relacionados com a síntese de fenóis, oligossacarídeos, lipídeos, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácidos alifáticos, cafeína, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas e ácidos húmicos (CLARKE; MACRAE, 1985). O conhecimento sobre a expressão desses genes é essencial como subsídio aos estudos de melhoramento de características agrônômicas importantes, tais como: uniformidade de maturação e duração do ciclo fenológico. Entretanto, ainda faltam estudos que identifiquem e caracterizem esses genes diferencialmente expressos, a exemplo da cultura de tomate.

O crescimento, maturação e amadurecimento de frutos são influenciados por fatores internos e externos, que incluem regulação da expressão gênica, hormônios, luz e temperatura. Os estudos de expressão gênica estão contribuindo para muitas descobertas e esclarecimento de inúmeras dúvidas.

Em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), muitos trabalhos foram realizados durante o desenvolvimento dos frutos, o que possibilitou caracterizar a expressão diferencial dos genes relacionados a esse processo. Os principais genes estudados relacionam ao etileno, incluindo os da via biossintética, os precursores e os fatores de transcrição relacionados a esse hormônio (MOORE et al., 2002; FEI et al., 2004; ADAMS-PHILLIPS et al., 2004; ALBA et al., 2005).

Utilizando-se microarranjos de cDNA foram identificados 869 genes com expressão diferencial durante o desenvolvimento dos frutos de tomateiro. Esses genes são dependentes do etileno e incluem receptores, fatores de transcrição, pigmentos, proteínas de reserva, açúcares, ácidos orgânicos, antioxidantes, compostos voláteis, entre outros (ALBA et al., 2005). Estudando-se mutantes pelas técnicas de *Northern-blot* e microarranjos, Moore et al. (2002) identificaram cDNAs diferenciais para 10 estádios de maturação.

Em cafeeiro, algumas pesquisas foram feitas como, por exemplo, a caracterização da expressão dos genes de maturação (PEREIRA et al., 2005). No entanto, ainda são poucos, e predomina trabalhos relacionados com genes envolvidos na via biossintética da cafeína e dos ácidos clorogênicos.

A cafeína sintase, a teobromina sintase e a metilxantosina sintase são as enzimas da via biossintética da cafeína e os estudos dos genes correspondentes evidenciaram que os mesmos são expressos em diferentes tecidos da planta como: folhas, flores e, principalmente, nos frutos, mesmo quando imaturos (ASHIHARA; CROZIER, 1999; MIZUNO et al., 2003). Lin et al. (2005), utilizando as técnicas RT-PCR e *Northern-blot* também realizaram estudos que evidenciaram a participação dos genes da via biossintética da cafeína em diferentes tecidos das plantas como endosperma e folhas jovens. Os genes da teobromina sintase e da cafeína sintase expressam em frutos imaturos e, a teobromina sintase também apresentou transcritos em frutos verdes. Os pesquisadores observaram que não houve expressão de metilxantosina, teobromina e cafeína sintase em frutos maduros.

A via biossintética dos ácidos clorogênicos em café envolve as seguintes enzimas: PAL (phenilalanina amônia liase); C4H (cinamato 4-hidroxilase); C3H (coumarato 3-hidroxilase); 4CL (hidroxicinamoil-CoA ligase) e CQT (hidroxicinamoil-CoA:D-quinato hidroxicinamoil transferase) (CLARKE; MACRAE, 1985). Em estudos de análise de expressão por RT-PCR realizados por Melo (2005), o autor observou que a expressão dessas enzimas reduzia à medida que o tecido do fruto envelhecia. No endosperma foi verificado um decréscimo acentuado de expressão no final da maturação dos frutos. Os ácidos clorogênicos estão envolvidos nos processos de maturação dos frutos, qualidade do produto e na defesa das plantas contra os patógenos (CLARKE; MACRAE, 1985).

As enzimas  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -mannanase, precursoras de açúcares, são abundantes nos grãos de frutos de café maduro, por esse motivo são muito estudadas. Marraccini et al. (2001) utilizando a técnica de *Northern-blot*, identificou que o gene responsável pela síntese de  $\alpha$ -galactosidase é mais expresso no endosperma, e o gene que codifica a  $\beta$ -mannanase é expresso, principalmente, durante a germinação dos grãos. Ainda nesse estudo, os autores identificaram que o gene *csp1*, que codifica a proteína de reserva 11S, é abundante no endosperma, principalmente durante a maturação.

A sucrose sintase (SUS) é considerada precursora da qualidade da bebida do café e o gene responsável pela síntese desse açúcar também é bastante estudado.

Utilizando-se análises de quantificação da expressão gênica (*Northern-blot*) e frutos de cafeeiro em diferentes estádios de desenvolvimento, foi observado que a máxima expressão do gene SUS ocorre nas fases finais de desenvolvimento do endosperma (GEROMEL et al., 2006), o que comprova sua importância na maturação dos frutos.

O etileno é o principal hormônio produzido na maturação, cujos precursores são as enzimas ACC oxidase e ACC sintase. Pereira et al. (2005) observaram pela técnica de *Northern-blot* que os frutos verdes de café apresentavam menor acúmulo de transcritos de ACC oxidase, com aumento a partir dos frutos verde-cana e mantendo-se em frutos no estágio cereja. Essa observação indica que o cafeeiro é uma planta climatérica, devido ao aumento da produção de etileno no início da maturação.

A expressão do gene que codifica a proteína isocitrato liase foi estudada em sementes de cafeeiro frescas e durante a secagem, utilizando-se a técnica RT-PCR com oligonucleotídeos específicos (SELMAR et al., 2001). Esses autores observaram uma quantidade maior de transcritos em sementes de cafeeiro durante a secagem e baixa expressão em sementes frescas. Tal constatação sugere que essa enzima é indicadora de germinação e também está relacionada à qualidade da bebida, pois quando há maior expressão observou-se bebida superior.

Análises *in silico* mostram que o genoma do café apresenta grande similaridade com o genoma do tomateiro, mesmo sendo o cafeeiro da família Rubiaceae e o tomateiro da família Solanaceae (LIN et al., 2005). Esses resultados evidenciam a possibilidade de usar genes já identificados nessa planta, como modelo de estudo para cafeeiro, uma vez que as pesquisas em tomateiro estão mais avançadas comparativamente.

## **2.7 Melhoramento do cafeeiro e o genoma do café**

Por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, o melhoramento genético do cafeeiro é muito demorado, o que demanda a implementação de técnicas que facilitem e acelerem a obtenção, seleção e avaliação de novos materiais (FAZUOLI et al., 1999). Entre estas técnicas, as mais promissoras são as metodologias da Biologia Molecular e da Engenharia Genética. A aplicação dessas técnicas, no entanto, só foi possível após o programa Genoma do Café, que proporcionou melhor conhecimento

molecular dos genes do cafeeiro (VIEIRA et al., 2006). Com isso, pode se incluir a engenharia genética como estratégia de melhoramento (CAIXETA et al., 2003).

No projeto Genoma do Café foram seqüenciados genes transcritos, os ESTs (*expressed sequence tags*) das espécies *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, de onde foram obtidos diversos tecidos sadios em diferentes estádios de desenvolvimento (calos, folhas, raízes, flores e frutos) e submetidos a estresse biótico e abiótico (pragas, doenças, frio, calor e seca) (CAIXETA et al., 2003; VIEIRA et al., 2006). No total, foram seqüenciados 214.964 clones de 37 bibliotecas de cDNA. Os ESTs foram agrupados em 17.982 contigs e 32.155 singletons, resultando na identificação de cerca de 33.000 unigenes diferentes (VIEIRA et al., 2006).

O projeto genoma do café gerou informações com o objetivo de que as mesmas fossem utilizadas na: (i) obtenção de cultivar melhorada por meio de novos marcadores moleculares, desenvolvidos a partir de seqüências obtidas; (ii) de plantas selecionadas, com características agronômicas desejáveis, com menor custo e tempo; (iii) para identificar genes relacionados com tolerância às adversidades ambientais; (iv) identificar genes envolvidos com o crescimento e desenvolvimento, como: florescimento e a tolerância a insetos-praga, doenças e nematóides; (v) identificar e estudar a interação de genes e proteínas envolvidas na produção de cafeína, ácidos clorogênicos, carboidratos, aroma e sabor, uma vez que estas (aroma e sabor) são qualidades organolépticas relacionadas à qualidade da bebida; (vi) estudar a evolução e a diversidade de genomas do gênero *Coffea*; (vii) estudar a fisiologia e a genética da multiplicação de cultivares híbridos melhorados e (viii) desenvolver mapas físicos e genéticos do cafeeiro (CAIXETA et al., 2003).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho experimental foi realizado em duas safras consecutivas, 2004/2005 e 2005/2006, no Centro de Café “Alcides Carvalho” do Instituto Agrônômico (IAC), situado no Centro Experimental da Fazenda Santa Elisa, município de Campinas, Estado de São Paulo. A área experimental está localizada a 22° 54'S de latitude, 47°05'W de longitude e 674 m de altitude, com clima tipo Cwa (clima subtropical, com inverno seco e verão úmido e quente), conforme classificação de Köppen (SETZER, 1966).

Esta pesquisa foi realizada num campo de cultivares de cafeeiro arábica, implantado em 2000 com espaçamento de 3,5 m x 0,8 m e 3.570 plantas por hectare. A área experimental é formada por 20 cultivares (10 cv. porte baixo e 10 cv. porte alto), em que cada cultivar é representada por duas linhas de plantas com 40 cafeeiros por linha.

Na safra 2004/2005 foram utilizadas, na pesquisa, as seguintes cultivares: Mundo Novo IAC 388-17 (MN), Catuaí Vermelho IAC 144 (CV), Icatu Vermelho IAC 4045 (IV) e Obatã IAC 1669-20 (OB); e no ano agrícola 2005/2006, além daquelas da safra anterior acrescentou a cultivar Icatu Precoce IAC 3282 (IP).

As atividades experimentais compreenderam os estudos de avaliações de atributos fenológicos, agrônômicos e expressão gênica das cultivares de cafeeiro arábica, em relação ao desenvolvimento dos frutos.

#### **3.1 Avaliações fenológicas e agrônômicas**

As avaliações fenológicas e agrônômicas foram realizadas nas plantas de cada parcela constituída por quatro cafeeiros e quatro repetições.

##### **3.1.1 Avaliações fenológicas**

O desenvolvimento fenológico do cafeeiro envolve as fases vegetativa e reprodutiva, em que, além da florada principal ocorre, com frequência, outras floradas, em razão do ambiente, da constituição genética da planta e do manejo da lavoura.

### **3.1.1.1 Desenvolvimento fenológico**

Durante o período de junho de 2004 a junho de 2006 foram realizadas avaliações do desenvolvimento fenológico das diferentes cultivares de cafeeiro utilizadas no estudo.

As avaliações foram feitas utilizando uma escala fenológica proposta por Pezzopane et al. (2003), em que identifica 12 estádios fenológicos, principalmente para o período reprodutivo (após o repouso das gemas), pela atribuição de valores: (0) gema dormente; (1) gema entumescida; (2) abotoado; (3) Florada; (4) pós-florada (5) frutos chumbinho; (6) frutos em expansão; (7) fruto verde; (8) fruto verde-cana; (9) fruto cereja; (10) fruto passa; (11) fruto seco (Figura 2).

Nas plantas de cada cultivar foi marcado um ramo com orientação norte, no terço médio superior da planta, para cada uma das principais floradas que ocorreram no ano.

Nos ramos marcados foram retiradas as flores das floradas subseqüentes e os frutos chumbinho de floradas anteriores. Na seqüência, atribuiu-se notas relativas ao desenvolvimento fenológico em todos os ramos marcados, com intervalos de 7 a 10 dias, admitindo o estágio atual de desenvolvimento àquele com frequência superior a 50% no ramo.

### **3.1.1.2 Porcentagem de frutos maduros na colheita**

Para todas as cultivares de cada parcela e ano agrícola, no momento da colheita, obteve-se a massa de frutos verde, verde cana, cereja, passa e seco em amostra de, aproximadamente, 500 gramas (Figura 3). O resultado final foi expresso em porcentagem, obtida pela relação entre a massa de frutos de cada fase de maturação e a amostra total de frutos.



Figura 3 - Fases de maturação de frutos de café identificadas na colheita: verde, verde-cana, cereja, passa e seco

### 3.1.2 Avaliações agronômicas

No final das safras 2004/2005 e 2005/2006 foram feitas avaliações de índices de produção, como: (i) produção, (ii) rendimento, (iii) tipos de sementes e (iv) tamanho de grãos nas parcelas experimentais das cultivares de cafeeiro.

#### 3.1.2.1 Produção e rendimento

Ao final de cada safra, quando as plantas apresentaram a maior parte dos frutos no estágio cereja, foi realizada a colheita das parcelas experimentais.

Após a colheita por derriça obteve-se a produção de “café da roça” (mistura de frutos com diferentes níveis de maturação, sem nenhuma separação), utilizando uma balança de precisão.

De cada repetição foram separadas amostras de 3 kg e acondicionadas em sacos de nylon, permanecendo sob secagem natural em terreiro até a umidade de  $110 \text{ g kg}^{-1}$  de frutos e, posteriormente, obteve-se a produção de café em coco.

As amostras de café em coco foram processadas em máquinas de beneficiamento, obtendo-se a massa de café beneficiado. A partir desses dados foi determinado o rendimento por meio da relação entre a massa dos grãos beneficiados e a massa da produção em coco e expresso em porcentagem.

### **3.1.2.2 Tipos de sementes**

O fruto do cafeeiro é uma drupa com duas lojas de polinização independente, as quais originam duas sementes (grão comercial). Quando as duas sementes se desenvolvem normalmente, a semente é classificada como tipo chato ou normal, com uma face plana e outra convexa. Se uma única semente se desenvolve no fruto, a mesma apresenta a forma arredondada e se denomina tipo moca. No caso de mais de um óvulo se desenvolver dentro da loja do ovário, as sementes resultantes ficam embricadas umas às outras, e assumem formas irregulares, as quais são denominadas de concha e grãos quebrados (FAZUOLI, 1977).

Para a determinação dos vários tipos de sementes foi utilizada uma amostra de café beneficiado de 0,4 kg por repetição, utilizada para a determinação de rendimento. Os três tipos de sementes (chato, moca e concha) foram separados manualmente para a obtenção da massa com balança de precisão. As porcentagens foram calculadas em relação à massa total de café beneficiado.

### **3.1.2.3 Tamanho dos grãos**

O tamanho dos grãos de café é uma característica de grande importância na qualidade final da bebida, pois grãos separados em função do tamanho possibilitam uma torra bem mais uniforme.

Para a determinação do tamanho dos grãos, apenas as sementes do tipo “chato” foram submetidas a um conjunto de 15 peneiras com orifícios circulares variando de 12/64 a 26/64 polegadas. Posteriormente, foi obtida a massa dos grãos correspondentes a cada peneira para a determinação da peneira média. Para tanto, multiplica-se o número da peneira pelas respectivas massas de sementes efetuando a somatória dos produtos, a qual será dividida pela massa total dos grãos e o quociente obtido representa o valor da peneira média (FAZUOLI, 1991).

### 3.1.3 Análise estatística

Os dados das avaliações agronômicas e fenológicas foram analisados individualmente pelo teste t, intervalo de confiança e comparação de médias, utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2007). Essas análises foram feitas para que o comportamento das cultivares em relação às variáveis estudadas fosse conhecido.

Posteriormente, os dados foram submetidos à análise multivariada de componentes principais, análise, que se baseia em avaliações de agrupamento para determinar as divergências genéticas (CRUZ, 2006). Essas análises foram feitas com o software STATISTICA.

## 3.2 Expressão gênica

### 3.2.1 Busca de ESTs em banco de dados de café

Os genes responsáveis pelo processo de crescimento e maturação dos frutos de café são ainda pouco conhecidos, por isso as buscas de seqüências de ESTs foram feitas com seqüências de *Coffea* já identificadas, bem como a partir de outras espécies depositadas no banco NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information).

Os genes foram selecionados com base na relação dos mesmos com os seguintes processos: (i) desenvolvimento do embrião, (ii) composição química da semente e (iii) maturação dos frutos.

Com as seqüências identificadas, buscou-se no banco de seqüências de ESTs, oriundos do Projeto Genoma Café, homólogos dessas seqüências de genes específicos. Para isso, utilizou-se o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) e outras ferramentas desenvolvidas pela equipe de Bioinformática do Projeto Genoma Café.

As seqüências identificadas em café serviram como base para a construção de oligonucleotídeos específicos para os locos de ESTs que seriam avaliados.

Os oligonucleotídeos foram construídos com aproximadamente 20 nucleotídeos cada par, temperatura de anelamento máxima de 55° C, ao menos a extremidade 5' iniciando pelos nucleotídeos citocinina ou guanidina e, com produto da amplificação de 300 a 400 pares de bases.

### 3.2.2 Coleta de material vegetal e isolamento de RNA total

O desenvolvimento dos frutos de café pode variar de acordo com a espécie, cultivar, região de cultivo e tratos culturais. Em Campinas, o florescimento dos cafeeiros da espécie *C. arabica* ocorre, em geral, de setembro a outubro e o amadurecimento se dá entre os meses de abril a junho (LEVY et al., 1989). Portanto, os frutos foram coletados nas diferentes fases de crescimento, maturação e amadurecimento, baseada na escala fenológica proposta por Pezzopane et al. (2003). Na safra 2004/2005 coletaram-se frutos nas fases: verde, verde-cana, cereja, enquanto na safra 2005/2006 amostrou-se ovário fecundado, frutos chumbinho, expansão, verde, verde-cana, cereja e endosperma maduro (Figura 4).



Figura 4 - Fases de desenvolvimento dos frutos de cafeeiro coletados para caracterização gênica: ovário fecundado (ov), fruto chumbinho (ch), fruto em expansão (ex), fruto verde (v), frutos verde-cana (vc), fruto cereja (c) e endosperma maduro (en)

Os frutos foram coletados e em seguida congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O tecido congelado foi utilizado para a extração do RNA total.

Antes do início da manipulação dos tecidos para a extração do RNA, todo o material e solução foram tratados com DEPC 0,1%, com exceção do Tris-HCl e dos solventes orgânicos, preparados com água livre de DNase e RNase.

O RNA total foi isolado de cada fase de desenvolvimento dos frutos de café, utilizando-se cerca de 2,0 gramas de tecido macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, ao qual se adicionou 20mL de tampão de extração contendo CTAB 2%, PVP 2%, Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 25 mM, NaCl 2M e  $\beta$ -mercaptoethanol 50mM. Depois, foram feitas extrações com clorofórmio até não haver

precipitados na interface entre a fase aquosa e a fase orgânica. O RNA foi precipitado com uma solução de LiCl 12M até a concentração final de 2,5M e, posteriormente, lavado com outra solução de LiCl 2,5M e ressuspendido em aproximadamente 100 $\mu$ L de água tratada com DEPC. Depois que o RNA foi isolado, armazenou-o em biofreezer a -80° C.

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria, medindo-se a absorvância a 220, 240, 260, 270 e 280nm. Na absorvância de 260nm determina-se a concentração de ácidos nucléicos, na relação 270 por 280 a quantidade de fenol e na relação 260 por 270 a pureza, ou seja, a quantidade de proteínas.

A qualidade do RNA também foi verificada em gel desnaturante, feito com agarose 1,5%, MOPS 5X e formaldeído.

### **3.2.3 Síntese de cDNA**

Inicialmente o RNA total foi tratado com a enzima DNase (Invitrogen) adicionando-se ao 400ng de RNA total tampão da reação 10X, enzima DNase I 1,0 U $\mu$ L<sup>-1</sup> e água ultra-pura e após 15 minutos à temperatura ambiente, a DNase foi inativada com EDTA 25mM.

Com o RNA livre de DNase iniciou-se a síntese do cDNA (DNA complementar) que foi feita pela técnica de transcrição reversa, por meio do uso da enzima Super Script III (Invitrogen). A síntese consiste em adicionar aos 400 ng de RNA tratado primer oligo dT 50 $\mu$ M, tampão de anelamento, mistura 2X (MgCl<sub>2</sub> 10mM e dNTP 1mM) e enzima Super Script III, cuja reação será incubada por 50 minutos a 50° C e 5 minutos a 85° C. O cDNA foi armazenado a -20° C.

### **3.2.4. Amplificação por PCR e eletroforese**

As reações de amplificação foram conduzidas em volume final de 25 $\mu$ L, contendo 40ng de cDNA, tampão 10X (100mM Tris-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl), 2 mM de dNTP, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de cada oligonucleotídeo específico (*forward* e *reverse*) e 5 U. $\mu$ l<sup>-1</sup> da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições de

amplificação estabelecidas foram: 95° C (5 minutos), 30 ciclos de 95° C (1 minuto), 52° C (30 segundos) e 72° C (30 segundos), seguidos de 72° C (10 minutos).

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% e corado com brometo de etídeo. A revelação foi feita em fotodocumentador com luz ultravioleta. Os fragmentos correspondentes aos transcritos gênicos foram avaliados em relação à presença, ausência e intensidade visual dos fragmentos amplificados.

Para cada par de oligonucleotídeo e cada conjunto de amostras foi feita duas repetições da reação RT-PCR, com o objetivo de comprovar os resultados.

### 3.2.5 Clonagem e sequenciamento

Após a análise das reações por PCR, os produtos correspondentes aos genes que se mostraram com expressão diferencial e ainda não haviam sido descritos para café, foram selecionados para clonagem e sequenciamento (ANEXO A).

Dessa maneira, as bandas correspondentes aos genes selecionados foram cortadas e purificadas com kit de purificação (Invitrogen - Purelink Quick Gel Extration).

Na reação de ligação foram usadas 3 partes do inserto para 1 parte do vetor 2.1 (Invitrogen), adicionando-se tampão de ligação 10x, enzima T4 DNA ligase e água. A reação foi incubada 14° C durante a noite.

Para a transformação bacteriana, 5µL da reação de ligação foi misturada a 100µL de células competentes (*E. coli* linhagem D45α). Essa mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, depois por 40 s a 42° C e novamente em gelo por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 950µL de meio SOB e as bactérias cresceram por 1 hora a 37° C, com agitação de 200 a 250 rpm.

As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 100µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina, 50mg.mL<sup>-1</sup> de X-Gal e IPTG 100mM. As placas foram incubadas a 37° C durante a noite. Das placas, somente as colônias brancas foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg.mL<sup>-1</sup>). A cultura permanente das colônias selecionadas foi feita acrescentando-se 150µL de glicerol em 850µL de bactéria e conservadas a -80° C.

A purificação dos plasmídeos foi feita utilizando-se o kit Spin miniprep (Qiagen), o qual consiste em isolar apenas o vetor contendo o inserto de interesse, para que possa ser realizado o sequenciamento. O sequenciamento foi feito no Centro de Citricultura “Silvio Moreira” do Instituto Agrônomo (IAC), município de Cordeirópolis, Estado de São Paulo, utilizando-se o seqüenciador 3730 (Applied Biosystems).

As análises dos resultados do sequenciamento foram feitas primeiramente deixando as seqüências no formato GenBank pelo programa Sewer ([www.bioinformatics.org/sewer](http://www.bioinformatics.org/sewer)) e, posteriormente, utilizou-se o programa Vecscreen ([www.ncbi.nlm.nih.gov/vecscreen](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/vecscreen)). Os nucleotídeos correspondentes ao vetor foram retirados, restando apenas os nucleotídeos do inserto. Essas seqüências de nucleotídeos foram comparadas às seqüências disponíveis em bancos de dados pela utilização do programa BLASTX ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). O programa BLASTX deduz a seqüência de aminoácidos a partir da seqüência nucleotídica e compara com seqüências de aminoácidos disponíveis em bancos de dados.

### **3.2.6 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real**

Para o PCR quantitativo foram desenhados oligonucleotídeos para genes representativos dos processos de desenvolvimento do embrião, composição química da semente e maturação dos frutos. A normalização da expressão desses genes foi feita a partir da expressão do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gapdh) de café, chamado gene controle. Cada amostra foi repetida três vezes.

Cada gene selecionado foi analisado na cultivar Mundo Novo no estágio de fruto em expansão, verde e cereja e também, em todas as cultivares estudada no estágio cereja, somente na safra 2005/2006.

O PCR quantitativo é baseado no monitoramento da fluorescência da amplificação do DNA ciclo a ciclo. O número de cópias dos genes foi identificado utilizando-se Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen) que consiste em um corante fluorescente intercalante de DNA. A fluorescência é captada pelo termociclador a cada ciclo da reação de PCR, permitindo a criação de uma curva de amplificação.

As reações de amplificação foram conduzidas em volume final da amostra de 15 $\mu$ L contendo: 50 ng de cDNA, 1X Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> e 200 mM de cada um dos oligonucleotídeos dos genes estudados. As condições de amplificação estabelecidas foram: 50 °C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 30 segundos.

Todas as reações foram realizadas em termociclador ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystem), em triplicata com a presença de controle branco e do gene controle.

Os resultados foram analisados utilizando-se a quantificação relativa, calculada a partir do valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Primeiramente calculou-se o valor de  $\Delta Ct$  ( $Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene controle}}$ ), em seguida o valor do  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct_{\text{gene alvo}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$ ) e, finalmente o valor da quantificação relativa. Ct é o ciclo definido como "treshold", ou seja, onde a fluorescência é detectável e é inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias (TYAGI et al., 1998).

O calibrador utilizado para as análises em Mundo Novo foram amostras de frutos em expansão e para as análises das cultivares na fase cereja o calibrador foi uma amostra de Mundo Novo.

Os métodos de quantificação de expressão dos genes são recentes e por esse motivo, ainda estão sendo estudados gene a gene para se obter qual a quantificação relevante para cada um deles. Dessa maneira, para esse estudo, a significância da quantificação da expressão diferencial foi definida caso a caso, dependendo da categoria do gene, definida de acordo com seu produto e função na planta.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliações Fenológicas e Agronômicas

As avaliações fenológicas foram realizadas com o objetivo de caracterizar as cultivares em relação à duração do ciclo de desenvolvimento dos frutos do cafeeiro arábica, enquanto os aspectos agronômicos com a finalidade de estudar, em condições de campo, a produção do cafeeiro.

Na Figura 5 estão apresentado o desenvolvimento fenológico das cultivares de cafeeiro arábica, desde o estágio gema dormente até fruto seco, nos anos agrícolas 2004/05 e 2005/06.

Na safra 2004/2005 houve apenas uma florada significativa, ocorrida no final do mês de setembro, após chuvas acentuadas, interrompendo um período de deficiências hídricas e seguidas por queda da temperatura média (Figura 6). A deficiência hídrica acentuada no período de repouso das gemas proporcionou uma florada principal bem definida (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

O desenvolvimento dos frutos entre a antese e a fase chumbinho foi semelhante entre as cultivares. Na fase de frutos em expansão dos grãos (6) a cultivar Obatã apresentou desenvolvimento tardio em relação às demais cultivares, as quais não evidenciaram diferença expressiva entre si (Figura 5).

No ano agrícola 2005/2006, nos meses de setembro e outubro, as chuvas foram escassas e irregulares, com ocorrência de diversas floradas, com duas precipitações mais significativas. Uma das floradas ocorreu no começo de setembro e a outra, menos intensa, no início de outubro (Figura 6). Nessa safra, a partir do estágio de frutos chumbinho (5), as cultivares diferiram em relação ao ciclo fenológico, em razão da maturação (9) ter ocorrido em diferentes períodos (Figura 5). Fato semelhante foi observado por Pezzopane et al (2003), no ano agrícola 2001/02.

Durante o primeiro ciclo fenológico (safra 2004/05), a temperatura média foi superior em relação à safra seguinte (Figura 6). No período de fevereiro a abril, correspondente a maturação dos frutos, esses valores foram, aproximadamente, 4°C acima da média do mesmo período da safra 2005/06. Segundo Camargo (1985), a

ocorrência de temperaturas elevadas nesse período acelera o desenvolvimento e a maturação dos frutos, o que provocaria a perda de qualidade da bebida.

Esse fato prejudicou a classificação das cultivares quanto à duração do ciclo reprodutivo, pois somente a cultivar Obatã se diferenciou das demais, com ciclo tardio ou 243 dias após a florada. As outras cultivares, Catuaí, Icatu Vermelho e Mundo Novo apresentaram ciclos médios e iguais a 229, 233 e 231 dias após a antese, nessa ordem (Figura 5).

Verificou-se que o ciclo reprodutivo no ano agrícola 2005/06 variou entre as cultivares, com desenvolvimento dos frutos entre a florada e a presença de cerejas aos 276 dias na cultivar Obatã, 270 dias na cultivar Icatu Vermelho, seguida da cultivar Catuaí Vermelho com 266 dias e Mundo Novo 255 dias. A cultivar Icatu Precoce apresentou o menor ciclo, 235 dias da floração até estágio cereja. Observou redução no tempo de duração de cada fase da frutificação da cultivar (Icatu Precoce) (Figura 5), que antecipou até 41 dias a sua maturação (cereja – 9) em relação a cultivar mais tardia (Obatã).

Esses dados corroboram os encontrados na descrição das cultivares feitas por Guerreiro Filho et al. (2007). A classificação das cultivares quanto à duração dos ciclos pode ser determinada como muito tardia para Obatã, tardia no Icatu Vermelho, média a tardia no Catuaí Vermelho, média para Mundo Novo e precoce no material de mesmo nome - Icatu Precoce.

Por meio da comparação da duração dos ciclos fenológicos estudados, verifica-se que a cultivar Obatã reduziu o ciclo em 33 dias entre a safra 2004/2005 e 2005/2006. Para as cultivares Catuaí e Icatu Vermelho essa redução foi da ordem de 37 dias, enquanto para Mundo Novo, reduziu 24 dias. Esses dados evidenciam o efeito das condições climáticas sobre o desenvolvimento dos frutos do cafeeiro, como constatado por diversos autores (KUMAR, 1979; CAMARGO; CAMARGO, 2001; PEZZOPANE, 2004).

Na Figura 7 são apresentados os resultados da análise multivariada em componentes principais dos atributos fenológicos, levando em consideração a duração do ciclo de desenvolvimento dos frutos e a porcentagem de frutos nos estádios verde,

verde-cana, cereja, passa e seco, na ocasião da colheita dos dois anos agrícolas (2004/05 e 2005/06).

Os resultados apresentados pela análise indicam que o fator 1 é caracterizado pela variável duração de ciclo e o fator 2 pela freqüência de frutos secos e passa.

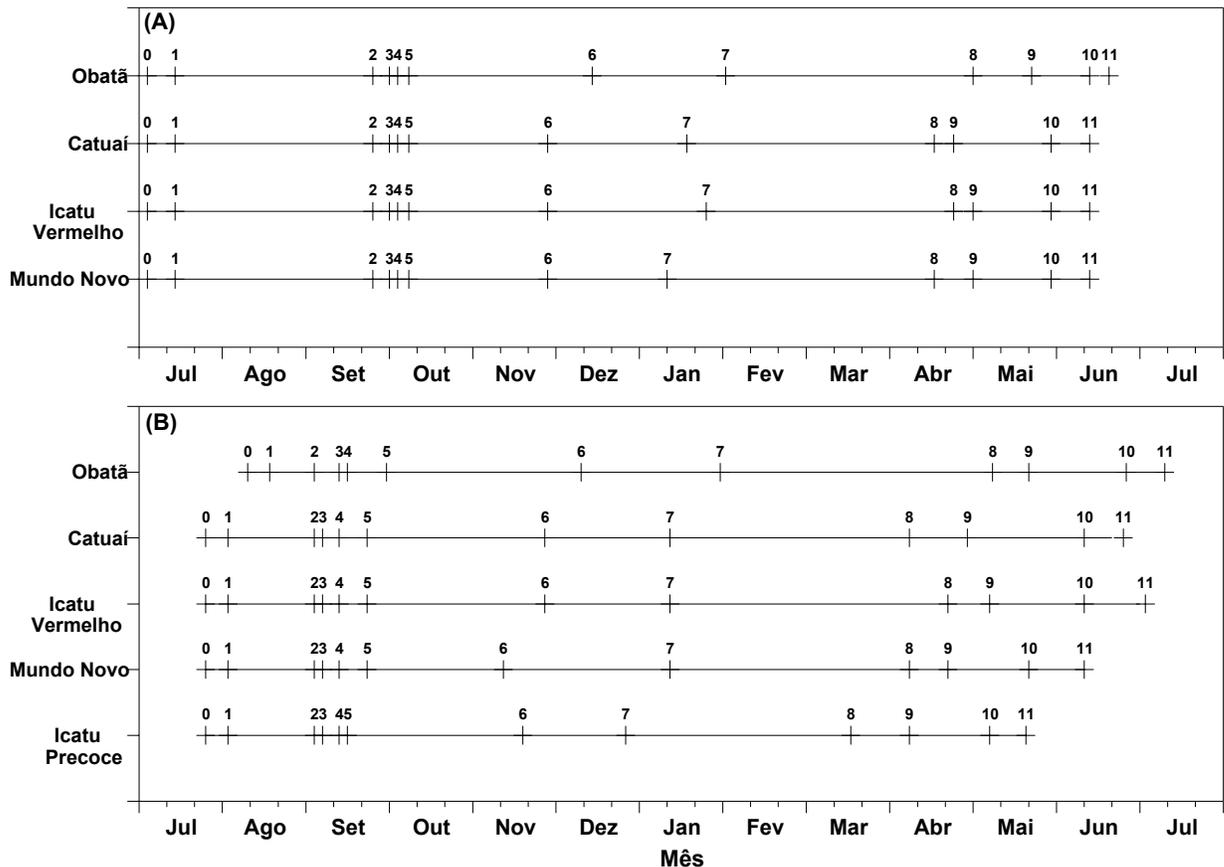


Figura 5 - Épocas de ocorrência de estádios fenológicos em cafeeiro (0-gema dormente; 1-gema entumescida; 2-abotoado; 3-florada; 4-pós-florada; 5-chumbinho; 6-expansão dos frutos; 7-fruto verde; 8-fruto verde-cana; 9-fruto cereja; 10-fruto passa; 11-fruto seco), para a florada principal, nos anos agrícolas de 2004/05 (A) e 2005/06 (B), para o município de Campinas, SP

Observa-se efeito ambiental bastante evidente, como indica a separação das cultivares nos anos agrícolas 2004/05 e 2005/06. As cultivares apresentaram maior quantidade de frutos no estágio cereja na safra 2004/05, enquanto na safra seguinte ocorreu maior porcentagem de frutos verde e verde-cana (Figura 7). As diversas

floradas no ano agrícola 2005/06 podem ter ocasionado grande porcentagem de frutos imaturos na colheita.

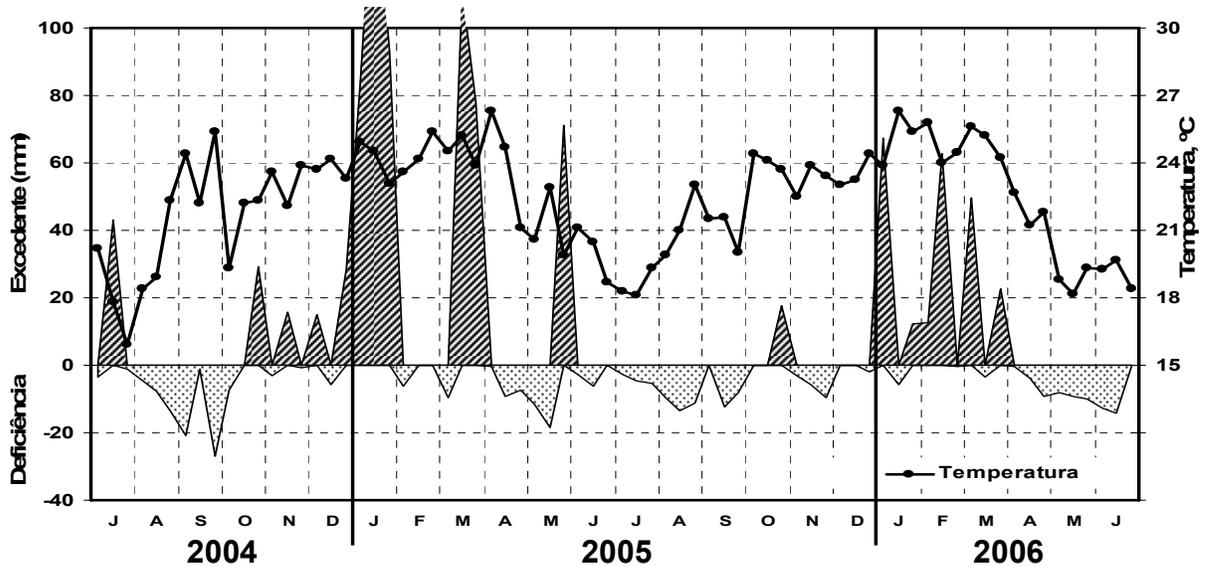


Figura 6 - Balanço hídrico e temperatura para o período de julho de 2004 a junho de 2006, para o município de Campinas, SP

Por meio da análise comparativa das cultivares em componentes principais para atributos fenológicos no ano 2004/05, nota-se uma estrutura de subgrupos (Figura 7). A cultivar Obatã diferenciou das demais (Catuaí, Icatu Vermelho e Mundo Novo) por apresentar menor porcentagem de frutos cereja e maior proporção de frutos verde e verde-cana. Esses resultados confirmam a sua característica de maturação tardia (Obatã) em relação às demais cultivares.

Na safra 2005/2006, com base na mesma análise, observa-se que a cultivar Icatu Precoce apresentou maior porcentagem de frutos seco e fruto passa o que explica sua precocidade (IP) em relação aos demais materiais genéticos. A cultivar Mundo Novo ocupou uma posição intermediária entre a cv. Icatu Precoce e as cultivares Catuaí, Icatu Vermelho e Obatã. A cv. Mundo Novo apresentou maturação média, enquanto os ciclos fenológicos das demais variam de médio a tardio (Figura 7).

A análise da duração do desenvolvimento dos frutos (Figura 5) e a análise em componentes principais das variáveis fenológicas (Figura 7) indicam comportamentos

distintos entre os anos agrícolas, influenciados pelas diferenças climáticas. Contudo, foi possível diferenciar as cultivares quanto à precocidade de maturação.

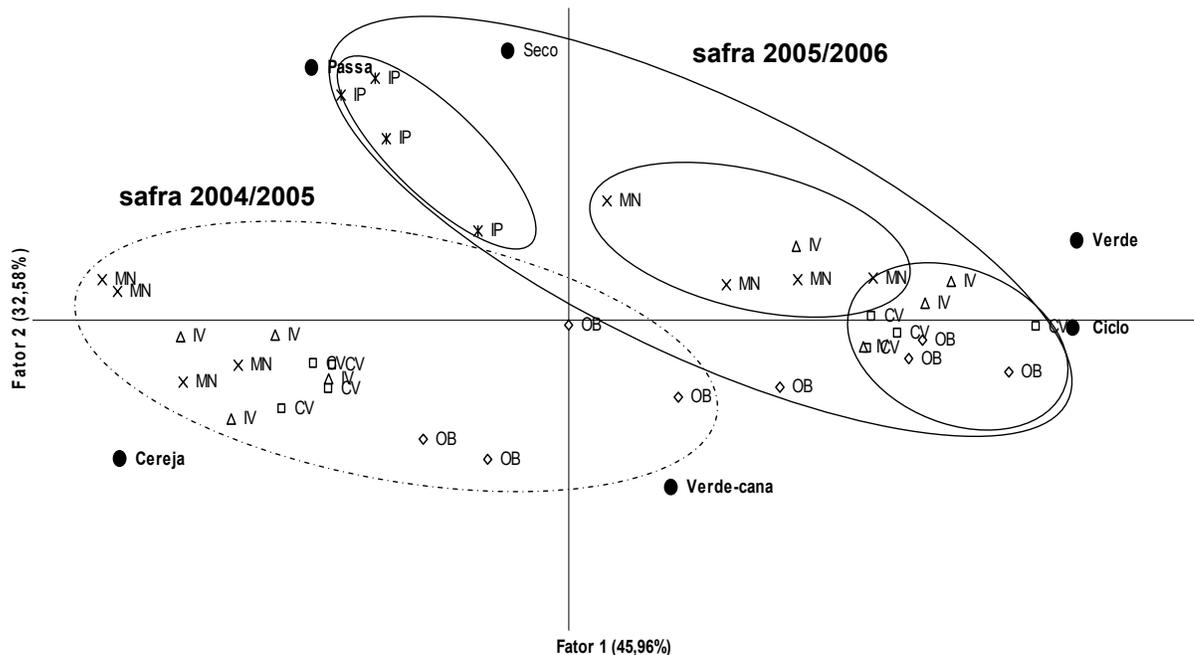


Figura 7 – Análise de componentes principais das variáveis fenológicas associadas às cultivares Obatã (OB), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Mundo Novo (MN) e Icatu Precoce (IP) nas safras 2004/05 e 2005/06. Representadas no plano 1-2

A análise em componentes principais das variáveis agrônômicas como, produção de grãos, rendimento, tamanho de grãos (peneira) e o tipo de sementes (chato, moca e concha) está apresentada na Figura 8. Estes atributos influenciam a qualidade tecnológica do produto – a bebida do café. Da mesma maneira que ocorreu com as análises fenológicas, estas variáveis (atributos agrônômicos) se comportaram distintamente entre as safras agrícolas (Figura 8).

Na Figura 8 o fator 1 evidencia o efeito ambiental, o que caracteriza os anos agrícolas como distintos. Em 2005/06 obteve maior produção, elevada frequência de sementes do tipo chato, grãos de peneira graúda e menor frequência de sementes

moca. O contrário observou-se na safra 2004/05, cuja produção foi baixa, grãos de peneira inferior, menor quantidade de semente do tipo chato e elevada porcentagem de sementes moca. Esses resultados refletem, também, o fenômeno da bialidade de produção do cafeeiro (RENA; MAESTRI, 1987; CAMARGO; CAMARGO, 2001), por serem características indicativas de qualidade tecnológica e influenciada pelas variações ambientais. Os atributos agrônômicos representados pelo eixo 1 não diferem marcadamente entre as cultivares (Figura 8).

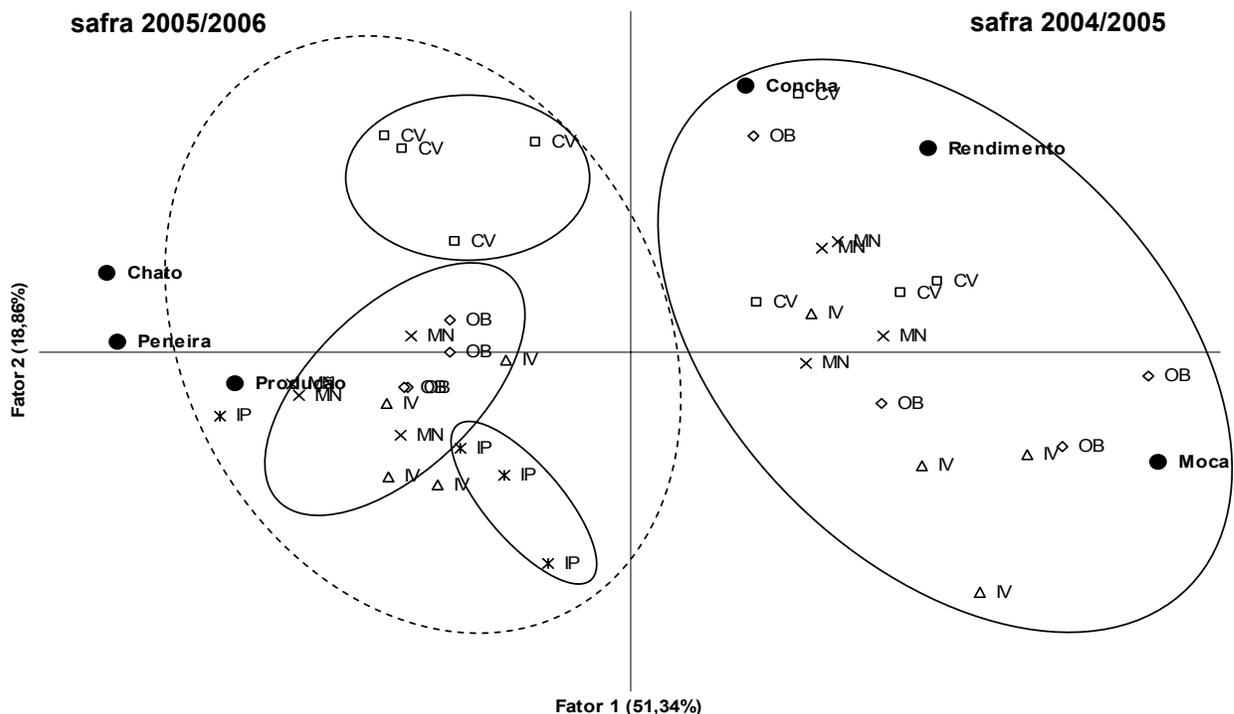


Figura 8 – Análise de componentes principais das variáveis agrônômicas associadas às cultivares Obatã (OB), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Mundo Novo (MN) e Icatu Precoce (IP), nas safras 2004/05 e 2005/06. Representadas no plano 1-3

A grande quantidade de sementes do tipo moca na safra 2004/05 pode ser explicada pela ocorrência de temperatura elevada por ocasião da florada (Figura 6). Mendes et al. (1954), Mônaco (1960) e Pezzopane (2004) também verificaram alta porcentagem desse tipo (moca) associado à ocorrência de fatores ambientais adversos na florada e no início da frutificação.

O fator 2 relaciona especialmente o efeito genético, porque esta bastante correlacionada com a porcentagem de sementes do tipo concha, uma característica varietal definida geneticamente (CARVALHO; KRUG, 1949), com herdabilidade de 59%. Esta observação permite formular a hipótese de que se trata de característica pouco influenciada pelo ambiente (SEVERINO et al., 2000).

As sementes do tipo concha, também chamada de falsa poliembrionia, consistem na presença de mais de uma semente na mesma loja, as quais são envolvidas pelo mesmo pergaminho, resultante do desenvolvimento simultâneo de dois ou mais óvulos fertilizados na mesma loja do ovário (ANTUNES FILHO; CARVALHO, 1954; ALVES, 1955).

No ano agrícola 2005/06 as cultivares puderam ser agrupadas em função dessa característica, com maior porcentagem de sementes do tipo concha em Catuaí Vermelho e menor porcentagem na cultivar Icatu Precoce. As demais cultivares do estudo apresentaram quantidades intermediárias (Figura 8). Na safra anterior essa observação não aconteceu, pois as cultivares não diferiram para essa característica.

## **4.2 Expressão gênica**

A realização dessa pesquisa fundamentou nos seguintes objetivos: (i) identificação de genes com expressão diferencial durante o desenvolvimento dos frutos entre as cultivares e as safras; (ii) quantificar a expressão de genes-chave durante as fases fenológicas do cafeeiro; (iii) correlação entre genes diferencialmente expressos durante o crescimento e maturação dos frutos com características fenológicas e agronômicas e (iv) identificação de genes que sirvam como marcadores das fases de frutificação do cafeeiro arábica. Somente os resultados das análises de RT-PCR da safra 2005/06 foram apresentados, devido à ausência de diferenças significativas na safra anterior (2004/05). A cultivar Mundo Novo foi utilizada como padrão de expressão e comportamento fenológico para comparar as cultivares nas análises de amplificação. As análises de PCR quantitativo (em tempo real) foram feitas na cv. Mundo Novo nas fases de fruto em expansão, verde e cereja, enquanto nas demais cultivares somente no estágio cereja. Nas análises de Mundo Novo utilizou como calibrador a amostra de

frutos em expansão, enquanto nas outras cultivares usou frutos cereja e a cv. Mundo Novo como calibrador.

Essas análises foram realizadas com genes representantes de cada etapa do desenvolvimento dos frutos de cafeeiro, com o objetivo de validar a estratégia experimental adotada. No caso das duas técnicas de PCR apresentarem resultados com o mesmo padrão de expressão, os mesmos serão aplicados para os demais genes.

#### 4.2.1 Data-mining

A partir das análises *in silico* realizadas no banco de genes NCBI e no banco de dados do Projeto Genoma Café foram identificados 28 genes relacionados ao processo de desenvolvimento de frutos (Tabela 1). Desses genes, somente alguns tinham sido descritos para o cafeeiro, por isso utilizou genes identificados de espécies próximas geneticamente, como *Lycopersicon esculentum* ou de espécies modelo como, por exemplo, *Arabidopsis thaliana*. Na ausência de seqüências de boa qualidade ou completas, adotaram-se seqüências de outras espécies, preferencialmente daquelas com maturação climatérica, característica do cafeeiro.

Os genes identificados foram divididos em três grupos de acordo com seu produto e função: (i) desenvolvimento do embrião, (ii) componentes químicos dos frutos e (iii) maturação e amadurecimento dos frutos (Tabela 2).

No grupo de genes ligados ao desenvolvimento do embrião, estão àqueles envolvidos à formação, maturação e germinação do embrião, além de genes resistentes à dessecação. No grupo de genes relativos aos componentes químicos importantes dos frutos, estão à cafeína, ácidos clorogênicos, açúcares e àqueles relacionados com aroma e sabor. Sobre a maturação dos frutos, os genes envolvidos na via biossintética do etileno e com fatores de transcrição e receptores.

Tabela 1 – Análise *in silico* para identificação de transcritos correspondentes aos genes envolvidos no desenvolvimento de frutos do cafeeiro arábica

Genes	Homologia			Tamanho (pb)	
	organismo	acesso	Nº EST café	esperado	observado
ABA3/FLACCA	<i>Arabidopsis thaliana/Lycopersicon esculentum</i>	NM101519/ AY074788	6	317	300
ACO	<i>L. esculentum</i>	AB013101	31	237	250
ACS	<i>L. esculentum</i>	AB013100	2	324	310
AAT	<i>L. esculentum</i>	AY534531	6	341	320
ARF	<i>A. thaliana</i>	AF042196	2	262	250
ASN1	<i>A. thaliana</i>	NM180333	7	344	340
CS	<i>C. arabica</i>	AB086414	66	292	300
CCoAOMT1	<i>C. canephora</i>	EF153933	28	309	300
cat	<i>L. esculentum</i>	AF112368	155	329	300
CHS	<i>L. esculentum</i>	X55194	111	348	340
4cl	<i>C. arabica</i>	AM117807	7	308	300
csp1	<i>C. arabica</i>	Y16976	43	350	350
Dehydrin	<i>C. canephora</i>	DQ333960	22	235	230
EMB3	<i>Picea glauca</i>	L47601	20	337	330
manB	<i>C. arabica</i>	AJ278996	13	352	340
ER5	<i>L. esculentum</i>	U77719	9	345	330
ERF	<i>L. esculentum</i>	AY192367	15	320	300
ETR	<i>L. esculentum</i>	U38666	1	371	370
GLA	<i>C. arabica</i>	L27992	6	202	200
GR	<i>Pisum sativum</i>	X98274	9	363	350
GN	<i>A. thaliana</i>	NM101264	3	198	200
ICL	<i>L. esculentum</i>	U18678	4	310	300
IFS	<i>Glycine max</i>	AF195799	4	349	340
MS	<i>C. arabica</i>	AB048793	36	299	300
PAL	<i>C. canephora</i>	AF460203	15	193	280
SCR	<i>A. thaliana</i>	BT002580	4	325	300
STM	<i>A. thaliana</i>	NM104916	9	327	300
TS	<i>C. arabica</i>	AB048794	60	332	320

Tabela 2 – Grupos de genes relacionados ao desenvolvimento de frutos do cafeeiro definidos de acordo com o produto do gene

Grupo	Gene	Produto
Desenvolvimento do embrião	ABA3/FLACCA	cofator molibdênio sulforase
	ARF	fator resposta a auxina (fator transcrição)
	ASN1	asparagina sintase
	GN	GNOM (fator transcrição)
	SCR	SCARECROW (fator transcrição)
	STM	SHOOT MERISTEMLESS (fator transcrição)
Componentes químicos dos frutos	AAT	álcool acyl transferase
	CHS	Chalcone sintase
	CS	cafeína sintase
	CCoAOMT1	Caffeoyl-CoA metiltransferase
	4cl	4-coumarato CoA ligase
	GLA	$\alpha$ -galactosidase
	IFS	Isoflavona sintase
	manB	Endo $\beta$ -mannanase
	MS	Metilxantosina sintase
PAL	fenilalanina amônia liase	
TS	Teobromina sintase	
Maturação e amadurecimento dos frutos	ACO	ACC oxidase
	ACS	ACC sintase
	Cat	Catalase
	csp1	proteína de reserva 11S
	DH	dehydrin
	EMB3	proteína família LEA durante a embriogenese
	ER5	proteína família LEA em resposta ao etileno
	ERF	resposta ao etileno (fator transcrição)
	ETR	receptor de etileno
	GR	Glutationa redutase
ICL	Isocitrato liase	

## 4.2.2 Análise da expressão gênica por RT-PCR e PCR em tempo real

### 4.2.2.1 Grupo de genes relacionados com o desenvolvimento do embrião

A formação do embrião, desde a gênese até o desenvolvimento na germinação (embriogênese), requer expressão gênica específica. Em *Arabidopsis*, pela seleção de mutantes, foram identificados genes de fatores de transcrição envolvidos nesse processo, tais como: GNOM, SCARECROW, SHOOTMERISTEMLESS, HOBBIT, MONOPTEROS e SHOOT ROOT (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Na presente pesquisa estudou os três primeiros genes, GNOM, SCARECROW e SHOOTMERISTEMLESS. O gene GNOM (GN) é responsável pelo padrão axial, ou seja, garante a polaridade axial, pois está envolvido com a sinalização da auxina. Seu mutante em *Arabidopsis* não apresenta raízes e cotilédones, razão por que não desenvolve polaridade axial (MAYER et al., 1993). O gene SCARECROW (SCR) atua no desenvolvimento do tecido fundamental, fundamental para a diferenciação do tecido e das células do embrião e das raízes primárias, secundárias e também do hipocótilo. Em *Arabidopsis* o mutante para esse gene produz raízes com uma única camada de tecido fundamental, o que leva à sua desestruturação (TAIZ; ZEIGER, 2004; DI LAURENZIO et al., 1996). O SHOOT MERISTEMLESS (STM) é um gene que faz parte da família de homeobox (KNOX) e se expressa, especificamente, em células que se diferenciam em meristema apical da parte aérea e na manutenção da identidade do referido meristema na planta adulta (TAIZ; ZEIGER, 2004). O mutante desse gene em *Arabidopsis*, resulta em indivíduos sem o meristema apical (LINCOLN et al., 1994).

O meristema apical é determinado antes de ser reconhecido morfológicamente, por isso a presença de transcritos desses genes devem ocorrer na fase embrionária, após a fecundação da oosfera, quando se forma o zigoto, com o pólo proximal (pólo radial) e o pólo distal (pólo caulinar) definidos, e estende até o último estágio de desenvolvimento do fruto (CASTRO et al., 2005).

Nessa pesquisa foram observados transcritos amplificados dos genes GN, SCR e STM em todas as fases de desenvolvimento dos frutos de cafeeiro arábica (Figura 9, 10 e 11). Os genes GN e SCR não apresentaram diferença significativa entre as fases fenológicas e tampouco entre as cultivares. No entanto, para o gene STM foram

amplificados transcritos com menor intensidade em frutos nas fases chumbinho, expansão, verde e endosperma maduro (Figura 11). Esses resultados corroboram os obtidos na análise de quantificação da expressão do gene STM, em que se observou pequena diferença de expressão entre as fases expansão, verde e cereja na cv. Mundo Novo e também entre as demais cultivares no estágio cereja (Figura 12). A quantificação da expressão relativa desse gene variou entre 0,5 a 1,0 entre as amostras estudadas e, por se tratar de um fator de transcrição, essas pequenas alterações de expressão são consideradas significativas.

A diferença de expressão desse gene (STM) em relação aos outros (GN e SCR) justifica-se pela sua função na diferenciação de células do meristema apical, menos requerida nas fases intermediárias de desenvolvimento da semente.

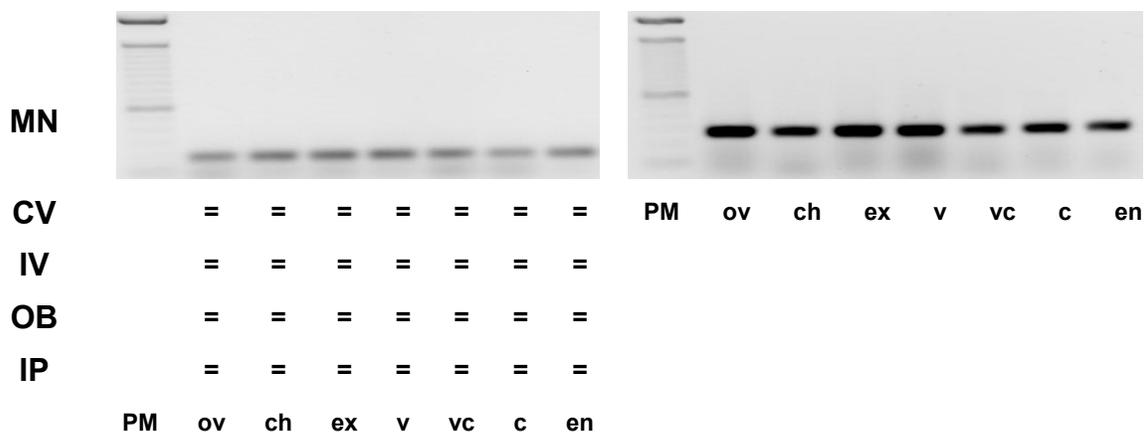


Figura 9 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene GN pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos: ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en. Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

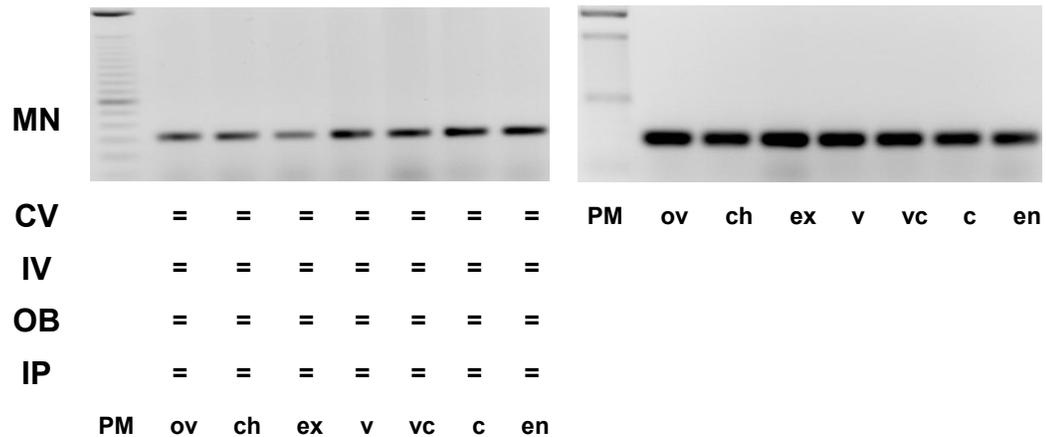


Figura 10 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene SCR pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos: ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en. Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

Nas análises de RT-PCR o gene STM apresentou transcritos com dois fragmentos distintos em todas as cultivares e fases de desenvolvimento dos frutos, em que o menor tamanho é mais intenso do que aquele com mais pares de bases (pb). Esses resultados podem ser decorrentes da amplificação de dois alelos distintos, pois a espécie *C. arabica* é alotetraplóide, o que aumenta a sua probabilidade.

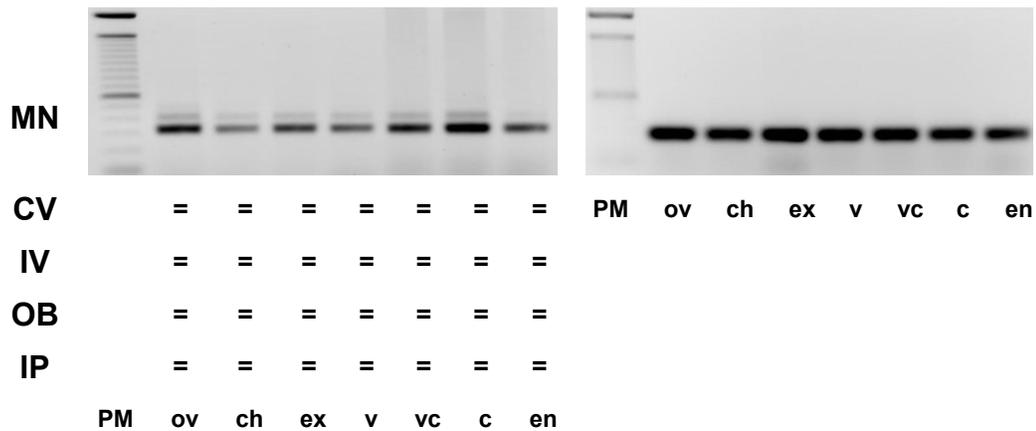


Figura 11 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene STM pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos: ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en. Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

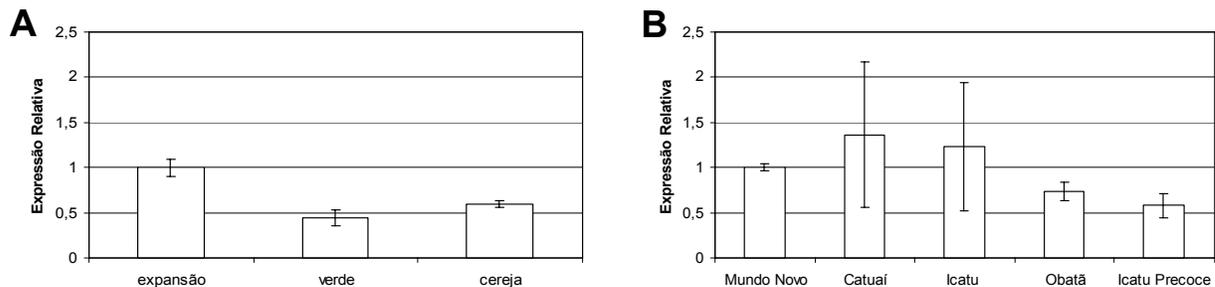


Figura 12 – Quantificação da expressão do gene STM nos frutos de cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)

A auxina é um hormônio vegetal e seus efeitos fisiológicos influenciam desde a germinação até a senescência, como a alongação celular, fototropismo, geotropismo, dominância apical, iniciação e alongação radicular, abscisão de folhas e frutos, efeito

herbicida, partenocarpia, partição de assimilados, produção de etileno e crescimento de frutos. Em altas concentrações, esse hormônio estimula a produção de etileno em partes de plantas intactas e separadas e, por estarem envolvidas na expansão celular, determinam padrões de crescimento em frutos (CASTRO et al., 2005).

A maior expressão do gene ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR), uma família de fatores de transcrição, ocorre na antese e reduz após a fertilização do óvulo (GOETZ, 2006).

Como a auxina está relacionada com a formação de frutos e estímulo à produção de etileno, observou nas análises do presente estudo maior amplificação de transcritos nas fases iniciais de crescimento, com diminuição na fase de grão verde. No fruto verde cana (início da maturação) a expressão aumentou novamente, e decresceu nas fases seguintes (Figura 13).

As cultivares Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce, apresentaram aumento de intensidade dos fragmentos, amplificados nas fases expansão e verde cana, porém, como o controle também apresenta essa variação, elas não são significativas.

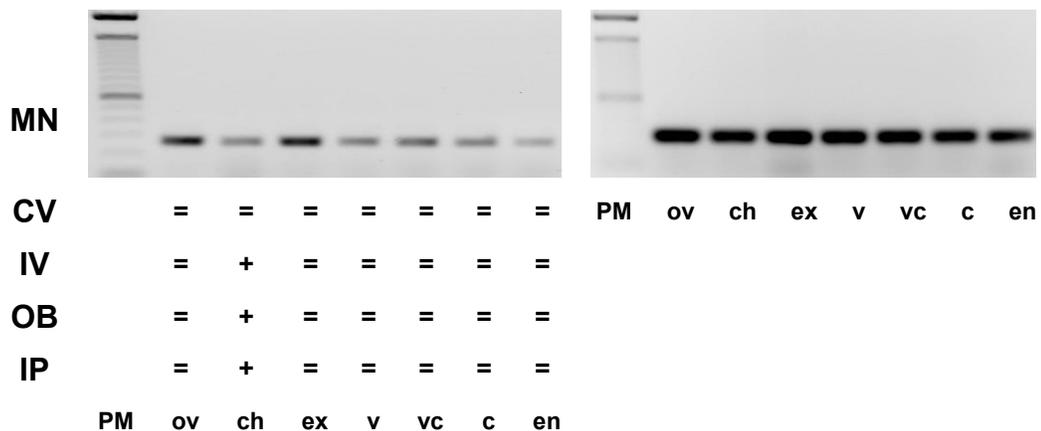


Figura 13 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ARF pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce, nas fases de desenvolvimento dos frutos: ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en. Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+)

Outro gene desse grupo é o ASN1, codificador para a enzima asparagina sintase, muito importante em processos como a germinação e assimilação de nitrogênio (LAM et al., 2003; TAIZ; ZEIGER, 2004). O nitrogênio é requerido em todas as fases de desenvolvimento de frutos, por isso é provável a presença de transcritos correspondentes a esse gene em todas as amostras.

Na Figura 14 são apresentados transcritos amplificados nas fases de frutificação do cafeeiro. Apenas a cultivar Mundo Novo apresentou ausência de transcritos no fruto verde, cujo padrão foi observado em todas as repetições. A ausência de fragmentos em grãos verde de Mundo Novo pode estar associada à mudança entre a fase final de crescimento e o início da maturação (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Essa mudança pode alterar alguns processos metabólicos e, como a cultivar Mundo Novo é a mais antiga entre as cultivares utilizadas no presente estudo, o referido processo foi mais evidente.

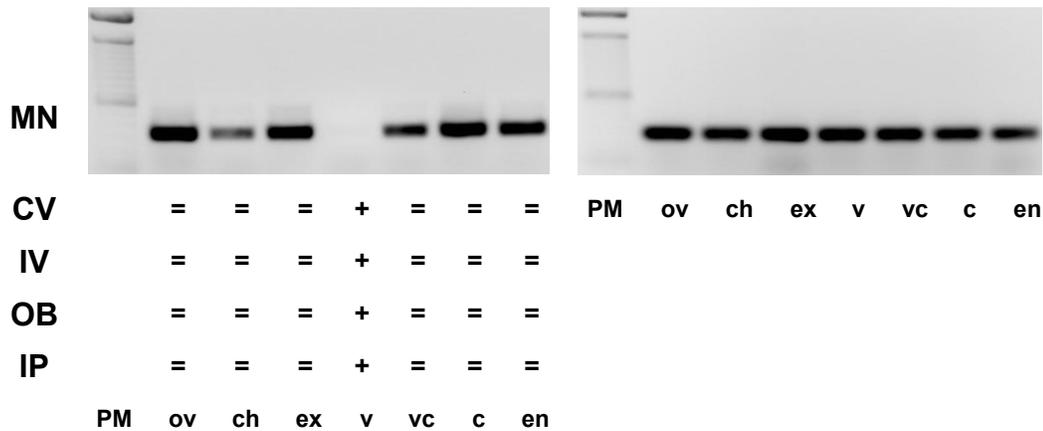


Figura 14 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ASN1 pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos: ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en. Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+)

Um importante regulador de resposta de plantas ao estresse abiótico é o ácido abscísico (ABA) (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esse hormônio está envolvido, principalmente, em respostas aos estresses abióticos como baixas temperaturas, déficit hídrico e salinidade, bem como na germinação das sementes. Além disso, pode afetar outros aspectos do desenvolvimento da planta, pois interage com a auxina, citocinina, giberelina, etileno e brassinosteróides com influência no fechamento estomático, dormência das gemas, atraso de crescimento, estímulo à senescência, abscisão de folhas e frutos, embriogênese e acúmulo de reservas nas sementes (CASTRO et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em condições de frio, deficiência hídrica e estresse salino as plantas acumulam ABA, o que induz a expressão de muitos genes de resposta ao estresse. A indicação de estresse é diminuída em plantas mutantes para a biossíntese de ABA. Análises genéticas baseadas no efeito inibidor de ABA na germinação de sementes evidenciaram redução na biossíntese e ou alteração na resposta de ABA. Esses mutantes em *Arabidopsis* são ABA1, ABA2 E ABA3 (XIONG et al., 2001) e em tomateiro FLACCA e SITIENS (SAGI et al., 1999).

Como quantificado por Da Silva et al. (2005), em embriões de cafeeiro ocorre aumento de ABA no início da maturação e decréscimo quando termina o processo, os quais verificaram máximo acúmulo por volta de 180 dias após a florada em *C. arabica* e 210 dias na espécie *C. canephora*. A amplificação de transcritos referentes ao gene que codifica o fator de transcrição ABA3 (cofator molibidênio sulforase – aldeído oxidase) em todas as fases de desenvolvimento dos frutos, da fecundação até a fase final da maturação está apresentada na Figura 15.

O aumento de intensidade de transcritos ocorreu devido ao estresse hídrico pelos quais passaram os frutos. Esse fenômeno aconteceu, principalmente, após a florada e nas fases finais de desenvolvimento, nos meses de setembro e outubro, maio e junho, respectivamente (Figura 6). Observa-se maior intensidade do fragmento na fase ovário, quando houve déficit de 10 mm, bem como na fase cereja com déficit de 20 mm (Figuras 6 e 15).

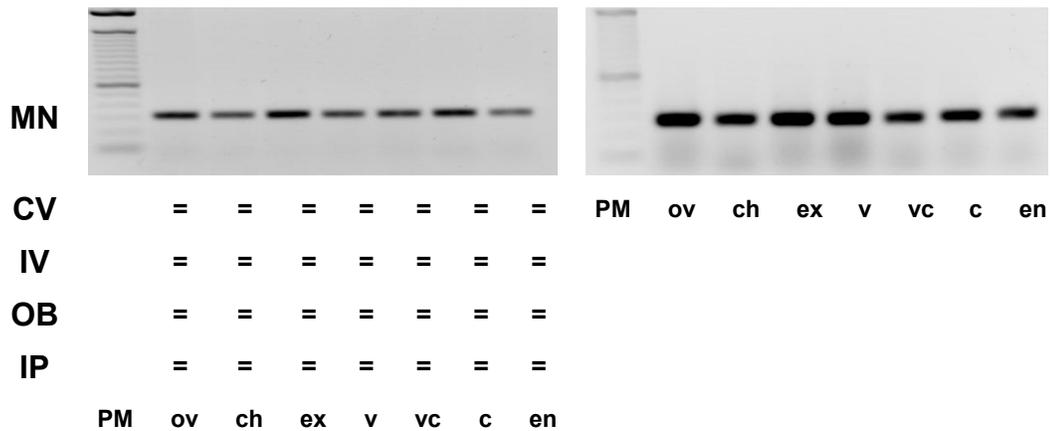


Figura 15 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ABA3/FLACCA pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos: ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en. Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

A catalase (cat) é uma enzima oxidativa presente nos peroxissomos e, durante o ciclo fotossintético, participa da degradação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Também está relacionada com a germinação de sementes e redução dos efeitos prejudiciais de estresses biótico e abiótico (DRORY; WOODSON, 1992; DE ROBERTIS; HIB, 1998).

Em razão da sua função nas plantas pode-se explicar a amplificação de transcritos em todas as amostras, não havendo diferença entre as fases, nem entre as cultivares (Figura 16).

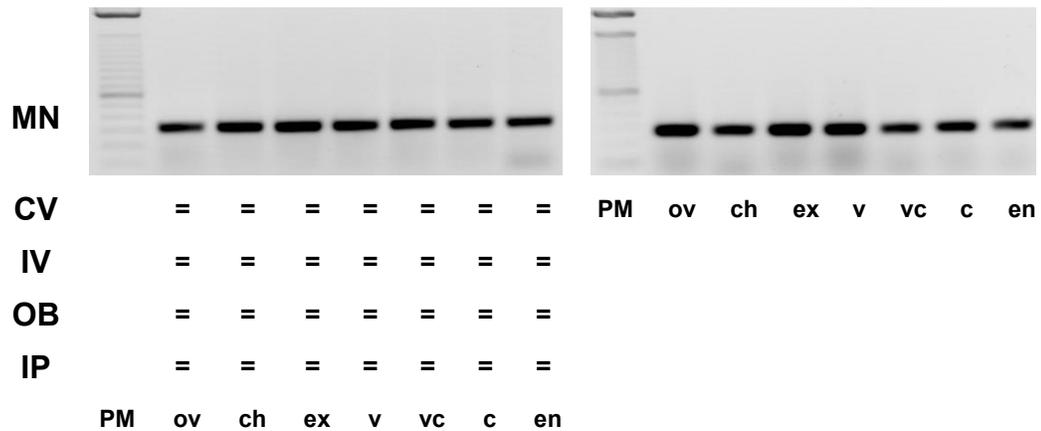


Figura 16 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene *cat* pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

#### 4.2.2.2 Grupo de genes relacionados com os componentes químicos dos frutos

A cafeína é um alcalóide presente em todas as partes da planta de café, principalmente nos frutos. Na biossíntese participam três enzimas: (i) metilxantosina sintase (MS), que converte xantosina em 7-metilxantosina, (ii) teobromina sintase (TS), que originará a 7-metilxantina e depois a 3,7-dimetilxantina (teobromina) e (iii) a cafeína sintase (CS) (MIZZUNO et al., 2003).

A teobromina sintase, em estudos realizados com o tomateiro revelou-se como uma das enzimas que influenciam a biossíntese do etileno, hormônio comum na maturação (ALBA et al., 2005).

Com a utilização da técnica RT-PCR, Oliveira (2007) observou que a expressão dos genes da biossíntese da cafeína, na cultivar Mundo Novo diminuiu a partir da fase de maturação dos frutos. Constatou ainda, que o gene codificador da teobromina sintase apresentou menor variação dos fragmentos amplificados. Koshiro et al. (2006)

sugeriram que, devido ao padrão de expressão semelhante desses genes, as enzimas apresentam mecanismos comuns de regulação da expressão gênica.

Os resultados do presente estudo, para todos os genes que codificam as enzimas da biossíntese da cafeína (MS, TS e CS), corroboram os dados de Oliveira (2007). Nas Figuras 17, 18 e 19 observa-se transcritos amplificados nas fases de desenvolvimento dos frutos, com diminuição de intensidade nas fases verde cana, cereja e endosperma. A redução da intensidade de fragmentos amplificados é menos marcante para o gene codificador da TS. Na cultivar Icatu Precoce, os fragmentos amplificados do gene que codifica a CS apresentaram menor intensidade no fruto cereja em relação as demais cultivares, o que pode ser explicado pela precocidade no ciclo de desenvolvimento dos frutos dessa cultivar (IP).

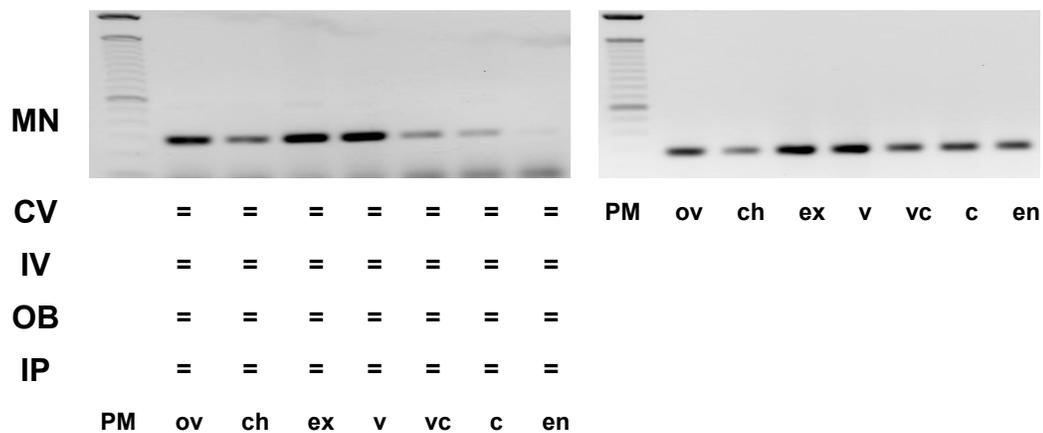


Figura 17 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene MS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

Nas análises PCR quantitativo, o padrão de expressão do gene da síntese da cafeína (CS) apresentou comportamento semelhante àquele observado em PCR semi-quantitativo (RT-PCR) nas diferentes fases de desenvolvimento dos frutos de café na cv. Mundo Novo, como na fase cereja nas demais cultivares (Figura 20).

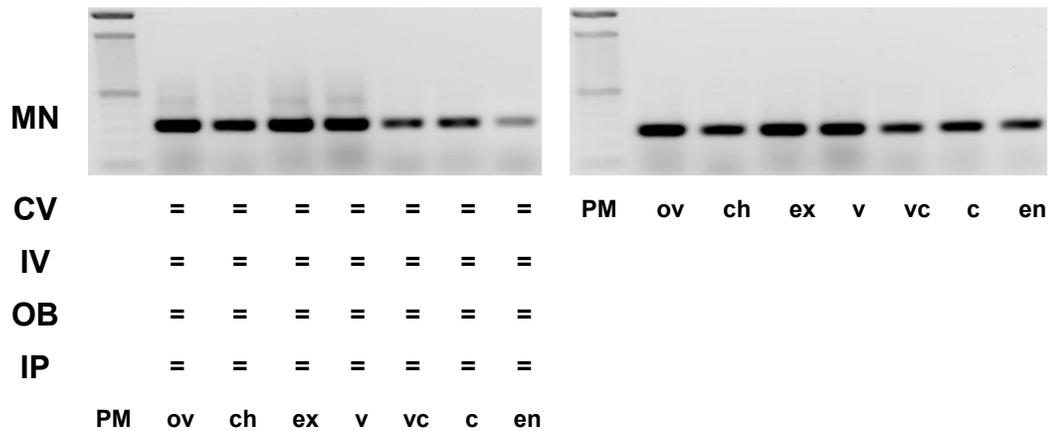


Figura 18 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene TS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

Os ácidos clorogênicos (CGA) são compostos fenólicos, cuja função principal consiste na ação como antioxidante. No cafeeiro, os ácidos clorogênicos fazem parte dos principais componentes dos frutos com teor entre 5 a 8% em *C. arabica* e 7 a 11% em *C. canephora*. Esse composto encontra-se em todas as fases de desenvolvimento dos frutos (CLIFFORD, 1985), considerado um dos componentes responsáveis pela qualidade da bebida.

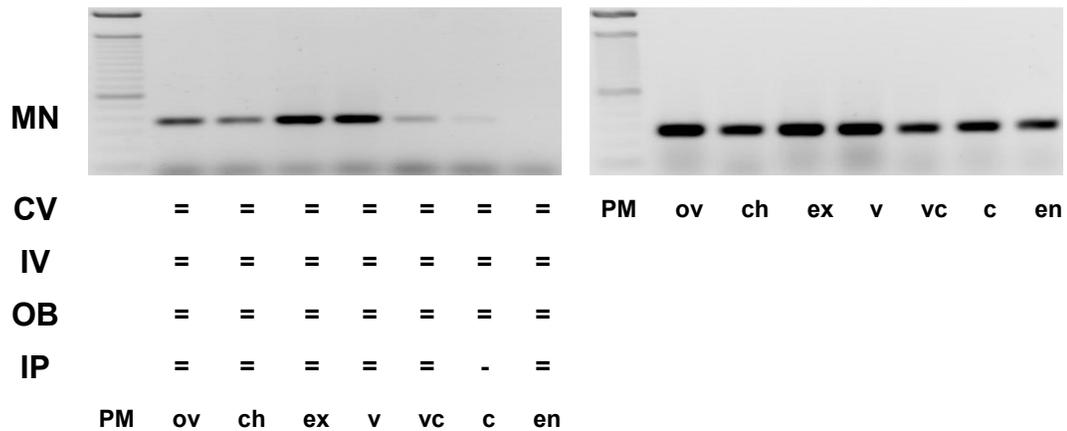


Figura 19 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene CS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e menor (-)

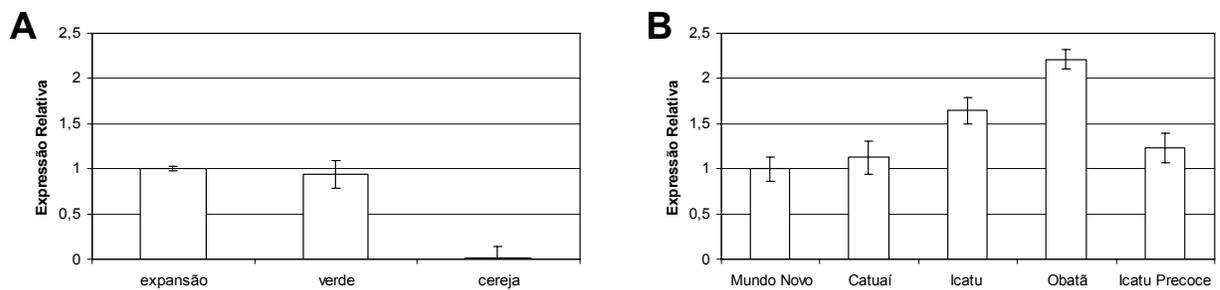


Figura 20 – Quantificação da expressão do gene CS nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)

Dentre as principais enzimas que participam de sua síntese (CGA) estão a fenilalanina liase (PAL), 4-coumarato CoA ligase (4cl), hidroxycinamoil-CoA ligase e caffeoyl-CoA metiltransferase (CCoAOMT1) (CLARKE; MACRAE, 1985).

A amplificação de transcritos referentes aos genes que codificam para as enzimas 4cl e CCoAOMT1 em todas as fases de desenvolvimento dos frutos de café, pode ser observada nas Figuras 21 e 22. Os fragmentos amplificados do gene codificador da enzima 4cl apresentaram significativa redução de intensidade em frutos em maturação (verde cana e cereja) (Figura 21). Essa redução foi intensificada no endosperma maduro - desprovido do perisperma, provavelmente porque a casca de frutos maduros deve ser rica em CGA, com maior concentração do que o endosperma. Esses resultados corroboram os dados de Melo (2005) e Oliveira (2007), os quais observaram por meio da análise RT-PCR, redução de transcritos do gene 4cl em frutos cereja na cultivar Mundo Novo.

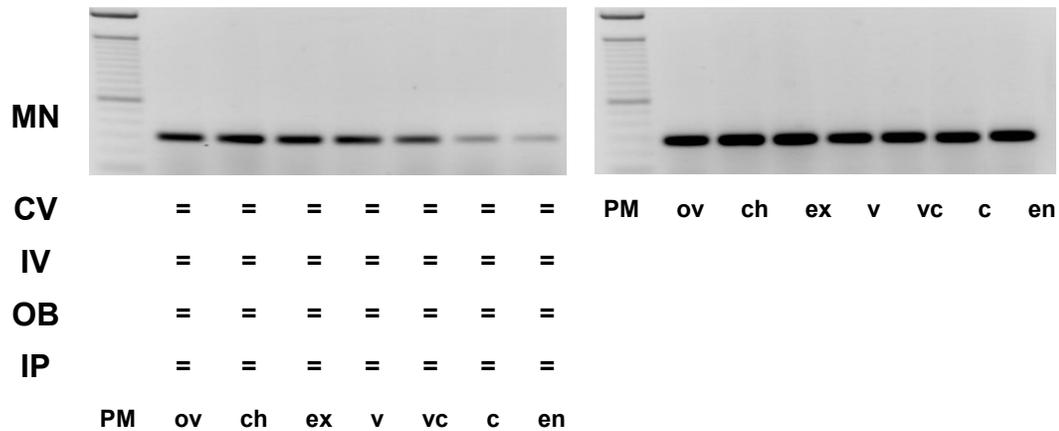


Figura 21 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene 4cl pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

Os resultados de amplificação do gene CCoAOMT1 (Figura 22) evidenciaram aumento na intensidade dos fragmentos nas amostras de frutos verde e verde cana, que diminui em grãos que completaram a maturação, como: grãos cereja e endosperma maduro sem perisperma. Resultados semelhantes foram obtidos por Lepelley et al. (2007) pela técnica PCR quantitativo em grãos de *C. canephora*, em diferentes estádios de maturação. A expressão do gene CCoAOMT1 foi baixa em frutos pequenos, com aumento significativo nos frutos verde e verde-amarelado. No entanto, sua expressão reduz novamente nos frutos cereja.

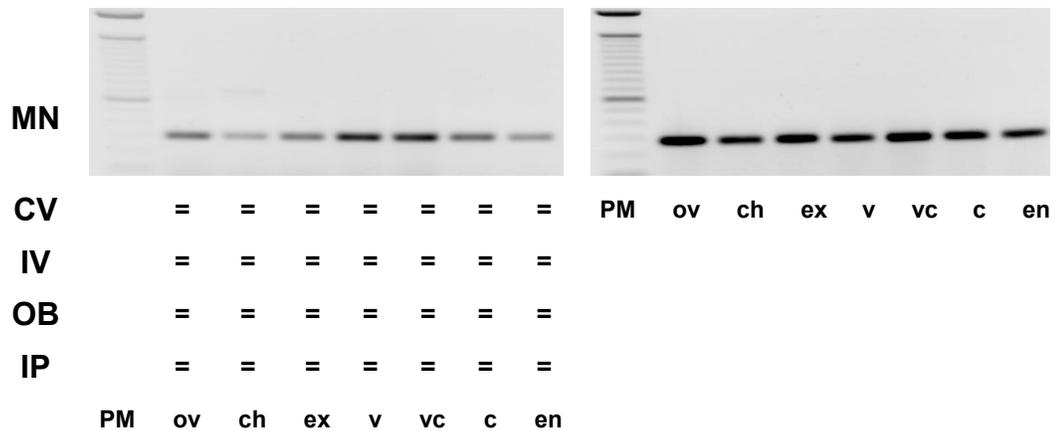


Figura 22 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene CCoAOMT1 pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

A fenilalanina é um dos compostos fenólicos secundário mais abundante das plantas. Pela eliminação de uma molécula de amônia do ácido cinâmico origina esta substância. O ácido cinâmico é precursor do ácido cumárico, chalconas, flavonas e isoflavonas. A reação que origina a fenilalanina é catalisada pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL), cuja atividade PAL pode ser aumentada por fatores ambientais como: baixa fertilidade, luz e infecção por fungos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A regulação da PAL pode ser complexa pela existência, em alguns vegetais, de múltiplos genes codificadores da enzima (TAIZ; ZEIGER, 2004). Para minimizar esse problema, no presente estudo foram selecionados ESTs da PAL que existem em bibliotecas de frutos, o que aumenta a chance de avaliações de genes PAL associados à maturação.

Os resultados da análise de amplificação por PCR semi-quantitativo do gene PAL (Figura 23) evidenciaram diferença de amplificação de transcritos entre as fases de desenvolvimento dos frutos. A maior intensidade dos fragmentos foi observada nas fases ovário, expansão, verde cana e cereja, enquanto a menor intensidade ocorreu no fruto verde.

As fases em que a amplificação de transcritos apresentou maior intensidade (ov, ex, vc e c), corresponderam aos períodos de menor precipitação e queda de temperatura (Figura 6). A deficiência hídrica e a baixa temperatura tornam as plantas mais sensíveis, devido ao gasto energético, o que possibilita a incidência de pragas e doenças, ou mesmo, alterações fisiológicas desfavoráveis (RENA; MAESTRI, 1987; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Nas análises para quantificação da expressão do gene PAL, os resultados foram semelhantes aos obtidos pela análise semi-quantitativa (Figura 24), com variação de expressão do gene codificador da PAL nas cultivares em fruto cereja. Esse resultado indica comportamento diferenciado das cultivares em razão da influência de fatores ambientais. As cultivares Mundo Novo e Icatu Precoce apresentaram expressões baixas, seguidas das cultivares Catuaí Vermelho, Icatu Vermelho e Obatã. As duas últimas cultivares, são oriundas de cruzamento interespecífico, ainda com pouca estabilidade genética, o que pode ter proporcionado o aumento da expressão desse gene (PAL) em relação à Mundo Novo, material genético mais estável utilizado no presente estudo.

A síntese de compostos fenólicos como, antocianinas, taninos condensados, flavonas, isoflavonas e flavonóides dependem da atividade da enzima chalcona sintase (CHS) (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os compostos fenólicos protegem as plantas contra raio ultravioleta (UV), insetos, fungos e bactérias (CASTRO et al., 2005).

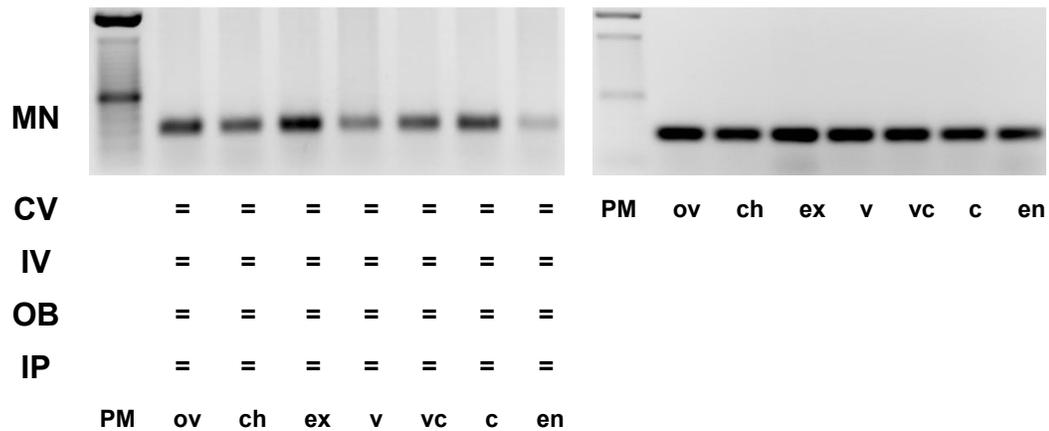


Figura 23 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene PAL pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

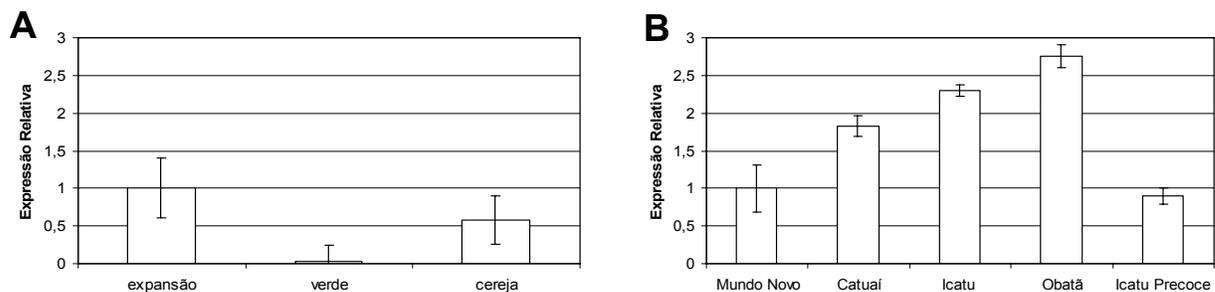


Figura 24 – Quantificação da expressão do gene PAL nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)

Em macieira, a enzima CHS apresenta atividade elevada e constante durante o amadurecimento dos frutos, a qual aumenta quando a fruta é exposta à luminosidade, conforme dados apresentados por Ju et al. (1995). A *Arabidopsis thaliana* também

responde a intensidade luminosa, com aumento de expressão desse gene (FEINBAUM; AUSUBEL, 1988).

Em tomateiro é a enzima chave na biossíntese de antocianina, cuja expressão foi identificada nos cotilédones, hipocótilo e em folhas de mudas dessa planta (O'NEILL et al., 1990). Ubi et al. (2006) mostraram que a luz UV e a baixa temperatura são fatores importantes para a acumulação de antocianina na casca da maçã, o que induz a expressão dos genes relacionados com sua biossíntese, especialmente os que codificadores das enzimas chalcona sintase, antocianina sintase e UFGluT.

Durante o desenvolvimento dos frutos do cafeeiro observou maior intensidade de fragmentos amplificada correspondentes ao gene que codifica a CHS no início da maturação (verde cana) (Figura 25). Nessa fase, o exocarpo começa a apresentar a coloração vermelha, o que sugere aumento na produção de antocianina.

Nos frutos verdes e no endosperma maduro diminuiu a intensidade de transcritos. O endosperma é a semente madura desprovida do pericarpo, local da pigmentação, a qual pode ser vermelha ou amarela, e que explicaria a diminuição da intensidade dos fragmentos nas respectivas fases (verde e endosperma). O estágio fruto verde caracteriza-se pelo máximo tamanho, com endosperma sólido e apto a iniciar a maturação, por isso menos suscetível a influências de fatores externos (bióticos ou abióticos).

A cultivar Icatu Precoce apresentou menor redução de intensidade do fragmento amplificado correspondente a grão verde em relação às demais cultivares. Esse resultado pode ser devido ao fato da mesma (IP) apresentar grãos de coloração amarela, além de ciclo reduzido (Figura 5). Dessa maneira, a mudança de fase é mais rápida, com ausência de síntese dessa enzima por menos tempo, comparativamente ao que ocorre nas demais cultivares.

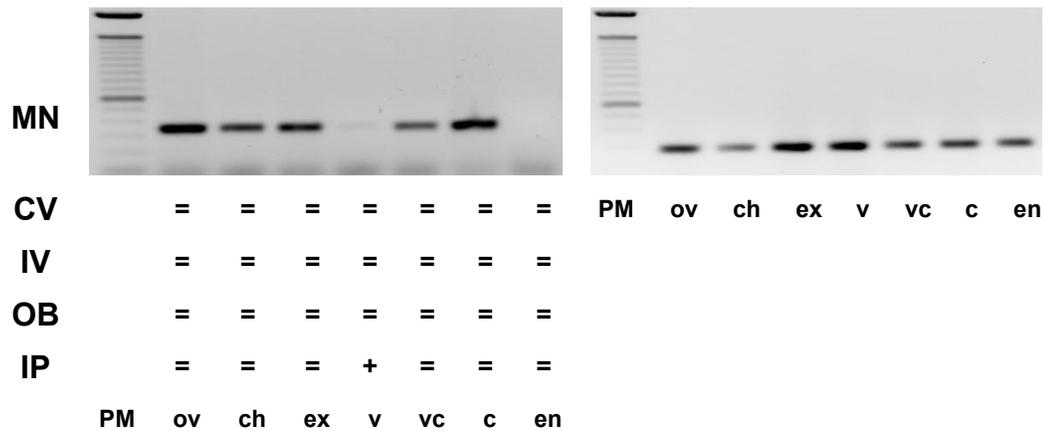


Figura 25 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene CHS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+)

A enzima isoflavona sintase (IFS) é precursora do composto fenólico - isoflavona (ou isoflavonóide), o qual possui ação sobre os patógenos. As fitoalexinas relacionadas com a defesa vegetal mais estudada em plantas são os isoflavonóides (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A soja possui grande quantidade dessa proteína, por isso tem sido bastante estudada em relação a esta característica. O gene que codifica para isoflavona sintase apresenta maior expressão em embriões com 30 a 70 dias após a polinização e se mantém durante todo o desenvolvimento da semente, não observando mudanças significativas na expressão (DHAUBHADEL et al., 2007).

A enzima IFS, por estar relacionada à resposta de defesa, é influenciada pelo ambiente, sofrendo alterações durante o desenvolvimento dos frutos de café. Na Figura 26, observa-se que a maior intensidade dos fragmentos amplificados corresponde ao ovário em frutos verde cana, com redução de transcritos no endosperma maduro desprovido do perisperma (en). Essa constatação permite supor que seja pela ausência

do exocarpo, parte do fruto que possui pigmentação (casca) e que, também, atua como barreira protetora da semente, da mesma maneira que ocorre com os genes PAL e CHS.

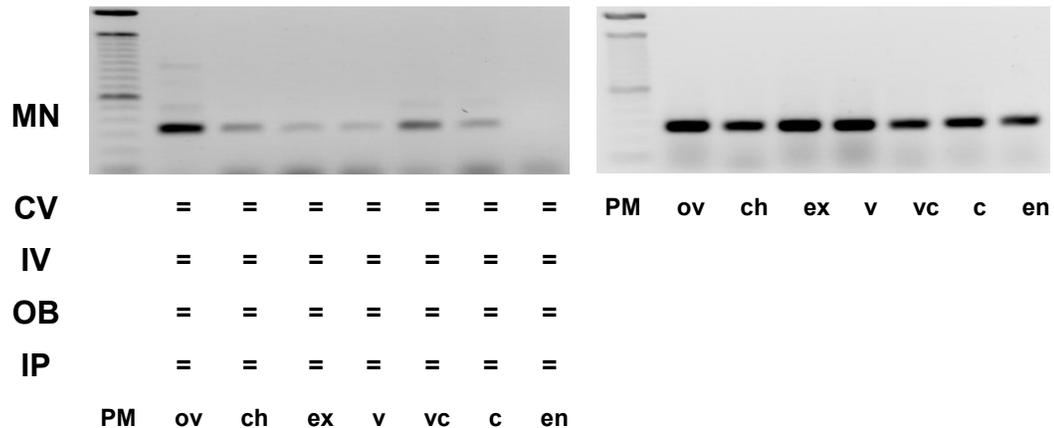


Figura 26 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene IFS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

O gene codificador da enzima álcool acyl transferase (AAT) é altamente expresso no amadurecimento de frutos, pois a enzima está relacionada ao desenvolvimento do aroma dos frutos (BEEKWILDER, et al., 2004; FEI, et al., 2004). Dessa forma, a maior expressão desse gene deve acontecer no final da maturação, em fase de colheita, e a semente apta para germinar.

Pela análise PCR semi-quantitativo todas as cultivares estudadas apresentaram aumento de intensidade dos fragmentos amplificados nas fases de maturação (verde cana, cereja e endosperma). No entanto, em Mundo Novo e Obatã a intensidade dos fragmentos foi maior já na fase de frutos verde, quando o mesmo atinge o tamanho máximo (Figura 27). Esse resultado pode indicar que o início da

formação do aroma é precoce nessas cultivares (Mundo Novo IAC 388-17 e Obatá IAC 1669-20), hipótese que depende de pesquisas complementares, como a quantificação química desse composto associado à análise sensorial.

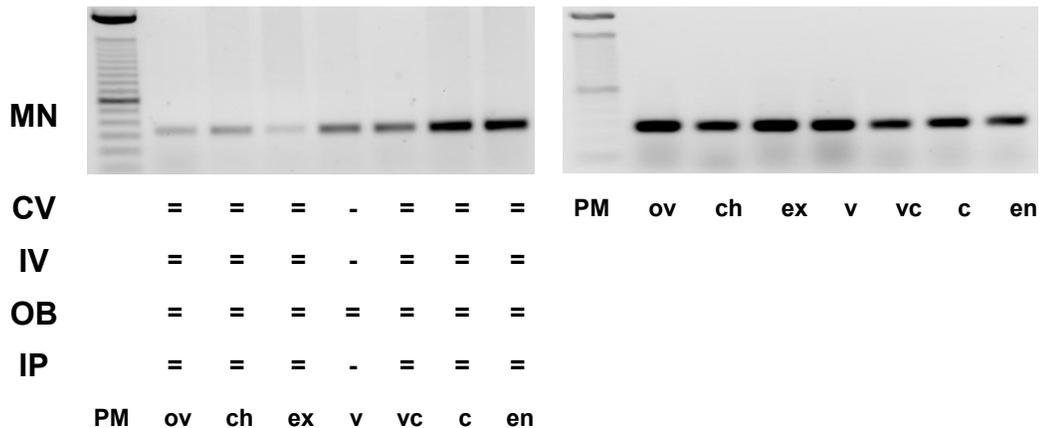


Figura 27 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene AAT pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatá (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e menor (-)

A  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -mannosidase e endo- $\beta$ -mannanase são as principais enzimas envolvidas na modificação ou degradação da parede celular. A enzima  $\alpha$ -galactosidase também está relacionada com a síntese de carboidratos em frutos, por isso aparece durante o processo de desenvolvimento e maturação. A endo- $\beta$ -mannanase faz parte de um dos principais passos no metabolismo da parede celular de mananos (grupo de carboidratos) durante a germinação do fruto do café (ZHU; GOLDSTEIN, 1994; MARRACCINI et al., 2001).

Nas análises RT-PCR da presente pesquisa, verifica-se a partir dos resultados para o gene codificador da  $\alpha$ -galactosidase (GLA) (Figura 28), que há acúmulo de transcritos a partir de fruto verde, cuja intensidade dos fragmentos amplificados diminuiu em frutos cereja e endosperma maduro. A maior intensidade

de fragmentos amplificados no grão verde se deve, provavelmente, ao acúmulo de açúcares que ocorre nessa fase.

Na cultivar Icatu Vermelho o aumento de intensidade dos fragmentos amplificados foi tardio e ocorreu a partir de fruto verde cana. O padrão observado para essa cultivar pode indicar síntese tardia de carboidratos nos grãos, pois, todas as repetições da análise apresentaram resultados semelhantes. Nas análises de quantificação da expressão desse gene, observou o no fruto verde em Mundo Novo, assim como na análise semi-quantitativa. Na fase de grão cereja não houve diferença entre as cultivares (Figura 29).

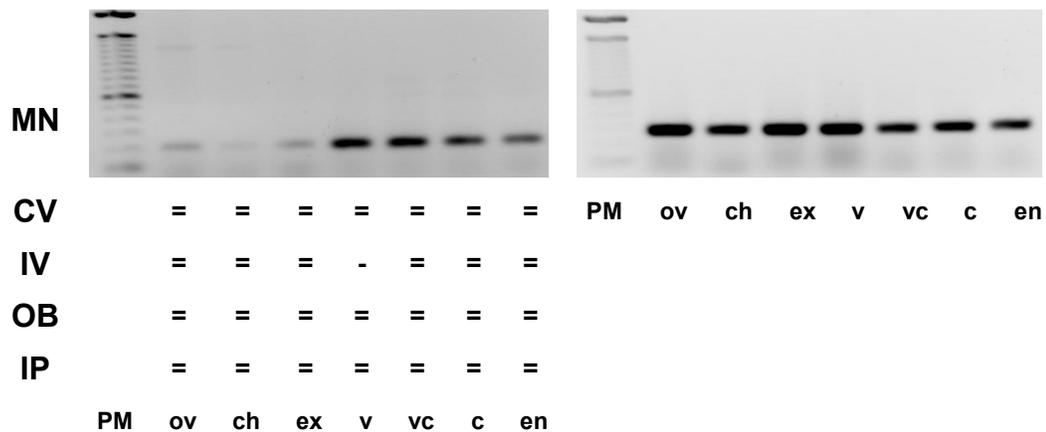


Figura 28 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene GLA pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e menor (-)

Em frutos de *C. arabica* variedade Caturra, Marraccini et al. (2001) observaram atividade máxima e grande acúmulo de transcritos da enzima  $\alpha$ -galactosidase em fruto verde cana, enquanto nos frutos maduros não detectaram expressão desse gene (GLA). No entanto, Gaspari-Pezzopane et al. (2005) avaliaram  $\alpha$ -galactosidase em Mundo Novo e observaram maior amplificação de

transcritos a partir de frutos em expansão, que se manteve presente até fruto cereja, com pequena redução de intensidade.

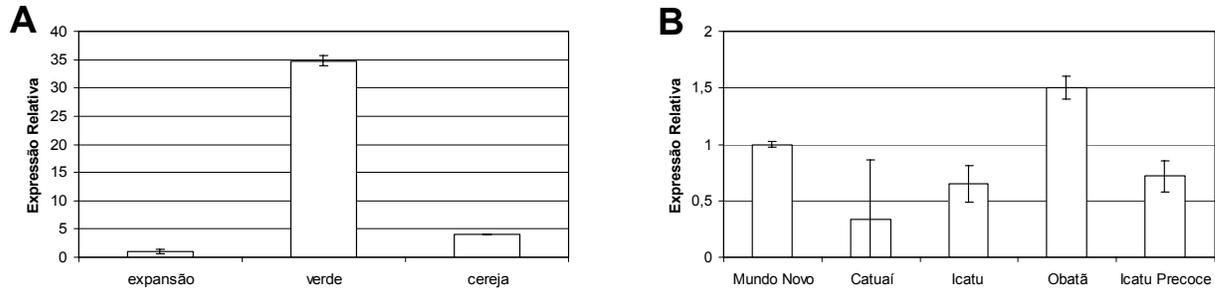


Figura 29 – Quantificação da expressão do gene GLA nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)

O gene que codifica a enzima endo- $\beta$ -mannanase (manB) apresentou amplificação de transcritos ao longo do desenvolvimento do fruto, com acentuado decréscimo no fruto verde (Figura 30). Essa diminuição de fragmentos amplificados seria porque o fruto verde corresponde ao final da fase de crescimento e início da maturação. Nessa fase, também completa o preenchimento do perisperma, redução da clorofila e inicia o acúmulo de açúcares e antocianina (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

Na cultivar Mundo Novo, a fase chumbinho apresentou menor intensidade dos fragmentos amplificados do que as demais cultivares estudadas. Esse resultado, provavelmente se deve a erro experimental, pois foi observada redução semelhante na amostra controle.

Na pesquisa desenvolvida por Marraccini et al. (2001), os autores observaram em frutos de *C. arabica* variedade Caturra a presença do gene que codifica a endo- $\beta$ -mannanase somente em sementes germinando. Entretanto, os resultados apresentados no presente trabalho corroboram os obtidos por Gaspari-Pezzopane et al. (2004) e Oliveira (2007) por meio da análise de RT-PCR, na

cultivar Mundo Novo. É, provavelmente, que a discrepância em relação a esses pesquisadores se deve a outro alelo presente na cultivar Caturra. E ainda, a possibilidade dos genótipos apresentarem diferentes padrões de acúmulo de açúcares no desenvolvimento do fruto, para GLA e manB, pode ser outra provável explicação da diferença em relação ao trabalho de Marracini et al. (2001).

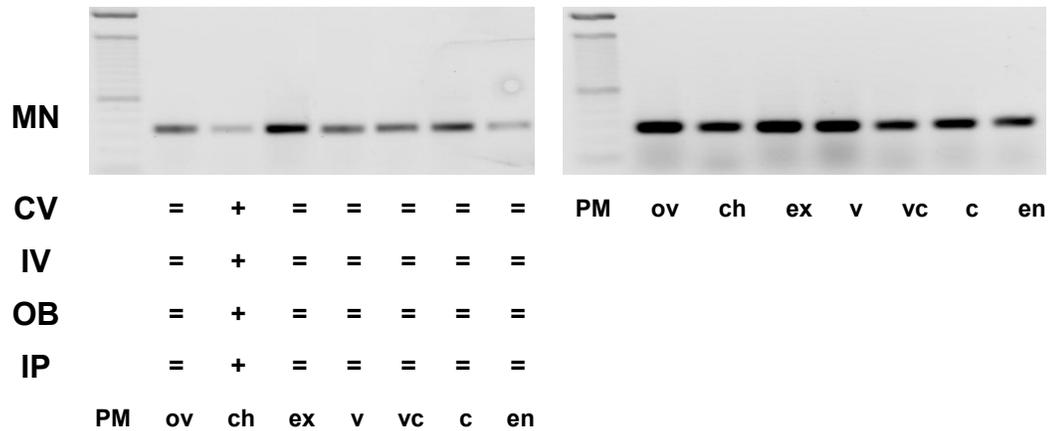


Figura 30 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene manB pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+)

#### 4.2.2.3 Grupo de genes relacionados com a maturação e amadurecimento frutos

O etileno é um hormônio vegetal gasoso, de ocorrência natural, presente em todas as partes das plantas e, com efeito, no crescimento e diferenciação dos tecidos. Os principais efeitos do etileno são: germinação e crescimento de gemas; amadurecimento de frutos; abscisão de folhas e frutos; epinastia ou a inclinação das folhas para baixo sob alta concentração de auxinas ou baixa concentração de etileno; floração; senescência; crescimento de plântulas e geotropismo transversal. A produção de etileno aumenta em resposta as condições de estresse, tais como: deficiência

hídrica, encharcamento, resfriamento, exposição ao ozônio ou ferimento mecânico (CASTRO et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A biossíntese do etileno é composta pelas enzimas SAM (S-Adenosil-metionina), ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO). Em tomateiro os receptores de etileno são os ETRs e Nr e os fatores de transcrição relacionados à via de sinalização do etileno são MBF1, CAF, TFIIE, bZIP1, bZIP61, AOBP, TDR4, ERFs e EREBPs (ALBA et al., 2005).

O etileno é considerado o hormônio do amadurecimento, pois a sua síntese aumenta com a maturação dos frutos, acompanhando a elevação da respiração (frutos climatéricos), o que não ocorre em frutos não climatéricos (CASTRO et al., 2005).

A necessidade do etileno para as plantas, foi comprovada por meio do bloqueio da biossíntese desse hormônio pela expressão da fita anti-sense da enzima ACC sintase ou da ACC oxidase, em experimentos com plantas transgênicas de tomateiro, obtendo frutos que não amadurecem (OELLER et al., 1991). Outro experimento que comprovou a necessidade de etileno foi feito com o mutante *never ripe* de tomateiro, cujos frutos não amadurecem pela falta de receptor do etileno (mutação), por impedir a ligação do hormônio (WILKINSON et al., 1995).

O produto ACC formado pela enzima ACC sintase, além de precursor do etileno, também é utilizado na síntese de uma “nova” metionina, por via modificada do ciclo de obtenção desse aminoácido. Essa via alternativa ou Ciclo de Yang tem a função de manter alta a taxa biossintética do etileno. De acordo com Castro et al. (2005) a enzima ACC sintase é constitutiva e limitante à biossíntese de etileno (CASTRO et al., 2005).

Em razão dessa ação, na análise PCR semi-quantitativa da presente pesquisa, foram amplificados transcritos do gene que codifica a ACS em todas as fases de desenvolvimento dos frutos de cafeeiro, com aumento significativo em frutos em maturação (vc) e maduro (c) (Figura 31). Esses dados corroboram àqueles obtidos por Nakatsuka et al. (1998) e Alba et al. (2005), os quais verificaram expressão máxima do gene ACS após o início da maturação, quando também deve ocorrer a maior síntese de etileno, conseqüentemente.

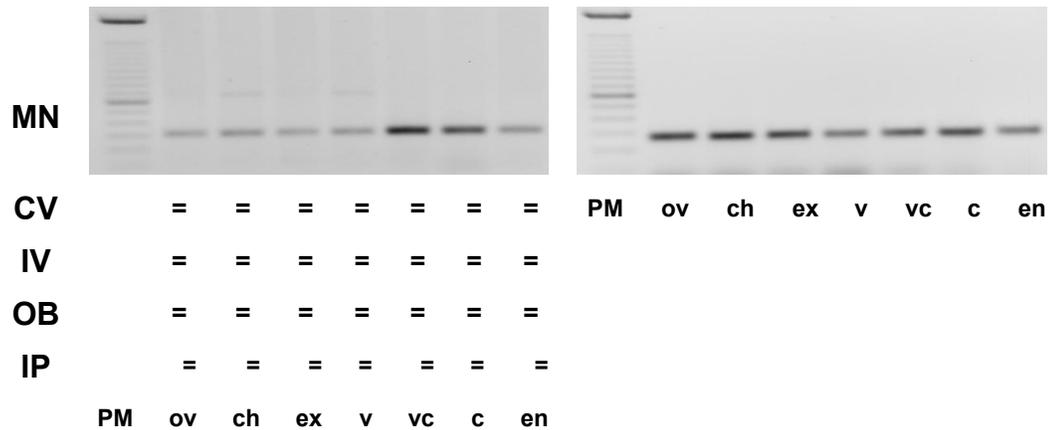


Figura 31 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ACS pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

A atividade da enzima ACO aumenta nas fases de maturação de alguns frutos e em condições de estresse ambiental, quando há necessidade de etileno. No entanto, devido a produção de etileno pela ativação da enzima ACO ocorre, conseqüentemente, maior atividade da ACS (CASTRO et al., 2005).

Nas análises do presente estudo, o gene ACO apresentou amplificação de transcritos nas fases de crescimento do fruto (ovário, chumbinho, expansão) e reduziu no fruto verde. Na seqüência, houve grande aumento nas fases de maturação (vc) e de frutos maduros (c), independentemente da cultivar (Figura 32). Esses resultados corroboram os dados de Pereira et al. (2005), Alba et al. (2005) e Budzinski et al. (2005), para os quais os transcritos apresentaram acúmulo gradual a partir do início da maturação.

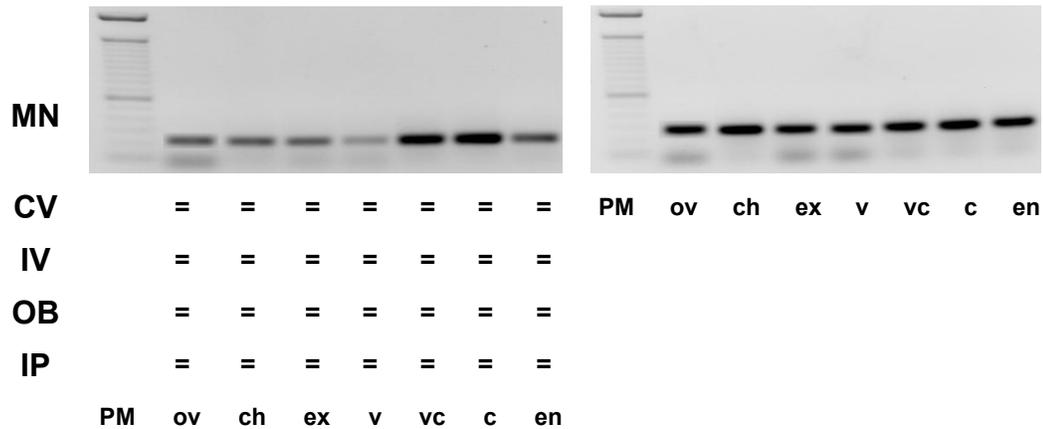


Figura 32 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ACO pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

O fator de transcrição da família ERF faz parte da via de transdução de sinal do etileno, razão porque a expressão desse gene é rapidamente induzida pela sua aplicação na planta (CHAVES; MELLO-FARIAS, 2006).

O padrão de amplificação de transcritos correspondentes a esse gene (ERF) foi semelhante àquele dos genes ACS e ACO, presentes em todas as fases de desenvolvimento dos frutos. Observou-se aumento de intensidade dos transcritos nas fases de maturação, após decréscimo ocorrido nos frutos verde (Figura 33).

Os receptores de etileno estão ligados à membrana do retículo endoplasmático e quando ativados, iniciam uma ou mais rotas de transdução de sinal (TAIZ; ZEIGER, 2004), com os receptores da família ETR requeridos, principalmente, nas fases de maturação dos frutos (WILKINSON, 1995; CHAVES; MELLO-FARIAS, 2006).

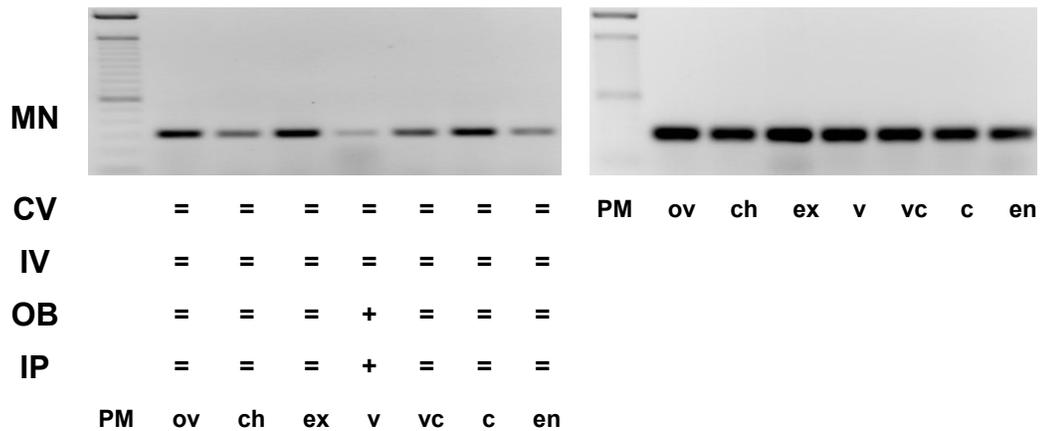


Figura 33 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ERF pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e maior (+)

Durante a maturação dos frutos do cafeeiro arábica verificou-se maior intensidade de amplificação de transcritos correspondentes ao gene do receptor ETR (Figura 34). Essa constatação se deve à maturação climatérica, em que há aumento da síntese de etileno na maturação. Esses resultados apresentaram o mesmo padrão daqueles que foram observados para os genes ACS, ACO e ERF.

As análises de quantificação da expressão desse gene (ETR) evidenciaram que a fase de fruto cereja apresenta 7 vezes mais transcritos do que as fases expansão e grão verde (Figura 35). Na fase cereja, não há diferença entre as cultivares de cafeeiro utilizadas na presente pesquisa (Figura 35).

Na pesquisa desenvolvida por Bustamante-Porras et al. (2007), os autores estudaram o gene ETR1 em diferentes espécies de cafeeiro, e verificaram que se trata de um gene de cópia simples para todas as espécies, exceto em *C. arabica*, uma espécie tetraplóide. No mesmo estudo, mediante análise semi-quantitativa RT-PCR, os pesquisadores observaram a presença desse gene em todos os estádios de

desenvolvimento dos frutos de *C. canephora* e *C. pseudozanguebariae*, sem diferenças significativas na sua expressão.

Por ser uma família de genes, o padrão de expressão de cada um dos membros pode ser distinto, assim como a expressão em diferentes espécies. Nas análises da presente pesquisa, utilizou-se um membro não identificado da família ETR e a espécie *C. arabica*, enquanto Bustamante-Porras et al. (2007) utilizaram as espécies *C. canephora* e *C. pseudozanguebariae* e o membro ETR1. A utilização de espécies diferentes e membros distintos da família ETR, podem explicar a diferença observada no padrão de expressão entre a presente pesquisa e dos autores citados acima.

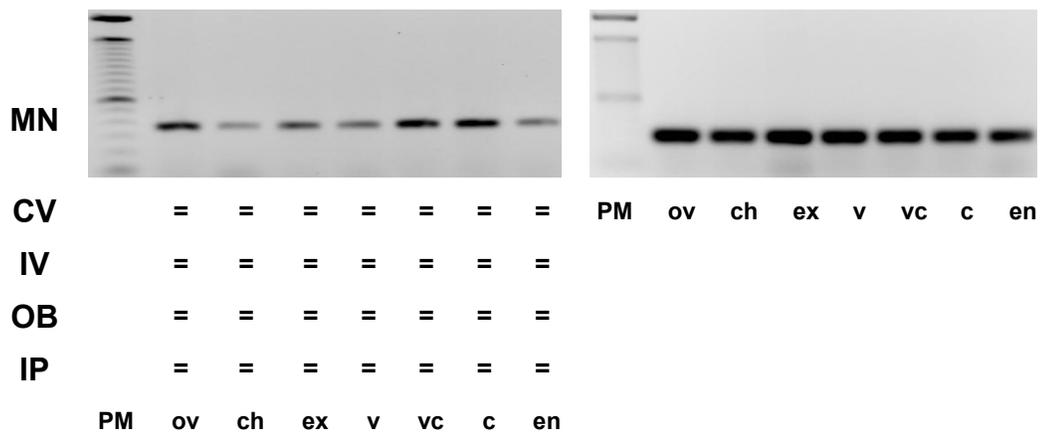


Figura 34 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ETR pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

A glutathiona protege as plantas contra estresses como: poluição do ar, calor, frio, déficit hídrico e metais pesados. Além disso, protege as sementes da desidratação e possui ação antioxidante. Essas funções são efetivas quando a glutathiona está reduzida e, para tanto, depende da reação catalisada pela glutathiona redutase (GR) (YOUNG; CONN, 1956; TAIZ; ZEIGER, 2004).

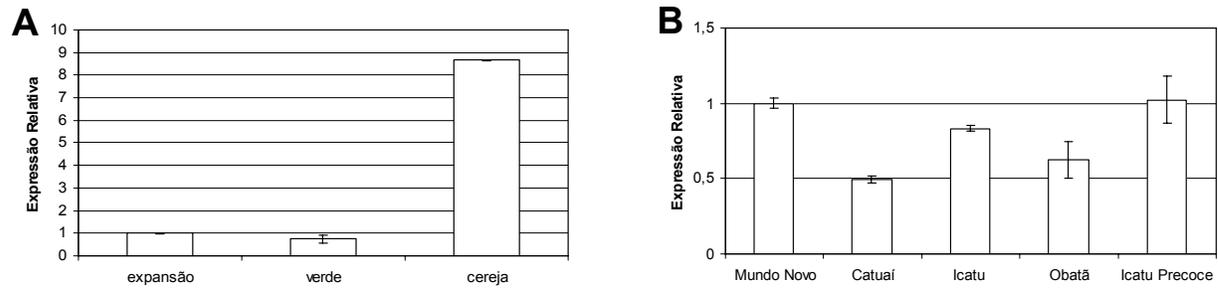


Figura 35 – Quantificação da expressão do gene ETR nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)

Em *Arabidopsis*, com a análise HPLC e PCR observou a presença da GR durante todas as fases de desenvolvimento da semente, principalmente na maturação do embrião (CAIRNS et al., 2006). O arbusto *Amelanchier alnifolia*, de maturação climatérica, também apresentou as enzimas glutationa transferase e glutationa redutase nas fases de desenvolvimento dos frutos, com substancial aumento nas etapas finais de amadurecimento (ROGIERS et al., 1998).

Em citros, fruto não climatérico, a enzima GR está presente em todas as fases de desenvolvimento dos frutos, inclusive no final da maturação, quando não apresenta alteração significativa na concentração (HUANG et al., 2007).

Na presente pesquisa, todas as fases de desenvolvimento dos frutos do cafeeiro arábico apresentaram amplificação de transcritos referentes ao gene codificador da GR, com aumento de intensidade dos fragmentos na fase de frutos em expansão (ex), em maturação (vc) e maduros (c) (Figura 36). A expansão dos frutos é uma fase exigente em fotoassimilados e água. O balanço hídrico apresentado na Figura 6 evidencia que a referida fase coincidiu com período em havia uma pequena deficiência hídrica, aproximadamente, 20 mm. A GR relaciona com a proteção da planta à desidratação, o que explicaria o aumento de intensidade de transcritos referentes ao gene que codifica essa enzima na fase de expansão.

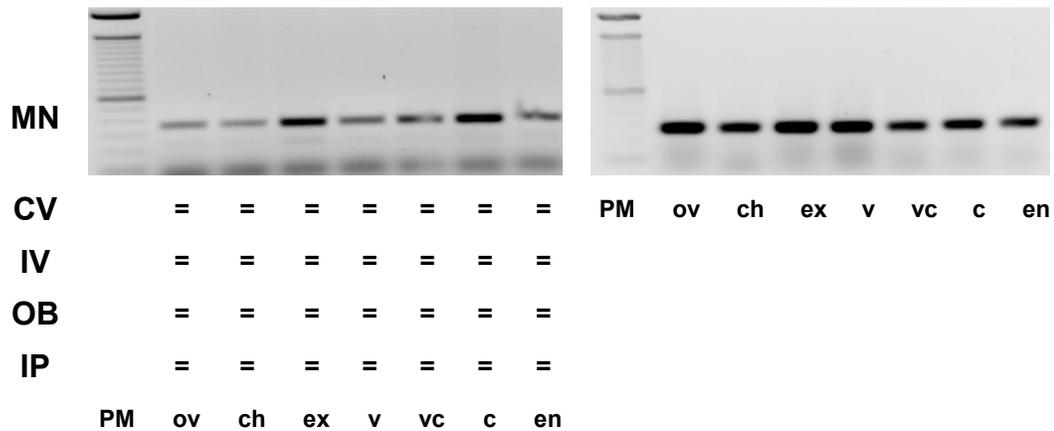


Figura 36 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene GR pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

Os genes que codificam para as proteínas LEA (late embryogenesis-abundant), constituem uma família importante na maturação de frutos, pois são proteínas que se acumulam nas últimas fases do desenvolvimento das sementes e são componentes importantes dos grãos. Esses genes também estão relacionados com a proteção à dessecação, por isso são induzidos por estresse hídrico, osmótico, salino e baixas temperaturas (ZEGZOUTI et al., 1997; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A proteína dehydrin (DH) é um subgrupo da família LEA e sua expressão associa à proteção do embrião e tecidos da semente ao estresse osmótico, causado por dessecação, salinidade ou baixas temperaturas (ROBERTS et al., 1993). Nos estudos feitos por Hinniger et al. (2006), com a cultivar Caturra, por meio da técnica RT-PCR, os autores observaram que nos grãos há presença de transcritos do gene codificadores da proteína DH nas fases de grão verde pequeno até quando estão maduros, enquanto no perisperma a expressão aumenta com a

proximidade da maturação. Esses pesquisadores observaram, também, que cafeeiro da espécie *C. canephora* apresenta expressão para o gene DH somente a partir da fase de grão verde grande.

Os resultados observados nas análises do presente estudo corroboram os dados de Hinniger et al. (2006) (Figura 37). Transcritos amplificados correspondentes ao gene DH estão presentes em todas as fases de desenvolvimento dos frutos e não há diferença significativa entre as fases da frutificação, bem como entre as cultivares utilizadas neste estudo (Figura 37).

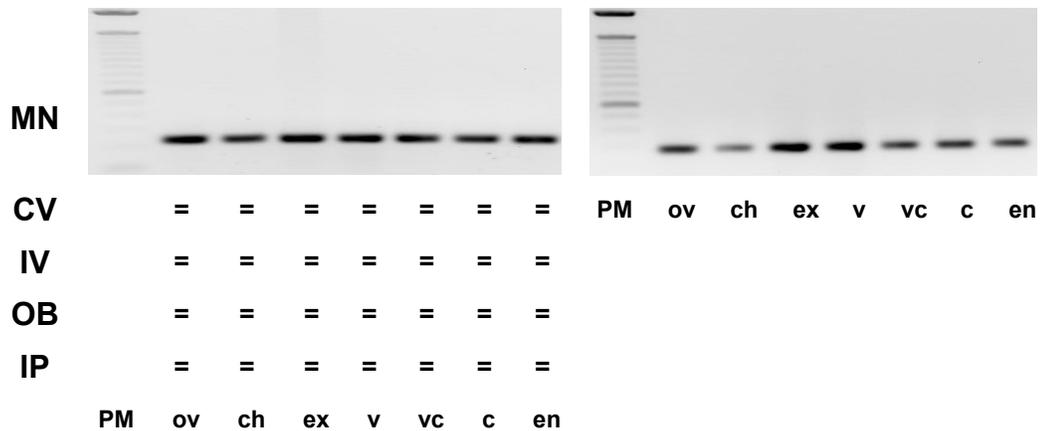


Figura 37 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene DH pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

O gene EMB3, membro da família LEA, está associado à embriogênese e ao estímulo à formação de ABA (DONG; DUNSTAN, 1996). De acordo com os resultados da presente pesquisa houve amplificação de transcritos em todas as fases da frutificação, sem diferença visual na intensidade dos fragmentos. Esses dados são semelhantes àqueles apresentados para o gene DH (Figura 38).

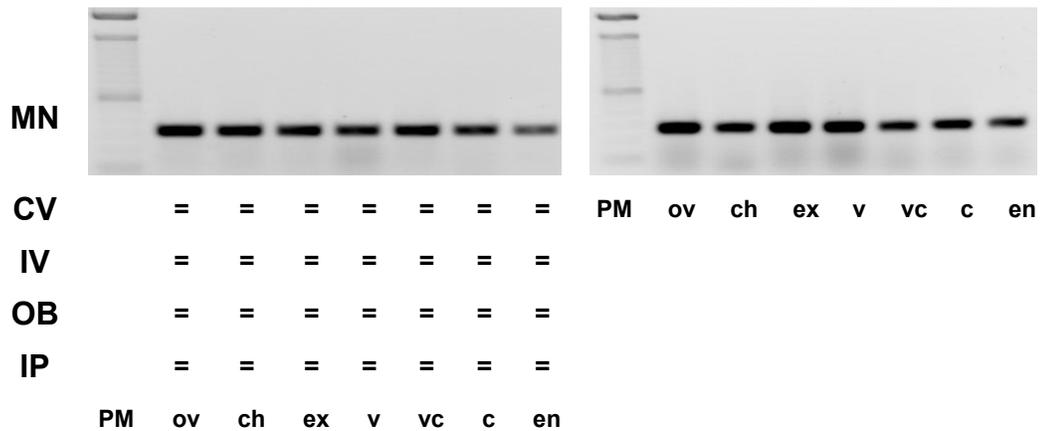


Figura 38 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene ER5 pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

Outro gene da família LEA é o ER5, relacionado à resposta ao etileno, por isso é muito requerido na maturação. Frutos imaturos de tomateiro apresentam expressão do gene apenas com a aplicação exógena de etileno (ZEGZOUTI et al., 1997, 1999).

No trabalho feito por Oliveira (2007), em que estudou o desenvolvimento de frutos de *C. arabica*, o autor observou maior intensidade de transcritos desse gene (ER5) da família LEA a partir das fases finais de desenvolvimento.

No presente estudo, durante o desenvolvimento dos frutos de cafeeiro, observou a presença de fragmentos de ER5, mais intensamente em frutos verde, exceto na cultivar Icatu Vermelho, em que a maior intensidade se deu em frutos verde cana (Figura 38). Os resultados apresentados nessa figura evidenciam a amplificação de outro transcrito de menor intensidade e maior tamanho. Esse fragmento reduz quase totalmente, a partir de fase verde. A amplificação do referido fragmento pode ter resultado da presença de um alelo diferente, de expressão reduzida. Tal suposição se

deve ao fato da espécie *C. arabica* ser alotetraplóide, o que aumenta a probabilidade de mais de um alelo expresso, ou ainda de processamento alternativo.

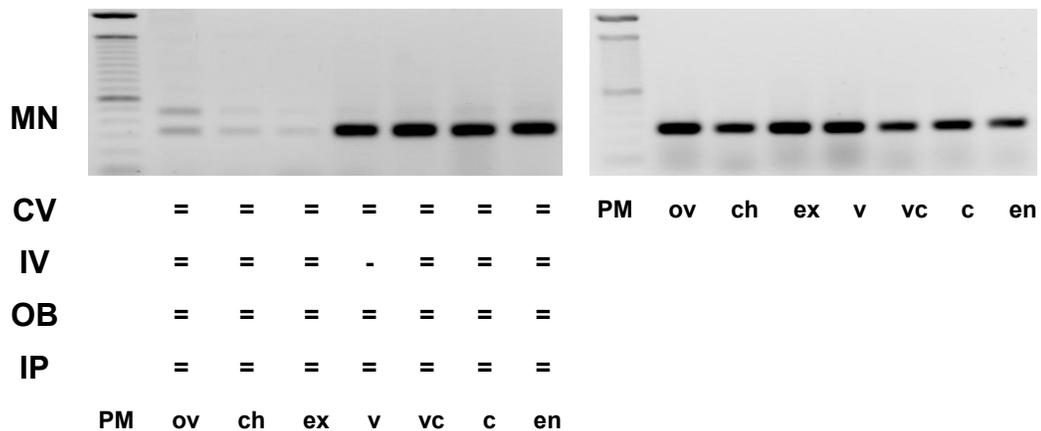


Figura 39 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene *csp1* pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=) e menor (-).

Em frutos de café, a proteína de reserva 11S acumula-se a partir da décima oitava semana após a florada e atinge máxima expressão 27 semanas depois da antese (MARRACCINI et al., 1999). Por meio da técnica RT-PCR os autores observaram que na espécie *C. arabica* havia transcritos amplificados do gene *csp1*, codificador dessa proteína (11S), em endosperma maduro e ausente no perisperma. Esses resultados foram confirmados por Lin et al. (2005) em análise *in silico* de ESTs homólogos na biblioteca de cDNA de cafeeiro arábica.

Na presente pesquisa obteve resultados semelhantes nas análises do gene *csp1*. Foram amplificados transcritos com pequena intensidade nas fases iniciais de desenvolvimento dos frutos, a qual aumenta a partir de fruto verde (Figura 39). Os frutos verdes já estão formados, com o endosperma na forma sólida e apta para o início da maturação.

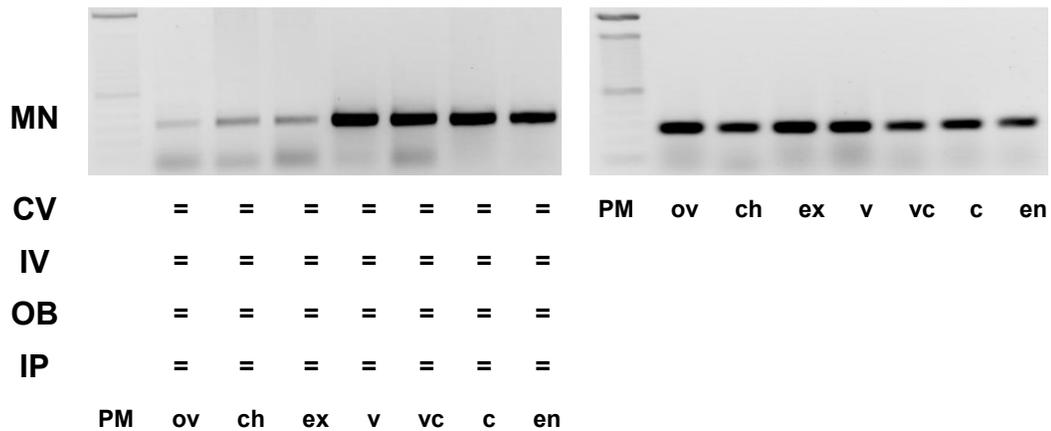


Figura 39 - Amplificação por RT-PCR de transcritos do gene *csp1* pareado ao gene controle Actina, nas cultivares Mundo Novo (MN), Catuaí Vermelho (CV), Icatu Vermelho (IV), Obatã (OB) e Icatu Precoce (IP), nas fases de desenvolvimento dos frutos (ovário-ov; chumbinho-ch; expansão-ex; verde-v; verde cana-vc; cereja-c e endosperma-en). Peso molecular (PM) de 100 pb. Fragmento com intensidade visual igual (=)

A enzima isocitrato liase (ICL) é específica para a germinação, pois é a chave no ciclo do glioxilato, onde são transformados ácidos graxos em hidratos de carbono (TAIZ; ZEIGER, 2004; DE ROBERTIS; HIB, 1998).

Em estudos de Selmar et al. (2004), os autores sugerem que a isocitrato liase pode ser indicativa da qualidade da bebida de café, em que a superioridade da bebida correlaciona com a maior quantidade da enzima. Seus resultados mostram ausência de transcritos em sementes frescas e presentes em sementes preparadas por via úmida desde o primeiro dia de secagem e por via seca a partir do terceiro dia de secagem.

A análise PCR semi-quantitativa da presente pesquisa revelou presença de fragmentos correspondentes ao gene codificador dessa enzima (ICL) nas fases finais do processo, época que as sementes estão formadas e aptas à germinação (Figura 40). Em Mundo Novo e Icatu Vermelho, a amplificação de transcritos do gene foi mais tardia, observada em fruto verde cana. Nas demais cultivares ocorreram fragmentos na fase



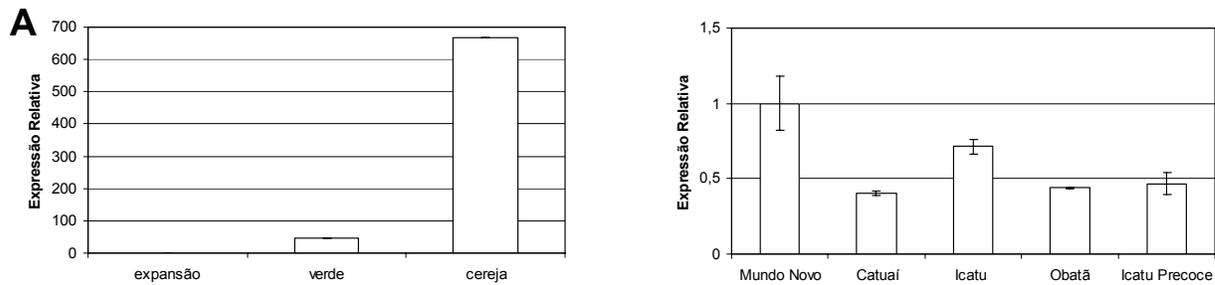


Figura 41 – Quantificação da expressão do gene ICL nos frutos do cafeeiro em expansão, verde e cereja na cultivar Mundo Novo (A) e na fase cereja para as cultivares Mundo Novo, Catuaí, Icatu Vermelho, Obatã e Icatu Precoce (B)

### 4.3 Considerações Gerais

Os resultados apresentados discutidos indicam que a estratégia experimental adotada para avaliar os atributos fenológicos foi eficiente, pois mesmo com grande influência ambiental pôde se diferenciar as cultivares quanto ao ciclo de desenvolvimento dos frutos.

Os atributos agronômicos evidenciam diferença entre as safras, o que indica que o fenômeno da bienalidade de produção do cafeeiro é influenciado pelas variações ambientais.

Nas análises genéticas, os genes relacionados ao desenvolvimento do embrião podem ser divididos em: (i) formação (GN, SCR, STM, ARF e ASN1) e (ii) germinação (ABA3/FLACCA e cat). Os resultados das análises evidenciaram que os genes desse grupo apresentaram amplificação de transcritos em todas as fases de desenvolvimento dos frutos, hipótese que era esperada e foi comprovada na presente pesquisa.

Os genes relacionados com os componentes químicos dos frutos podem ser reunidos na biossíntese da cafeína (MS, TS e CS), dos ácidos clorogênicos (CCoAOMT1 e 4cl), de metabólitos secundários (PAL, CHS e IFS), da síntese de aroma (AAT) e de açúcares (GLA e manB). Aqueles relacionados com a síntese da cafeína e dos ácidos clorogênicos diminuíram a intensidade dos fragmentos com a proximidade da maturação, enquanto os demais genes, desse grupo, intensificaram nas fases finais

de desenvolvimento.

No processo de maturação e amadurecimento dos frutos os genes estudaram-se àqueles relacionados com a síntese de etileno (ACO, ACS, ERF e ETR), bem como GR, DH, ER5 e ICL. A maioria desses genes aumentou a intensidade dos fragmentos nas fases finais de desenvolvimento dos frutos, exceto os genes DH e EMB3, os quais mantiveram a mesma expressão em todos os estádios de desenvolvimento do fruto.

Os resultados das análises genéticas apresentados pelos grupos de componentes químicos e maturação e amadurecimento dos frutos corroboram os dados revisados na literatura para as espécies de maturação climatérica (TAIZ; ZEIGER, 2004; CASTRO et al., 2005). Durante o climatério aumenta a síntese de etileno e, conseqüentemente, há, também, aumento da expressão dos genes relacionados ao hormônio.

As variações de intensidade de fragmentos entre as cultivares sugerem que a composição química e a maturação podem diferir ao longo do desenvolvimento dos frutos. Porém, essa diferença não indica duração do ciclo, em razão de não estarem relacionadas à precocidade.

Os resultados das análises genéticas sugerem que para a identificação da duração do ciclo de desenvolvimento dos frutos, as amostras deveriam ser coletadas utilizando, como referência, dias após a florada. Esse procedimento permitiria observar a mudança de expressão dos genes desde o início. As análises indicaram também que a partir de frutos em expansão até o final da maturação (grão cereja) seria a principal fase dos frutos para estudos dessa natureza. Nesse período, ocorreram as principais variações de expressão gênica.

Entre as cultivares, pode-se ainda observar que as cultivares Obatã e Icatu Vermelho apresentaram maior variação na expressão dos genes, na frutificação, o que sugere serem cultivares ainda instáveis para essa característica, possivelmente porque são oriundas de cruzamento interespecífico e, portanto, trata-se de material em segregação.

As análises RT-PCR forneceram subsídios para a observação do perfil de expressão dos genes estudados. Nos resultados não se verificou a ocorrência de polimorfismo de expressão e de polimorfismo gênico (tamanho de fragmentos).

Verificou somente polimorfismo temporal entre as fases de desenvolvimento dos frutos e entre as cultivares, o que foi confirmado nas análises de quantificação da expressão gênica. A possibilidade da existência de polimorfismo gênico e de expressão não é descartada, pois a região amplificada do gene foi pequena, e pode não ter abrangido a região polimórfica.

Os resultados do polimorfismo temporal possibilitaram a identificação de alguns genes candidatos a marcadores genéticos das fases de desenvolvimento dos frutos de cafeeiro arábica (Tabela 3). Esses genes marcadores em associação com atributos fenológicos e agrônômicos, podem ser utilizados como parâmetros moleculares para a definição dos estádios para a colheita, assegurando composição final específica dos frutos e a qualidade da bebida.

A fase de crescimento, compreendida entre a fase de ovário fecundado até grão verde, foi marcada pelo padrão de expressão dos genes PAL, CHS e manB. Como observado nas análises por RT-PCR e PCR quantitativo, o gene PAL apresentou aumento de expressão em frutos em expansão e redução no grão verde - fruto com tamanho máximo. O gene PAL sintetiza compostos fenólicos secundários e sua expressão é altamente influenciada pelo ambiente, por estar relacionada à proteção das plantas.

O gene CHS está relacionado, também, com a síntese de compostos importantes à proteção das plantas, principalmente contra raios UV. Nas análises desse estudo foi observada presença constante de fragmentos amplificados em todas as fases de desenvolvimento dos frutos, exceto em fruto verde, na fase de transição entre crescimento e maturação. O gene manB, que sintetiza a enzima endo- $\beta$ -mannanase, está presente em maior quantidade quando os frutos estão aptos à germinação, o que acontece em grão verde, época que os fragmentos são visualmente menos intensos.

A transição do crescimento para o início da maturação foi marcada pelos genes csp1, GLA e ER5. O gene csp1, que codifica a proteína de reserva 11S, apresentou transcritos intensos a partir de fruto verde – com endosperma formado. A enzima  $\alpha$ -galactosidase, envolvida na síntese de carboidratos e o gene codificador da enzima, aumenta substancialmente a expressão em grão verde com decréscimo na fase cereja, comprovado pelos resultados da presente pesquisa.

ER5 é um gene da família LEA, relacionado à resposta ao etileno. Esse gene apresenta significativo aumento na intensidade dos fragmentos na fase verde, assim como para os demais genes que marcam a referida fase.

Os genes indicativos da maturação e amadurecimento dos frutos de cafeeiro arábica foram: CS, AAT, ACS, ACO, ETR e ICL. O gene CS, respondeu pela síntese da cafeína sintase, cuja expressão reduziu marcadamente a partir de fruto verde cana, devido ao início da maturação. O gene AAT sintetiza a enzima relacionada ao desenvolvimento do aroma em frutos de cafeeiro, e se manifesta desde o início da maturação, quando a amplificação de transcritos é intensa.

ACC sintase e ACC oxidase são enzimas da biossíntese do etileno, codificadas pelos genes ACS e ACO, respectivamente. Nesse estudo, análise semi-quantitativa para expressão desses genes evidenciaram aumento da intensidade de transcritos amplificados em frutos verde cana e cereja, fases com intensa síntese de etileno. O gene para receptor de etileno (ETR) apresentou o mesmo padrão de expressão que os da biossíntese do etileno. A enzima ICL presente durante a germinação das sementes e o gene codificador, avaliado nesta pesquisa, apresentou aumento de expressão a partir da fase verde cana, com maior intensidade na fase cereja.

A transição da maturação para amadurecimento também é marcada pelo gene PAL. Aumentou a expressão do gene no início da maturação (vc) até a fase cereja (c).

Devido aos genes PAL e CHS serem influenciados pelo ambiente, as fases de crescimento e transição entre maturação e amadurecimento, marcada pela expressão diferencial do gene PAL, e a fase de transição entre crescimento e maturação, marcada pelo gene CHS, serão definidas pelas condições ambientais como: temperatura e disponibilidade hídrica. As condições ambientais podem antecipar ou retardar a expressão desses genes, o que influenciaria a duração do ciclo da frutificação.

Assim, como observado nas Figuras 5, 6 e 7, altas temperaturas reduzem o desenvolvimento dos frutos, atingindo o ponto de colheita antecipadamente. Além do que influencia nas características tecnológicas do produto, como: produção, grãos normais e tamanhos dos grãos (Figura 8). A deficiência hídrica afeta, principalmente, as características comerciais do produto e a produção, em razão do aborto de flores quando submetidas a longos períodos de estiagem.

Tabela 3 – Fases fenológicas dos frutos de cafeeiro arábica e respectivos marcadores gênicos, em que o sinal (–) indica ausência de transcritos, (+/-) baixa expressão, (+) expressão normal e (++) alta expressão de transcritos

Desenvolvimento frutos	crescimento				maturação	amadurecimento	Fator ambiental	
Fases fenológicas								
	ov	ch	ex	v	vc	c	en	
	SET/OUT/NOV/DEZ				JAN/FEV/MAR	ABR/MAI/JUN		
Genes marcadores	PAL, CHS, manB				CS, AAT, ACS, ACO, ETR, ICL			água, luz, temperatura
					csp1, GLA, ER5			
					PAL			temperatura e água
Padrão de expressão de genes marcadores	PAL	+/-	+/-	++	-	+/-	+	-
	CHS	+	+	+	-	+	+	-
	manB	+	+	+	-	+	+	+
	csp1	-	-	-	+	+	+	+
	GLA	-	-	-	++	+	+	+
	ER5	-	-	-	+	+	+	+
	CS	+/-	+/-	+	+	-	-	-
	AAT	-	-	-	-	+	+	+
	ACS	+/-	+/-	+/-	+/-	++	+	+
	ACO	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	+
	ETR	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	++
	ICL	-	-	-	+	++	++	++

## 5 CONCLUSÕES

1. Os atributos fenológicos (duração do ciclo, fases de frutificação e maturação) e agronômicos (produção, rendimento, tipos de sementes e de peneira) variam com o ano agrícola e a duração do ciclo fenológico diferenciou as cultivares.

2. Não há diferença no padrão de expressão gênica entre as safras e as cultivares avaliadas apresenta padrão similar de comportamento.

3. As condições ambientais influenciam o padrão de expressão dos genes ABA, CHS, PAL e GR nas cultivares avaliadas.

4. O polimorfismo temporal observado nas cultivares permite identificar genes marcadores do desenvolvimento de frutos do cafeeiro arábica.

5. Os genes marcadores identificados na fase de crescimento dos frutos foram: PAL, CHS e manB; na transição entre crescimento e início da maturação (csp1, GLA e ER5); na maturação e amadurecimento (CS, AAT, ACS, ACO, ETR e ICL) e na transição entre maturação e amadurecimento o gene PAL.

6. A expressão dos genes apresentou padrão de espécie com maturação climatérica.

## REFERENCIAS

- ADAMS-PHILLIPS, L.; BARRY, C.; GIOVANNONI, J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. **Trends in Plant Science**, Kidlington , v. 9, n. 7, p. 331-338, 2004.
- ALBA, R.; PAYTON, P.; FEI, Z.; McQUINN, R.; DEBBIE, P.; MARTIN, G.B.; TANKSLEY, S.D.; GIOVANNONI, J.J. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 2954-2965, 2005.
- ALTSCHUL. S.F., GISH, W., MILLER, W., MEYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403- 410, 1990.
- ALVES, A. Melhoramento do cafeeiro – novas determinações sobre poliembrionia, sementes sem embrião e lojas dos frutos sem sementes em *Coffea*. **Bragantia**, Campinas, v. 14, n. 27, p. 287-300 1955.
- ANTUNES FILHO, H.; CARVALHO, A. Melhoramento do Cafeeiro. VII – Ocorrência de lojas vazias em frutos de café “Mundo Novo”. **Bragantia**, Campinas, v. 13, n. 14, p. 165-179, 1954.
- ASHIHARA, H.; CROZIER A. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton v. 8, p. 3425-3431, 1999.
- BRIDSON, D.M. Studies in *Coffea* in *Psilanthus* (Rubiaceae Sub fam. Cinchonoideae) for part 2 of Flora Tropical East Africa: Rubiaceae. **Kew Bulletin** , London, v. 36, n. 4, p. 817-859, 1982.
- \_\_\_\_\_. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeaeae **Kew Bulletin**, London, v. 42, n. 2, p. 453-460, 1987.
- \_\_\_\_\_. Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from tropical East Africa. **Kew Bulletin**, London, v. 49, n. 2, p. 331-342, 1994.
- BRIDSON, D.M.; VERDCOURT, B. **Flora of tropical East África – Rubiaceae (Part 2)**, Cape Town: Iziko Museums of Cape Town, 1988. 727 p.

BUDZINSKI, I.G.F.; CAÇÃO, S.M.B.; CARNEIRO, C.E.A.; PEREIRA, L.F.P. Análise de genes expressos durante estádios finais da maturação de frutos de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais ...** Londrina: Embrapa, 2005. 1 CD-ROM.

BUSTAMANTE-PORRAS, J.; CAMPA, C.; PONCET, V.; NOIROT, M.; LEROY, T.; HAMON, S.; KOCHKO, A. Molecular characterization of an ethylene receptor gene (*CcETR1*) in coffee trees, its relationship with fruit development and caffeine content. **Molecular Genetic Genomics**, New York, v. 277, p. 701-712, 2007.

CAIRNS, N.G.; PASTERNAK, M.; WACHTER, A.; COBBETT, C.S.; MEYER, A.J. Maturation of Arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 446–455, 2006.

CAIXETA, E.T.; BAIÃO de OLIVEIRA, A.C.; ZAMBOLIM, E.M.; DINIZ, L.E.C. Avanços tecnológicos em biologia molecular: projeto genoma no melhoramento de plantas. In: ZAMBOLIM, L. **Produção integrada de café**. Viçosa: UFV. 2003. p. 223-246.

CAMARGO, A.P. O clima e a cafeicultura no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, p. 13-26, 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, 2001.

CAMAYO-VELEZ, G.C.; CHAVES-CORDOBA, B, AREILA-PULGARIN, J., JARAMILLO-ROBLEDI, A. Desarrollo floral del cafeto y su relacion com las condiciones climáticas de Chinchina-Caldas. **Cenicafé**, Chinchina, v. 54, n. 1, p. 35-49, 2003.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C. Café. In: FURLANI, A.M.C.; VIÉGAS, G.P. (Ed.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1993. v. 1, p. 29-76.

CARVALHO, A.; KRUG, C.A. Agentes de polinização da flor do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Bragantia**, Campinas, v. 9, p. 11-24, 1949.

CARVALHO, A.; MONACO, L.C. Natural cross pollination in *Coffea arabica*. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 26., Brussels. **Proceedings ...** Toronto: International Horticultural Society, 1962. v. 4, p. 447-449.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. 650 p.

CHARRIER, A. **La structure génétique des caféiers spontanés de la region Malgashe (Mascarocoffea)**. Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). Paris: ORSTOM, 1978. 223 p. (Memories ORSTOM, 87).

CHAVES, A.L.S.; MELLO-FARIAS, P.C. de. Ethylene and fruit ripening: from illumination gás to the control of gene expression, more than a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 29, n. 3, p. 508-515, 2006.

CHEVALIER, A. Lês caféiers du globe. III. Systematique dès caféiers. Maladies et insects nuisibles. **Encyclopedie Biologique**, Paris, v. 28, n. 3, p. 1-256, 1947.

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1: Chemistry, 306 p.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1: Chemistry, p. 153-202

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponivel em: [http://www.conab.gov.br/levantamento\\_200607.doc](http://www.conab.gov.br/levantamento_200607.doc). Acesso em 28 maio 2007.

CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de Coffea. Autoincompatibilidade em Coffea canephora Pierre ex Froehner. **Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo**, Campinas, v. 20, n. 34, 1961.

COSTE, R. **Cafetos y cafés en el mundo**. Paris: Maisonneuve e Larose, 1959. t. 2, 381 p.

CRUZ, C.D. **Programa genes: análise multivariada e simulação**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 175 p.

\_\_\_\_\_. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Disponivel em: [www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm](http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm) > Acesso em: 20 maio 2007.

DA SILVA, E.A.A.; BRAGA, E.A.; DE BRITO, K.M.; VINECKY, F.; ANDRADE, A.C. Determinação dos teores de ácido abscísico durante a fase de maturação de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais ...** Londrina: Embrapa, 2005. 1 CD-ROM.

DAVIS, A.P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D.M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 152, p. 465-512, 2006.

DHAUBHADEL, S.; GIJZEN, M.; MOY, P.; FARHANGKHOEE, M. Transcriptome analysis reveals a critical role of CHS7 and CHS8 genes for isoflavonoid synthesis in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 326-338, 2007.

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

DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1998. 418 p.

DI LAURENZIO, L.; WYSOCKA-DILLER, J.; MALAMY, J. E.; PYSH, L.; HELARIUTTA, Y.; FRESHOUR, G.; HAHN, M. G.; FELDMANN, K. A.; BENFEY, P. N. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. **Cell**, Cambridge, v. 86, p. 423-433, 1996.

DONG, J.Z.; DUNSTAN, D. I. Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. **Planta**, Berlin, v. 199, n. 3, p. 459-466, 1996.

DRORY, A.; WOODSON, W.R. Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding catalase from tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p. 1605-1606, 1992.

EIRA, M.T.S.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G.; SERA, T.; PEREIRA, A.A.; SAKIYAMA, N.S.; ZAMBOLIM, L.; CARVALHO, C.H.; PADILHA, L.; SOUZA, F.F. Bancos de germoplasma de café no Brasil: base do melhoramento para produtividade e qualidade. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007. **Anais ...** Águas de Lindóia; EMBRAPA, 2007. 1 CD-ROM.

FAZUOLI, L.C. **Avaliação de progênies de café Mundo Novo (*Coffea arabica* L.)**. 1977. 146 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1977.

\_\_\_\_\_. **Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência a *Hemileia vastatrix***. 1991. 322 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

FAZUOLI, L.C.; MALUF, M.P.; GUERREIRO FILHO, O.; MEDINA FILHO, H.P.; SILVAROLLA, M.B. Melhoramento clássico do cafeeiro relacionado com a biotecnologia moderna. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais ...** Londrina: SIBAC, 1999. p. 217-229.

FAZUOLI, L.C.; MEDINA FILHO, H.P.; GONÇALVES, W.; GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado de arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: UFV, 2002. p. 163-215.

FEI, Z.; TANG, X.; ALBA, R. M.; WHITE, J. A.; RONNING, C. M.; MARTIN, G. B.; TANKSLEY, S. D.; GIOVANNONI, J. J. Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. **The Plant Journal**, Oxford, v. 40, p. 47-59, 2004.

FEINBAUM, R. L.; AUSUBEL, F. M. Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. **Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 8, n. 5, p. 1985-1992, 1988.

GASPARI-PEZZOPANE, C.; MALUF, M.P. ; PINTO, F.O. Expressão gênica diferencial em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios de desenvolvimento e maturação. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais ...** Londrina: Embrapa, 2005. 1 CD-ROM.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L.P.; GUERREIRO, S.M.C.; CAVALARI, A.A.; POT, D.; PEREIRA, L.F.P.; LEROY, T.; VIEIRA, L.G.E.; MAZZAFERA, P.; MARRACCINI, P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 3243-3258, 2006.

GOETZ, M.; VIVIAN-SMITH, A.; JOHNSON, S.D.; KOLTUNOW, A.M. AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1873-1886, 2006.

GOUVEIA, N.M. **Estudo da diferenciação e crescimento das gemas florais de Coffea arabica L.: observações sobre antese e maturação dos frutos**. 1984. 237 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1984.

GUERREIRO FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B.; CARVALHO, C.H.S.; FAZUOLI, L.C. Características morfológicas utilizadas para identificação de cultivares de café. In: CARVALHO, C.H.S. (Ed.). **Cultivares de café: guia para identificação e recomendação**. 2007. (No prelo).

HINNIGER, C.; CAILLET, V.; MICHOUX, F.; BEN AMOR, M.; TANKSLEY, S.; LIN, C.; MCCARTHY, J. Isolation and characterization of cDNA encoding here dehydrins expressed during *Coffea canephora* (robusta) grain development. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, p. 755-765, 2006.

HUANG, R.; XIA, R.; HU, L.; LU, Y.; WANG, M. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, p. 166–172, 2007.

JU, Z.; LIU, C.; YUAN, Y. Activities of chalcone synthase and UDPGal: flavonoid-3-o-glycosyltransferase in relation to anthocyanin synthesis in apple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 63, p. 175-185, 1995.

KOSHIRO, Y.; ZHENG, X.Q.; WANG, M.L.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. **Plant Science**. Amsterdam, v. 171, p. 242-250, 2006.

KUMAR, D. Some aspects of the hysiology of *Coffea arabica* L.: a review. **Kenya Coffee**, Nairobi, v. 44, n. 519, p. 9-47, 1979.

LAM, H.-M.; WONG, P.; CHAN, H.-K.; YAM, K.-M.; CHEN, L.; CHOW, C.-M.; CORUZZI, G.M. Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 926-935, 2003.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 261, n. 2, p. 259-266, 1999.

LEPELLEY, M.; CHEMINADE, G.; TREMILLON, N.; SIMKIN, A. Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 172, p. 978-996, 2007.

LEVY, F.A.; BOGDAN, I.; FERRAZ, J.T.; DELLA TORRE, M.A.; CARAVALHO, A. Precocidade de maturação no cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do Café, 1989. p.155-157.

LIN, C.; MUELLER, L.A.; Mc CARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PÉTIARD, V.; TANKSLEY, S. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, p. 114-130, 2005.

LINCOLN, C.; LONG, J.; YAMAGUCHI, J.; SERKAWA, K.; HAKE, S. A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 1859-1876, 1994.

LUNZ, A. **Crescimento e produtividade do cafeeiro sombreado e a pleno sol**. 2006. 94 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MARRACCINI, P.; DESHAYES, A.; PÉTIARD, V.; ROGERS, W.J. Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, p. 273-282, 1999.

MARRACCINI, P.; ROGERS, W.J.; ALLARD, C.; ANDRÉ, M.L.; CAILLET, V.; LACOSTE, N.; LAUSANNE, F.; MICHAUX, S. Molecular and biochemical characterization of endo- $\beta$ -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. **Planta**, Berlin, v. 214, p. 296-308p. 2001.

MATIELLO, J.B.; GARCIA, A.W.R. Efeito da irrigação por aspersão em cafeeiros cultivados em Varginha – MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 32., 2006, Poços de Caldas. **Anais ...** Poços de Caldas: APA; PROCAFÉ; UNPROCAFÉ; UFLA; UNIUBE; AFÉPOÇOS, 2006. p. 49-50.

MAYER, U.; BUETTNER, G.; JIRGENS, G. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the *gnom* gene. **Development**, Cambridge, v. 117, p. 149-162, 1993.

MENDES, A.J.T.; MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M. Citologia da ocorrência de frutos sem sementes no café Mundo Novo. **Bragantia**, Campinas, v. 13, p. 257-279, 1954.

MELO, G. A. **Purificação da enzima polifenoloxidase do cafeeiro, sua relação com resistência a pragas e o controle da síntese de seu principal substrato, o ácido clorogênico**. 2005. 98 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MIZZUNO, K.; OKUDA, A.; KATO, M.; YONEYAMA, N.; TANAKA, H.; ASHIHARA, H.; FUJIMURA, T. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 534, p. 75-81, 2003.

MONACO, L.C. Efeito das lojas vazias, sobre o rendimento do café Mundo Novo. **Bragantia**, Campinas, v. 19, n.1, p. 1-12, 1960.

MOORE, S.; VREBALOV, J.; PAYTON, P.; GIOVANNONI, J. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 377, p. 2023-2030, 2002.

NAKATSUKA, A.; MURACHI, S.; OKUNISHI, H.; SHIOMI, S.; NAKANO, R.; KUBO, Y.; INABA, A. 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, p. 1295–1305, 1998.

NACHTIGAL, J.C.; KLUGE, R.A.; FACHINELLO, J.C.; BILHALVA, A.B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Pelotas: Rural, 1997. 163 p.

OELLER, P.; MIN-WONG, L.; TAYLOR, L.; PIKE, D.; THEOLOGIS, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, Washington, v. 254, p. 437-439, 1991.

OLIVEIRA, M.P.A. **Expressão de genes da biossíntese de cafeína em frutos e endospermas de *Coffea arabica*: sem cafeína**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2007.

O'NEILL, S.D.; TONG, Y.; SPÖRLEIN, B.; FORKMANN, G.; YODER, J.I. Molecular genetic analysis of chalcone synthase in *Lycopersicon esculentum* and an anthocyanin-deficient mutant. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 224, n. 2, p. 279-288, 1990.

PEREIRA, L.F.P.; GALVÃO, R.M.; KOBAYASHI, A.K.; CAÇÃO, S.M.B.; VIEIRA, L.G.E. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. Braz. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 17, n. 3, p. 283-289, 2005.

PEZZOPANE, J.R.M. **Avaliações microclimáticas, fenológicas e agronômicas em café arábica cultivado a pleno sol e consorciado com banana 'Prata Anã'**. 2004. 136 p. Tese (Doutorado em Física do Ambiente Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

PEZZOPANE, J.R.M.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; THOMAZIELLO, R.A.; CAMARGO, M.B.P. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro Arábica. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 499-505, 2003.

RENA, A.B.; MAESTRI, M. Ecofisiologia do cafeeiro. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1987. p. 119-147.

RIBEIRO, M.N.O.; ALMEIDA, G.R.R.; GUIMARÃES, R.J.; MENDES, A.N.G. Influência dos diferentes processos de condução da lavoura sobre a maturação dos frutos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 30., 2004, São Lourenço. **Anais ...** São Lourenço: EMBRAPA, 2004. p. 81-82.

ROBERTIS, J.; DE SIMONE, N.; LINGLE, W.; DURE, L. Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 769-780, 1993.

ROGIERS, S.Y.; KUMAR, G.N.M.; KNOWLES, N.R. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 203-211, 1998.

SAGI, M.; FLUHR, R.; LIPS, S. H. Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a flacca tomato mutant with deficient abscisic acid and wilted phenotype. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 571-577, 1999.

SELMAR, D.; HUNECKE, D.; JUNGHÄRTCHEN, I.; BREITENSTEIN, B.; BYTOF, G.; KNOPP, S.E. Expression of isocitrate lyase and the abundance of  $\beta$ -tubulin: feasible markers for the estimation of germination processes in differently processed green coffees. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 19., 2001, Trieste. **Abstracts ... Trieste: ASIC, 2001. p. 257-260.**

SETZER, J. **Atlas climatológico e ecológico do Estado de São Paulo**. São Paulo: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí; Centrais Elétricas do Estado de São Paulo, 1966. 61 p.

SEVERINO, L.S.; SAKIYAMA, N.S.; PEREIRA, A.A.; MIRANDA, G.V.; ZAMBOLIM, L. Herdabilidade de características agrônômicas em café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos ... Poços de Caldas: EMBRAPA, 2000. 1 CD-ROM.**

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TYAGI, S.; BRATU, D.P.; KRAMER, F.R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 49-53, 1998.

UBI, B.E.; HONDA, C.; BESSHO, H.; KONDO, S.; WADA, M.; KOBAYASHI, S.; MORIGUCHI, T. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. **Plant Science**, Amsterdam, v. 170, p. 571-578, 2006.

VIEIRA, L. G.E.; ANDRADE, A.C. ; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.H.A.; METHA, Â.; OLIVEIRA, A.C.; LABATE, C.A.; MARINO, C. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MONTE, D.C.; GIGLIOTI, É.; KIMURA, E.T; ROMANO, E.; KURAMAE, E E.; LEMOS, E.G.M.; ALMEIDA, E.R.P.; JORGE, E.C.; ALBUQUERQUE, E.V.S.; SILVA, F.R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H.E.; DORRY, H.F.A.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J.A.N.; TEIXEIRA, J.B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K.G.; LIMA, L M.; CAMARGO, L.E.A.; PEREIRA, L.F.P.; COUTINHO, L.L.; LEMOS, M.V.F.; ROMANO, M.R.; MACHADO, M.A.; COSTA, M.M.C.; SÁ, M.F.G.; GOLDMAN, M.H.S.; FERRO, M.I.T.; TINOCO, M.L.P; OLIVEIRA, M.C.; VAN SLUYS, M-A.; SHIMIZU, M.M.; MALUF, M.P; EIRA, MIRIAN T.S.; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P.D.S.C.; OLIVEIRA, R. L.B.C.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S.F.; TSAI, SIU MUI; MAURO, S.M. Z.; SANTOS, S.N.; SIQUEIRA, W.J.; COSTA, G.G.L.; FORMIGHIERI, E.F.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.G.; Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

WILKINSON, J.Q.; LANAHAN, H.-C.Y.; GIOVANNONI, J.J.; KLEE, H.J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. **Science**, Washington, v. 270, p. 1807-1809, 1995.

YOUNG, L.C.T.; CONN, E.E. The Reduction and Oxidation of Glutathione by Plant Mitochondria. **Plant Physiology**, Rockville, v. 31, n. 3, p. 205–211, 1956.

XIONG, L.; ISHITANI, M.; LEE, H.; ZHU, J.K. The *Arabidopsis* LOS5/aba3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress– and osmotic stress–responsive gene expression. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 2063–2083, 2001.

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; FRASSE, P.; MAITRE, B.; LATCHÈ, A.; PECH, J.-C.; BOUZAYEN, M. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 589-600, 1999.

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; MARTY, C.; LELIÈVRE, J.-M.; LATCHÈ, A.; PECH, J.-C.; BOUZAYEN, M. ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 847-854, 1997.

ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional of a cDNA encoding coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. **Gene**, Amsterdam, v. 140, n. 2, p. 227-231, 1994.

**ANEXO**

## ANEXO A – Resultados obtidos com o sequenciamento dos cDNAs

Genes	Homologia		E value	Similaridade (%)	Identidade (%)
	Organismo	Produto			
ABA3/FLACCA	<i>L. esculentum</i>	cofator molibdênio sulforase	2e-18	75	55
ARF	<i>Ipomoea nil</i>	fator de resposta à auxina	8e-47	96	93
ASN1	<i>L. esculentum</i>	asparagina sintase	9e-72	100	94
DH	<i>C. canephora</i>	dehydryn	3e-18	100	100
EMB3	<i>A. thaliana</i>	proteína da família LEA	1e-49	93	85
ER5	<i>Brassica napus</i>	proteína da família LEA	3e-09	96	88
ERF1	<i>Gossypium hirsutum</i>	fator de resposta ao etileno	3e-22	74	55
ETR1	<i>Solanum tuberosum</i>	receptor de etileno	2e-49	92	84
GN	<i>A. thaliana</i>	GNOM	1e-30	90	84
LEC1	<i>S. tuberosum</i>	fator de transcrição	1e-17	100	92
SC	<i>A. thaliana</i>	SCARECROW	1e-44	89	70
STM	<i>Prunus persica</i>	proteína homeobox	6e-59	96	92