



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA FREITAS DE OLIVEIRA

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES PUTATIVOS
ENVOLVIDOS NAS VIAS DE BIOSÍNTESE DE
DITERPENOS EM CAFEEIROS**

Londrina
2016



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FERNANDA FREITAS DE OLIVEIRA

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES PUTATIVOS
ENVOLVIDOS NAS VIAS DE BIOSÍNTESE DE
DITERPENOS EM CAFEEIROS**

FERNANDA FREITAS DE OLIVEIRA

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES PUTATIVOS
ENVOLVIDOS NAS VIAS DE BIOSÍNTESE DE
DITERPENOS EM CAFEEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira

Coorientador: Dr. Juarez Pires Tomaz

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL ¶

Oliveira, Fernanda Freitas de. ¶

Perfil transcricional de genes putativos envolvidos nas vias de biossíntese de diterpenos em cafeeiros / Fernanda Freitas de Oliveira. -- Londrina, 2016. ¶
64 f. ¶

Orientador: Luiz Filipe Protásio Pereira. ¶

Coorientador: Juarez Pires Tomaz. ¶

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) -- Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2016. ¶

Inclui bibliografia. ¶

1. Genética vegetal -- Tese. 2. Genética Expressão -- Tese. 3. Café -- Tese. 4. Diterpenos -- Tese. I. Pereira, Luiz Filipe Protásio. II. Tomaz, Juarez Pires. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título. ¶

FERNANDA FREITAS DE OLIVEIRA

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES PUTATIVOS ENVOLVIDOS
NAS VIAS DE BIOSÍNTESE DE DITERPENOS EM CAFEEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Coorientador: Dr. Juarez Pires Tomaz
Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR

Dr. Laurival Antonio Villas-Boas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Alessandra Ferreira Ribas
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste

Londrina, 31 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina, ao curso de pós-graduação e aos professores, pela oportunidade e pelo aprendizado essencial a minha formação. Ao IAPAR, pela estrutura e apoio indispensáveis a esse trabalho. A EMBRAPA Café, pelo suporte financeiro. À Capes, pela concessão da bolsa.

Aos meus orientadores Dr. Luiz Filipe e Dr. Juarez, por terem me ajudado em todos os momentos, pelas correções e paciência, pelas contribuições a minha formação.

Aos doutores Laurival Villas-Boas e Alessandra Ribas, pela disposição em avaliar esse trabalho. Também aos doutores Maria Brígida e Tiago, que participaram da minha qualificação.

Aos meus pais dedico esse trabalho, pelo incentivo, amor e afeto em todos os dias de minha vida. Aos meus irmãos, por serem minhas eternas companhias. A minha família, em especial aos meus avós.

Aos meus amigos, Ana Luiza, Marli e Carolini por sempre estarem comigo e pelas orações. Aos meus amigos de Londrina, Amanda, Ana Carolina, Pamela e principalmente ao meu namorado José Fernando, por todo apoio, amor e atenção.

Aos meus colegas do LBI, ao apoio técnico e às colegas de orientação que me ajudaram no trabalho. Aos meus amigos do lab Tiago, Bruna, Suzana e Lucinéia pela amizade e companheirismo.

A Deus, pela vida e por ter me proporcionado momentos de vitória como esse. A todos que contribuíram com esse trabalho direta ou indiretamente.

OLIVEIRA, Fernanda Freitas de. **Perfil transcricional de genes putativos envolvidos nas vias de biossíntese de diterpenos em cafeeiros**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Isoprenóides são moléculas do metabolismo secundários de plantas que desempenham importantes papéis. Existem duas vias independentes de biossíntese que dão origem a diferentes isoprenóides: via citosólica ou do mevalonato (MVA) e via plastídica ou não mevalonato (MEP). Diterpenos de café são isoprenóides com 20 carbonos, dos quais destacam-se cafestol e caveol. Estes compostos únicos de cafeeiros estão relacionados à qualidade da bebida, apresentam propriedades nutraceuticas e comprovado efeito na saúde humana. Apesar da sua importância existem poucos trabalhos verificando os genes envolvidos nas vias metabólicas dos diterpenos. Trabalhos sugerem que há tendência entre o acúmulo desses compostos com o amadurecimento do fruto e que genes que codificam para Citocromos P450 (*Cyt P450*) atuam no fim das vias metabólicas de isoprenóides. Genes específicos de café que participam da via também já foram descobertos. O intuito desse trabalho foi averiguar a expressão de quatro genes *Cyt P450* (*Ca_28*, *Ca_33*, *Ca_37* e *Ca_107*) e de enzimas das vias MVA e MEP (*Ca_HMGR*, *Ca_MPDC*, *Ca_DXR* e *Ca_IDS*), relacionando aos sistemas de cultivo sombreado e a pleno sol. Também foram avaliadas as expressões destes genes em genótipos de uma coleção de cafeeiros do centro de origem (Etiópia) com diferentes níveis de cafestol e caveol, previamente determinados. Resultados evidenciaram que a expressão dos genes *Cyt P450* em frutos desenvolvidos a pleno sol e que há tendência entre concentrações de cafestol e caveol com a transcrição dos genes em estudo.

Palavras-chave: *Cyt P450*. Cafestol. Caveol. *Coffea sp.* qPCR. Isoprenoids.

OLIVEIRA, Fernanda Freitas de. **Transcriptional profile of putative genes involved in the biosynthesis pathways diterpenes in coffee**. 64 p. Master's Degree (Graduate Studies in Genetics and Molecular Biology). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Isoprenoids are molecules of secondary metabolism of plants that play important roles. There are two independent pathways for biosynthesis, which give rise to different isoprenoid: MVA and MEP pathway. Coffee diterpenes are 20 carbons' isoprenoid, which stand cafestol and kahweol. These unique compounds of coffee are related to human health, nutraceutical properties, the beverage quality, among others. Although its importance, a few studies with the genes in the metabolic pathways exist. Studies suggest that there is a tendency among the accumulation of these compounds with the ripening of the fruit and that cytochromes (*Cyt P450*) genes act at the end of the metabolic pathways of isoprenoid. Specific coffee genes that participate in the pathway have also been discovered. The purpose of this study was to investigate the expression of four *Cyt P450* (*Ca_28*, *Ca_33*, *Ca_37* and *Ca_107*) and pathways enzymes genes' (*Ca_HMGR*, *Ca_MPDC*, *Ca_DXR* and *Ca_IDS*) regarding the cropping system, shaded and full sun. At the same step, the expression of these genes were also evaluated in genotypes from the IAPAR Ethiopia collection's with different levels of cafestol and kahweol. It was observed that the expression of these genes is higher in full sun and that there is a tendency among coffee concentrations and kahweol with the transcription of genes under study. It was observed that the expression is increased in full sun and that there is a tendency of cafestol and kahweol concentrations with transcription of the genes under study.

Keywords: *Cyt P450*. Cafestol. Kahweol, *coffea sp.* qPCR. Isoprenoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura molecular do cafestol (C ₂₀ H ₂₈ O ₃) e do caveol (C ₂₀ H ₂₈ O ₃), adaptado de PEREIRA & IVAMOTO (2015).....	18
Figura 2.	Vias de biossíntese de isoprenóides em café: via do mevalonato (MVA) e via do não mevalonato (MEP). Setas cheias indicam reações já conhecidas; setas pontilhadas indicam hipótese de reação enzimática (adaptado de PEREIRA & IVAMOTO, 2015).	19
Figura 3.	Hipótese da via de biossíntese de cafestol e caveol com a inclusão dos genes candidatos de Cyts P450 identificados e propostos por Ivamoto (2012). Linhas pontilhadas indicam possíveis reações enzimáticas.	22
Figura 4.	Área de coleta em sistema agroflorestal de <i>Coffea arabica</i> em convênio com seringueiras.	25
Figura 5.	A) Desenvolvimento de frutos de café, frutos verdes com 90 DAF; frutos vermelhos com 210 DAF (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006); B) Tecidos de cafeeiro utilizados: endosperma (ed) e perisperma (ep).	26
Figura 6.	Padrão de expressão de genes da via MVA (<i>Ca_HMGR</i> e <i>Ca_MPDC</i>) de biossíntese de isoprenóides de <i>Coffea arabica</i> em frutos com 90 DAF e 210 DAF de plantas cultivadas a PS e em SAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- desvio padrão de 3 repetições A) Expressão gênica relativa de <i>Ca_HMGR</i> ; B) Expressão gênica relativa de <i>Ca_MPDC</i>	29
Figura 7.	Padrão de expressão de genes da via MEP (<i>Ca_DXR</i> e <i>Ca_IDS</i>) de biossíntese de isoprenóides de <i>Coffea arabica</i> em frutos com 90 DAF e 210 DAF de plantas cultivadas a PS e em SAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições A) Expressão gênica relativa de <i>Ca_DXR</i> ; B) Expressão gênica relativa de <i>Ca_IDS</i>	30
Figura 8.	Padrão de expressão de <i>Ca_28</i> de <i>Coffea arabica</i> em frutos de plantas cultivadas a PS e SAF em 90 DAF e 210 DAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem média +/- o desvio padrão de 3 repetições.	31
Figura 9.	Esquema subcelular da biossíntese de homoterpenos DMNT e TMTT em <i>Arabidopsis sp.</i> produzidos na via MVA (THOLL et al., 2011).	32
Figura 10.	Padrão de expressão de <i>Ca_33</i> de <i>Coffea arabica</i> em frutos de plantas cultivadas a PS e SAF em 90 DAF e 210 DAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem média +/- o erro padrão de 3 repetições.	33

Figura 11. Padrão de expressão de <i>Ca_37</i> de <i>Coffea arabica</i> em frutos de plantas cultivadas a PS e SAF em 90 DAF e 210 DAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem média +/- o erro padrão de 3 repetições.....	34
Figura 12. Reação enzimática de aleno óxido sintase em plastídeos de <i>Arabidopsis sp.</i> : conversão de 13-HPOT em aleno óxido (SVYATYNA & RIEMANN, 2012).	35
Figura 13. Padrão de expressão de <i>Ca_107</i> de <i>Coffea arabica</i> em frutos de plantas cultivadas a PS e SAF em 90 DAF e 210 DAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem média +/- o desvio padrão de 3 repetições.....	36
Figura 14. A) Desenvolvimento de frutos de café, fruto verde com 90 DAF; fruto vermelho com 210 DAF (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006); B) tecidos de cafeeiro utilizados: endosperma (ed) e perisperma (ep)	41
Figura 15. Teor de cafeol e caveol dos genótipos utilizados nesse trabalho, determinados por CLAE (PAGIATTO, 2013).	42
Figura 16. Padrão de expressão relativa dos genes <i>Ca_HMGR</i> , <i>Ca_MPDC</i> , <i>Ca_DXR</i> e <i>Ca_IDS</i> para o Grupo 1 [com maiores níveis de caveol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_HMGR</i> ; B) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_MPDC</i> ; C) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_DXR</i> ; D) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_IDS</i> . Totalidade de diterpenos nas respectivas amostras são: Relações de cav/caf das respectivas amostras são: E261/52: 2,11; E159/180: 3,09; E88/34: 3,44. Dados em escala logarítmica de base 2.	45
Figura 17. Concentrações de caveol determinados por CLAE para os genótipos do Grupo1 (PAGIATTO, 2013).	46
Figura 18. Padrão de expressão relativa dos genes <i>Ca_HMGR</i> , <i>Ca_MPDC</i> , <i>Ca_DXR</i> e <i>Ca_IDS</i> para o Grupo 2 [com maiores níveis de caveol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os genes. A) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_HMGR</i> ; B) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_MPDC</i> ; C) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_DXR</i> ; D) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_IDS</i> . Relações de cav/caf das respectivas amostras são: E286/67: 0,14; E287/29: 0,25; E270/44: 0,26; E139/54: 0,3. Dados em escala logarítmica de base 12.....	47
Figura 19. Concentrações de cafeol determinados por CLAE para os genótipos do Grupo 2 (PAGIATTO, 2013).	48

Figura 20.	Padrão de expressão relativa dos genes <i>Ca_HMGR</i> , <i>Ca_MPDC</i> , <i>Ca_DXR</i> e <i>Ca_IDS</i> para o Grupo 3 [com altos níveis de cafestol e caveol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_HMGR</i> ; B) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_MPDC</i> ; C) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_DXR</i> ; D) Expressão Gênica Relativa de <i>Ca_IDS</i> . Totalidade de diterpenos nas respectivas amostras são: E57/497: 2056,14; E183/138: 2128,13; E81/41: 2389,7. Dados em escala logarítmica de base 2.....	49
Figura 21.	Concentrações de cafestol e caveol determinados por CLAE (PAGIATTO, 2013) para os genótipos do Grupo 3. Os dados no gráfico correspondem à média de mg cafestol/100mg de base seca, +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes. A) concentração de Cafestol; B) concentração de Caveol.....	50
Figura 22.	Visão geral do padrão de expressão relativa para os genes das vias MVA e MEP para todos os genótipos em estudo. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. Grupo 1: E261/52, E159/180 e E88/34; Grupo 2: E286/67, E287/29, E270/44 e E139/54; Grupo 3: E57/497, E183/138 e E81/41. A) <i>Ca_HMGR</i> , B) <i>Ca_MPDC</i> , C) <i>Ca_DXR</i> e D) <i>Ca_IDS</i> . Dados em escala logarítmica de base 2.	51
Figura 23.	Padrão de expressão relativa dos genes <i>Ca_28</i> , <i>Ca_33</i> e <i>Ca_107</i> para o Grupo 1 [com maiores níveis de caveol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão gênica relativa de <i>Ca_28</i> ; B) Expressão gênica relativa de <i>Ca_33</i> , C) Expressão gênica relativa <i>Ca_107</i> . Relações de cav/caf das respectivas amostras são: E261/52: 2,11; E 159/180: 3,09; E88/34: 3,44.	53
Figura 24.	Padrão de expressão relativa dos genes <i>Ca_28</i> , <i>Ca_33</i> e <i>Ca_107</i> para o Grupo 2 [com maiores níveis de cafestol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão gênica relativa de <i>Ca_28</i> ; B) Expressão gênica relativa de <i>Ca_33</i> , C) Expressão gênica relativa <i>Ca_107</i> . Relações de cav/caf das respectivas amostras são E286/67: 0,14; E287/29: 0,25; E270/44: 0,26; E139/54: 0,3.	54

- Figura 25.** Padrão de expressão relativa dos genes *Ca_28*, *Ca_33* e *Ca_107* para o Grupo 3 [com altos níveis de caveol e cafestol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão gênica relativa de *Ca_28*; B) Expressão gênica relativa de *Ca_33*, C) Expressão gênica relativa *Ca_107*. Totalidade de diterpenos nas respectivas amostras são: E57/497: 2056,14; E183/138: 2128,13; E81/41: 2389,7. Dados em escala logarítmica de base 2.55
- Figura 26.** Visão geral do padrão de expressão relativa para os genes das vias MVA e MEP para todos os genótipos em estudo. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. Grupo 1: E261/52, E159/180 e E88/34; Grupo 2: E286/67, E287/29, E270/44 e E139/54; Grupo 3: E57/497, E183/138 e E81/41. A) *Ca_28*, B) *Ca_33* e C) *Ca_107*. Dados em escala logarítmica de base 2.57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de isoprenóides de acordo com o número de carbonos e unidades de isoprenos (adaptado de KOULOURA et al., 2014).....	17
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> para qPCR de <i>Cyt P450</i> ligados à biossíntese de cafestol e caveol (IVAMOTO, 2012).	27
Tabela 3. Sequência de <i>primers</i> para qPCR de genes que codificam para enzimas das vias MEP e MVA para avaliação da expressão gênica.	27
Tabela 4. Acessos da Etiópia da coleção do IAPAR e suas respectivas relações entre caveol e cafestol determinadas por CLAE (PAGIATTO, 2013). Grupo 1: maiores concentrações de caveol; Grupo 2: maiores concentrações de cafestol e Grupo 3: concentração alta de cafestol e caveol.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

210DAF	210 dias após a florada
90DAF	90 dias após a florada
ANOVA	Análise de variância
AOS	aleno óxido sintase
Caf	Cafestol
Cav	Caveol
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Cq	<i>quantification cycle</i>
Cyt P450	Citocromo P450
DMAPP	<i>dimethylallyl diphosphate</i>
DMNT	<i>4,8 – dimethylnona - 1,3,7 - triene</i>
DXR	<i>1-deoxy-5xylulose phosphate reductoisomerase</i>
Ed	endosperma
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Ep	perisperma
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HMBPP	<i>hydroxyl-methyl butenyl diphosphate</i>
HMGR	<i>3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA redutase</i>
HPL	hidroperoxiliase
ICO	<i>International Coffee Organization</i>
IDS	<i>Isopentenyl diphosphate synthase</i>
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
IPP	<i>Isopentenyl diphosphate isomerase</i>
JÁ	jasmonato
MEP	via independente do mevalonato – <i>metileritritol 4-fosfato</i>
MPDC	<i>mevalonate diphosphate decarboxylase</i>
MVA	via do mevalonato - <i>metileritritol 4-fosfato</i>
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
PCR	reação em cadeia da polimerase
OS	pleno sol
RNA	ácido ribonucleico
RNAseH	Ribonuclease
RQ	expressão relativa

RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SAF	Sistema agroflorestal
<i>Sm_DXR</i>	<i>S. miltiorrhiza DXR</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TMTT	<i>4,8,12 - trimethyltrideca – 1,3,7,11 – tetrane</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.	CAFÉ: ASPECTOS ECONÔMICOS	15
2.2.	CAFÉ: ORIGEM E ASPECTOS BOTÂNICOS	15
2.3.	SISTEMA AGROFLORESTAL (SAF) DO CAFEIEIRO	16
2.4.	DITERPENOS DO CAFÉ.....	17
2.5.	VIA DE BIOSÍNTESE DE ISOPRENÓIDES	19
2.6.	CITOCROMO P450 (Cyt P450)	20
3.	OBJETIVOS	23
3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4.	CAPÍTULO 1: INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE CULTIVO NA EXPRESSÃO DE GENES LIGADOS À BIOSÍNTESE DE DITERPENOS DE CAFÉ	24
4.1.	INTRODUÇÃO.....	24
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.2.1.	MATERIAL VEGETAL	25
4.2.2.	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA	26
4.2.3.	ANÁLISE TRANSCRICIONAL POR RT-qPCR.....	27
4.2.4.	ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	28
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.3.1.	EXPRESSÃO DE GENES QUE CODICAM PARA ENZIMAS DAS VIAS MEP E MVA.....	28
4.3.2.	EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES <i>Cyt P450</i>	31
4.4.	CONCLUSÃO	37
4.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
5.	CAPÍTULO 2: ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES DA BIOSÍNTESE DE DITERPENOS EM PLANTAS COM ALTO E BAIXO TEOR DE CAFESTOL E CAVEOL	40
5.1.	INTRODUÇÃO.....	40
5.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.2.1.	MATERIAL VEGETAL	41
5.2.2.	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA	43
5.2.3.	ANÁLISE TRANSCRICIONAL POR qPCR.....	43
5.2.4.	ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	44
5.2.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.2.6.	EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES DAS VIAS MVA E MEP.....	44
5.2.7.	EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES <i>Cyt P450</i>	52

5.3.	CONCLUSÃO	57
5.4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
6.	CONCLUSÃO GERAL	61
7.	REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

O café é a segunda bebida mais consumida do mundo e uma das principais *commodities* agrícolas. É produzido principalmente em países tropicais, como Brasil, Vietnã e Colômbia e também apresenta considerável importância para os países que o industrializam e o comercializam.

Estudos de biomoléculas visando a melhoria da qualidade da bebida e da tolerância de plantas a estresses bióticos e abióticos são importantes para o agronegócio do café. Nesse âmbito, destacam-se os lipídios de café que estão amplamente relacionados a qualidade de bebida. Entre os lipídios de café, pode-se citar os diterpenos cafestol e caveol que além de qualidade de bebida estão associados tanto com tolerância da planta a estresses bióticos e abióticos como efeitos na saúde humana.

Os diterpenos são metabólitos secundários originados de isoprenóides, cuja biossíntese ocorre tanto por meio da via do mevalonato (MVA) ou pela via independente do mevalonato – metileritritol 4-fosfato (MEP). Algumas enzimas que participam dessas vias são *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase* (HMGR), *mevalonate diphosphate decarboxylase* (MPDC), *isopentenyl diphosphate synthase* (IDS) e *1-deoxy-5-xylulose phosphate reductoisomerase* (DXR).

As etapas finais da via de biossíntese dos diterpenos ainda não foram elucidadas, mas estudos relacionados ao metabolismo secundário de café indicam o envolvimento de membros da família gênica das citocromos P450s (*Cyt P450*), que formam a terceira maior família de genes em plantas. Em *Coffea*, foram identificadas 87 *Cyt P450 in silico* pela avaliação de sequências *ESTs* disponíveis em banco de dados públicos.

Como os genes relacionados ao metabolismo secundário tem uma alta reposta a estímulos ambientais, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil transcricional de genes da via de biossíntese de isoprenóides, assim como de *Cyt 450*, em: 1) plantas com alto e baixo teor de diterpenos, e 2) plantas no sistema de cultivo Agroflorestal (SAF), para verificar a resposta dos genes ao estímulo ambiental.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CAFÉ: ASPECTOS ECONÔMICOS

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas consumidos em todo o mundo, sendo destaque na economia de muitos países. Trata-se de uma das principais *commodities* agrícolas mundial em países em desenvolvimento (ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).

A produção cafeeira destaca-se principalmente no Brasil, Vietnã e Colômbia, cujas produções somadas (safra 2015/16) equivalem a 60% da produção global (ICO, 2015). O café também possui importância em países não tropicais envolvidos no processo de industrialização e comercialização do grão (MONDEGO et al., 2011). A produção concentra-se em duas espécies, *Coffea arabica* e *C. canephora*, que correspondem a cerca de 60 e 40%, respectivamente (ICO, 2015).

A cadeia agroindustrial de café apresenta expressiva participação na exportação, na geração de emprego e de renda, além de representar um dos principais produtos estratégicos para economia brasileira (COSTA et al., 2013). No país, estima-se 1.977,5 mil hectares de área plantada com cafeeiros, com produção prevista para a safra de 2016 de cerca de 50 milhões de sacas de 60 Kg (CONAB, 2016). Os principais Estados produtores são: Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná, Rondônia e Goiás (CONAB, 2016).

2.2. CAFÉ: ORIGEM E ASPECTOS BOTÂNICOS

A espécie *C. arabica* tem origem na Etiópia, onde ainda faz parte da vegetação natural. Chegou à Europa no século XV, devido à propagação advinda da Arábia (OLIVEIRA et al., 2012). Originalmente, o café foi descoberto em sistemas sombreados (PERFECTO & VANDERMEER, 1996) e por essa razão, inicialmente, os cafezais brasileiros eram plantados sob grandes copas de árvores de modo a reproduzir seu ambiente natural (DAMATTA, 2004). Entretanto, com a evolução do cultivo de grãos, este passou a ser produzido em sistema a pleno sol, devido à maior produção (DAMATTA, 2004).

Os cafeeiros são plantas perenes, dicotiledôneas, com porte arbustivo, caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas. Pertencem à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, que engloba todas as espécies diplóides com $2n = 22$ cromossomos, com exceção da espécie tetraplóide *C. arabica*, com $2n = 44$ cromossomos (LASHERMES et al., 1999).

Existem 124 espécies conhecidas (DAVIS et al., 2011), mas apenas duas apresentam importância comercial: *C. arabica* L., conhecida como café arábica, responsável por bebida de alta qualidade e cultivada em regiões de altitude, porém com produção frequentemente afetada por doenças e pragas (FERRÃO et al., 2007; CONAB, 2015) e *C. canephora*, chamada de café robusta, conhecida como tolerante a algumas doenças e pragas, porém a qualidade do produto final é inferior à de *C. arabica* (FERRÃO et al., 2007; CONAB, 2015).

2.3. SISTEMA AGROFLORESTAL (SAF) DO CAFEEIRO

O sistema agroflorestal (SAF) entre cafeeiros e outras culturas perenes, como seringueira, melhora a sustentabilidade econômica, aumenta a estabilidade da produção, oferece condições microclimáticas mais apropriadas à produção, além de permitir ao produtor a obtenção de outros produtos como fonte de renda (FERRÃO et al., 2007).

O SAF diminui os custos relacionados à mão-de-obra no controle de plantas daninhas e reduz a incidência de cercóspera (*Cercospora coffeicola*) e de bicho-mineiro (*Perileucoptera coffella*) (FERRÃO et al., 2007). Bosselmann et al. (2009) sugerem que pode haver correlação entre qualidade da bebida e sombreamento de cafeeiros. Além disso, cafeeiros cultivados em SAF auxiliam no enriquecimento da física, química e biologia do solo (VELMOUROUGANE, 2015).

Ao mesmo passo, evidências sugerem que a diversidade no SAF promove o aumento da captura e a melhoria no processo de ciclagem de nutrientes (JOSE, 2009), além de gerar benfeitorias ao clima, visto que auxilia na estocagem de carbono atmosférico em forma de biomassa (COLTRI et al., 2015) e na preservação da biodiversidade (FERRÃO et al., 2007).

No entanto, o cafeeiro apresenta melhor crescimento e produção quando cultivado a pleno sol devido, especialmente, à diminuição na

competição por água e à menor incidência de doenças e pragas, como à ferrugem (*Hemeleia vastatrix*) e broca do café (*Hypothenemus hampei*) neste sistema de cultivo (FERRÃO et al., 2007). Estas características favoreceram o abandono do sombreamento como prática regular desde 1950 (DAMATTA, 2004). Porém, políticas públicas para mitigação dos efeitos do aquecimento global, como por exemplo o incentivo através de créditos de carbono, podem voltar a viabilizar o plantio em SAF.

2.4. DITERPENOS DO CAFÉ

Dentre os componentes químicos do grão de café estão os açúcares, sólidos solúveis, ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina e os lipídios (KY et al., 2001), sendo estes últimos importantes componentes ligados ao sabor e aroma da bebida (CAVIN et al., 2002).

Os lipídios são ricos em isoprenóides, que são metabólitos secundários produzidos pelas plantas (PEREIRA & IVAMOTO, 2015). Isoprenóides são classificados de acordo com o número de carbonos e unidades de isoprenos que eles contêm (Tabela 1) (KOULOURA et al., 2014).

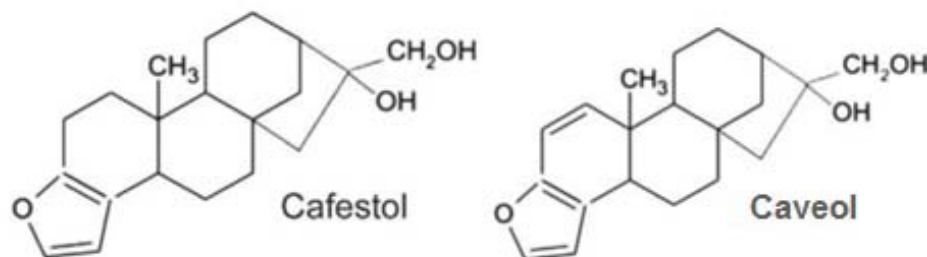
Tabela 1. Classificação de isoprenóides de acordo com o número de carbonos e unidades de isoprenos.

Classe dos isoprenóides	Nº de átomos de carbono	Nº de unidades de isoprenos
Hemiterpenos	C5	1
Monoterpenos	C10	2
Sesquiterpenos	C15	3
Diterpenos	C20	4
Sesterpenos	C25	5
Triterpenos	C30	6

Fonte: (adaptado de KOULOURA et al., 2014)

Os diterpenos de café são da família Caureno e os dois principais são cafestol ($C_{20}H_{28}O_3$) e caveol ($C_{20}H_{26}O_3$) (PEREIRA & IVAMOTO, 2015). O caveol difere do cafestol por uma dupla ligação entre o carbono 1 e 2 (Figura 1), levando a um espectro com a máxima absorção de pico em diferentes comprimentos de onda (KITZBERGER et al., 2013).

Figura 1. Estrutura molecular do cafestol ($C_{20}H_{28}O_3$) e do caveol ($C_{20}H_{28}O_3$),



Fonte: adaptado de PEREIRA & IVAMOTO (2015).

Os diterpenos também possuem efeitos conhecidos na saúde humana, principalmente o cafestol, que contribui para o aumento do colesterol sérico (URGERT et al., 1997). Porém, efeitos positivos também foram atribuídos aos diterpenos como: proteção contra aflatoxina B1 (CAVIN et al., 1998, BOEKSCHOTEN et al., 2004), atividade antioxidante (LEE & JEONG, 2007), anticarcinogênica (CAVIN et al., 2002), anti-inflamatória (CÁRDENAS et al., 2011) e propriedades anti-angiogênicas (CÁRDENAS et al., 2011; WANG et al., 2012). Somado ao potencial farmacêutico, os diterpenos têm atraído interesse substancial para utilização como nutracêuticos, sabores e fragrâncias e pelas suas atividades como biopesticida e anti-herbivoria (PATERAKI et al., 2015).

Pesquisas relacionadas aos diterpenos apresentam grande potencial de utilização biotecnológica, pois, além destes estarem relacionados à qualidade da bebida (SPEER et al., 1993), também possuem outros benefícios relacionados a indústria farmacêutica e cosmética.

Segundo DIAS et al. (2010), a produção de Cafestol e Caveol ocorre principalmente, no perisperma e ao longo do desenvolvimento do fruto esses diterpenos são transferidos para o endosperma, assim como o que ocorre para o metabolismo da sacarose (GEROMEL et al., 2006).

Análises quantitativas de cafestol e caveol entre genótipos de *C. arabica* demonstraram que existe uma variabilidade significativa em suas concentrações nos grãos verdes dentro de uma mesma espécie (intra-espécie), e isso indica que provavelmente exista um controle genético relacionado a biossíntese desses compostos (KITZBERGER et al., 2013b) (SCHOLZ et al. 2016). Pagiatto (2013) quantificou os teores destes diterpenos em cafeeiros de uma coleção do centro de origem (Etiópia) pertencente ao Instituto Agrônomo

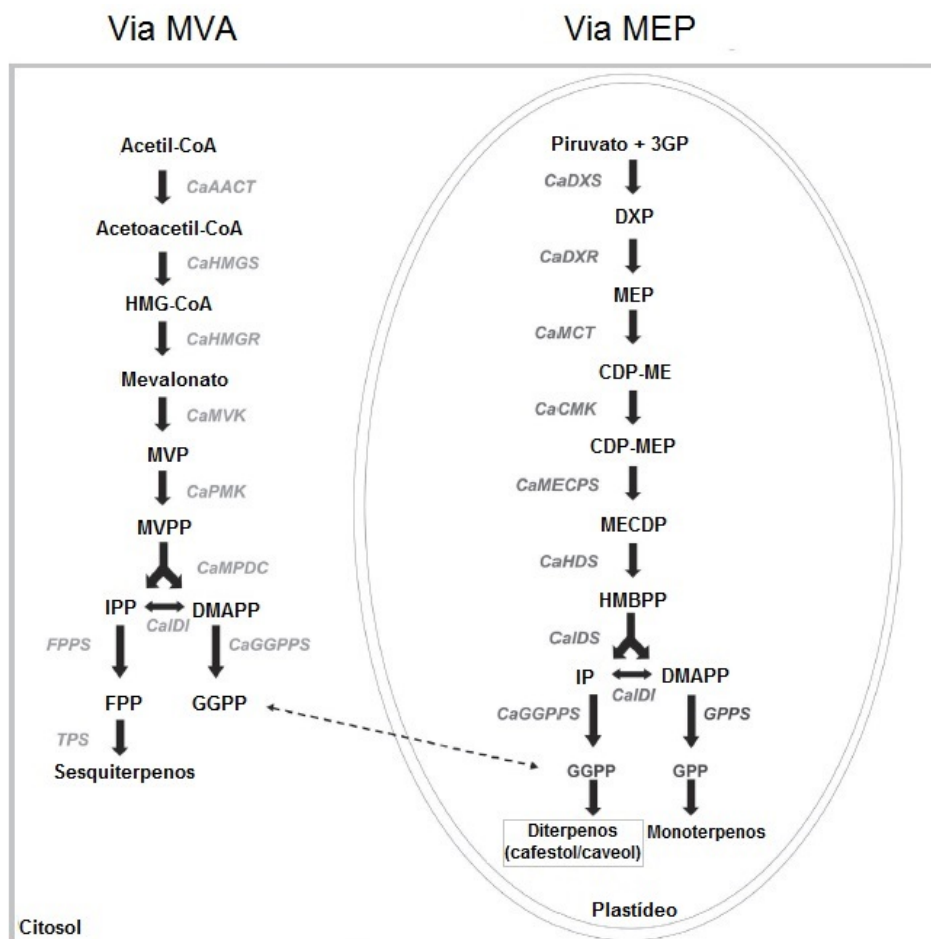
do Paraná (IAPAR), onde foi possível observar diferenças de até 10 vezes na concentração destes compostos.

Apesar de tal importância, poucos estudos abordando ao metabolismo de diterpenos em cafeeiros foram realizados.

2.5. VIA DE BIOSÍNTESE DE ISOPRENÓIDES

Duas vias estão envolvidas na biossíntese de isoprenóides em plantas (Figura 2): via do mevalonato (MVA) (que ocorre no citosol) e a via não mevalonato (MEP) (que ocorre no plastídeo) (PEREIRA & IVAMOTO, 2015).

Figura 2. Vias de biossíntese de isoprenóides em café: via do mevalonato (MVA) e via do não mevalonato (MEP). Setas cheias indicam reações já conhecidas; setas pontilhadas indicam hipótese de reação enzimática.



Fonte: (adaptado de PEREIRA & IVAMOTO, 2015)

A via MVA consiste em seis reações enzimáticas, cuja enzima chave é *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase* (HMGR) (DARABI et al., 2012). A família do gene *HMGR* apresenta um domínio conservado entre as

plantas e outros organismos. A essa família atribui-se importância por tratar-se de um elemento chave durante o desenvolvimento vegetal (DARABI et al., 2012). HMGR catalisa reações de conversão de HMG-CoA em mevalonato, é a enzima chave da via MVA que produz colesterol e outros isoprenóides (ISLAM et al., 2015).

Tiski et al. (2011) analisaram o perfil de transcrição de duas *Ca_HMGRs* em vários tecidos de frutos de cafeeiro com o intuito de entender o processo de formação de isoprenóides e sugerem que há expressão constitutiva para uma das isoformas (*CaHMGR2*), enquanto que a isoforma *CaHMGR1* apresenta expressão temporal tecido-específica.

Outra enzima da via MVA, que juntamente com *Ca_HMGR* será foco desse trabalho, é a *mevalonate diphosphate decarboxylase* (*Ca_MPDC*), que é responsável pela conversão de *mevalonate 5-pyrophosphate* (MVPP) em *iso-pentenyl diphosphate* (IPP) e *dimethylallyl diphosphate* (DMAPP). Ambos são utilizados como unidades básicas na biossíntese de isoprenóides, incluindo esteróis e carotenóides (PEREIRA & IVAMOTO, 2015).

Na via MEP, a enzima-chave é *1-deoxy-5-xylulose phosphate reductoisomerase* (DXR). A inibição de *DXR* pode ser limitante para a produção de isoprenóides por esta via (GALATA & MAHMOUD, 2012). Nenhum estudo de expressão de *DXR* em café foi encontrado até o momento. Nesta via, *isopentenyl diphosphate synthase* (IDS) desempenha função similar a enzima a *Ca_HMGR* na via MVA, produzindo IPP e DMAPP, no entanto, seu precursor é uma molécula de *hydroxyl-methyl butenyl diphosphate* (HMBPP). Portanto, os genes que codificam as enzimas *Ca_DXR* e *Ca_IDS* também são focos de estudo neste trabalho.

2.6. CITOCROMO P450 (Cyt P450)

As enzimas Cyt P450 catalisam reações de monoxigenase utilizando NADPH e/ou NADH para reduzir a molécula de dióxido de carbono atmosférico em um produto orgânico funcional e uma molécula de água (SCHULER, 1996). Segundo Nelson e Werck-Reichhart (2011), 1.461 sequências de *Cyts P450* foram anotadas em vertebrados, 2.137 em insetos, 2.960 em fungos, 1.042 em bactérias, 27 em *Archaea* e 2 em vírus (Mimivirus).

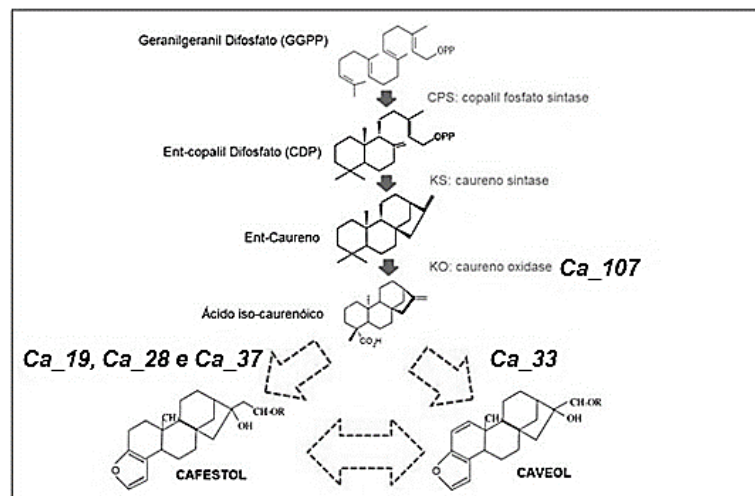
O número de *Cyt P450* anotadas e nomeadas em plantas é ainda maior: 5.100 (NELSON & WERCK-REICHHART, 2011).

Os genes que codificam para *Cyt P450* são membros de uma das mais versáteis e funcionais superfamílias de enzimas encontradas na natureza (JACKSON et al., 2002; NELSON, 2006). Desta maneira, *Cyts P450* são extremamente abundantes, chegando a compor cerca de 1% dos genes totais em alguns genomas de plantas, como o de *Arabidopsis sp* (NELSON, 2006).

As *Cyts P450* estão envolvidos em diversas funções, tais como: desenvolvimento de barreiras de água, formação sistema vascular, lignificação para suporte estrutural da planta, produção de mecanismos de sinalização de defesas, atração de polinizadores, produção de toxinas para defesa contra herbívoros e patógenos (LEE et al., 2010; GUTENSOHN et al., 2014). Por esta razão, há interesse em conseguir entender os níveis de expressão de genes relacionados a metabólitos secundários de algumas plantas, visto que além das propriedades anteriormente citadas, as *Cyt P450* também são responsáveis por outras características desejáveis, tais como sabor, proteção contra insetos e biofumigação (HALKIER & GERSHENZON, 2006). Do mesmo modo, genes *Cyt P450* também estão relacionados à produção de cafestol e caveol.

Em cafeeiros, Ivamoto et al. (2015) encontraram no banco de dados *CafEST*, 342 *Cyts P450* em café, dentre estes 87 sequências são *Cyts P450* monooxigenases, que foram classificadas em 28 diferentes famílias. Além disso, Ivamoto (2012) caracterizou molecularmente sete genes *Cyt P450*, sendo que cinco destes, *Ca_19*, *Ca_28*, *Ca_33*, *Ca_37* e *Ca_107*, demonstraram padrão de expressão relacionado ao acúmulo de diterpenos em café, portanto este autor estabeleceu uma hipótese onde tais genes se enquadrariam na via de biossíntese de diterpenos, conforme pode ser observado na Figura 3.

Figura 3. Hipótese da via de biossíntese de cafestol e caveol com a inclusão dos genes candidatos de Cyts P450 identificados e propostos por Ivamoto (2012). Linhas pontilhadas indicam possíveis reações enzimáticas.



Fonte: Ivamoto (2012)

3. OBJETIVOS

Avaliar a expressão de genes que codificam enzimas das vias de biossíntese MVA (enzimas HMGR e MPDC) e MEP (enzimas DXR e IDS) e de *Cyts 450* em função da idade dos frutos, sistema de cultivo e teor de diterpenos no endosperma de frutos de cafeeiros.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil transcricional dos genes *Ca_HMGR*, *Ca_DXR*, *Ca_IDS* e *Ca_MPDC* entre frutos de 90 e 210 dias após o florescimento (DAF) de plantas cultivadas em SAF e a PS.
- Analisar o perfil transcricional de quatro genes *Cyts P450* em frutos de 90 e 210DAF de plantas cultivadas sob SAF e a PS.
- Analisar o perfil transcricional dos genes *Ca_HMGR*, *Ca_DXR*, *Ca_IDS* e *Ca_MPDC* em frutos de plantas que apresentam alto e baixo teor de cafestol e caveol.
- Analisar o perfil transcricional de quatro genes *Cyts P450* em frutos de plantas que apresentam alto e baixo teor de cafestol e caveol.

4. CAPÍTULO 1: INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE CULTIVO NA EXPRESSÃO DE GENES LIGADOS À BIOSÍNTESE DE DITERPENOS DE CAFÉ

4.1. INTRODUÇÃO

O *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC, 2014) prevê que o aumento na temperatura nos próximos anos causará impactos no ecossistema terrestre e marinho, na saúde, economia e produção de alimentos no Brasil.

O emprego do sistema agroflorestal (SAF) entre cafeeiros e outras culturas perenes pode melhorar sustentabilidade do ambiente, aumentar a estabilidade da produção, oferecer condições microclimáticas mais apropriadas à produção, permitir ao produtor a obtenção de outros produtos e diminuir a incidência de alguns patógenos e insetos-praga como cercóspera (*Cercospora coffeicola*) e bicho-mineiro (*Perileucoptera coffella*) (FERRÃO et al., 2007). Neste sentido, a implementação de SAF entre café e outras culturas proporcionaria um microclima mais propício para produção do grão e maior captação de carbono atmosférico (JOSE, 2009).

Ademais, evidências sugerem que a diversidade no SAF promove aumento da captura e processo de ciclagem de nutrientes (JOSE, 2009), podendo mitigar os problemas de aquecimento global, visto que promove estocagem de carbono atmosférico em forma de biomassa (COLTRI et al., 2015).

Todavia, o cafeeiro apresenta melhor crescimento e produção sem sombra, devido especialmente à ausência de competição por água com outras espécies e à diminuição na incidência de doenças como ferrugem (*Himeleia vastatrix*) e pragas como broca do café (*Hypothenemus hampei*) (FERNÃO et al., 2007).

Estudos apontam que a menor incidência de raios solares reduz o nível de transcrição de fatores que regulam a expressão de genes (BEDNAREK et al, 2009). Ao mesmo passo, plantas como café, que originalmente eram encontradas em SAF, mas apresentam bom desenvolvimento sob altas incidências de luz, passam por reprogramação metabólica com o intuito de adaptar-se ao novo ambiente, o que leva à

alteração significativa dos níveis transcricionais de diversos genes da planta (MARTINS et al., 2014).

Apesar de sua importância, não há relatos na literatura da regulação genes que codificam para Cyts P450 em cafeeiros cultivados sob SAF (sombreamento) ou a pleno sol (PS). Portanto, o presente trabalho avaliou os perfis transcricionais de 4 *Cyts P450*, além de genes que codificam para enzimas das vias de biossíntese de isoprenóides em frutos de cafeeiros cultivados SAF e a PS.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

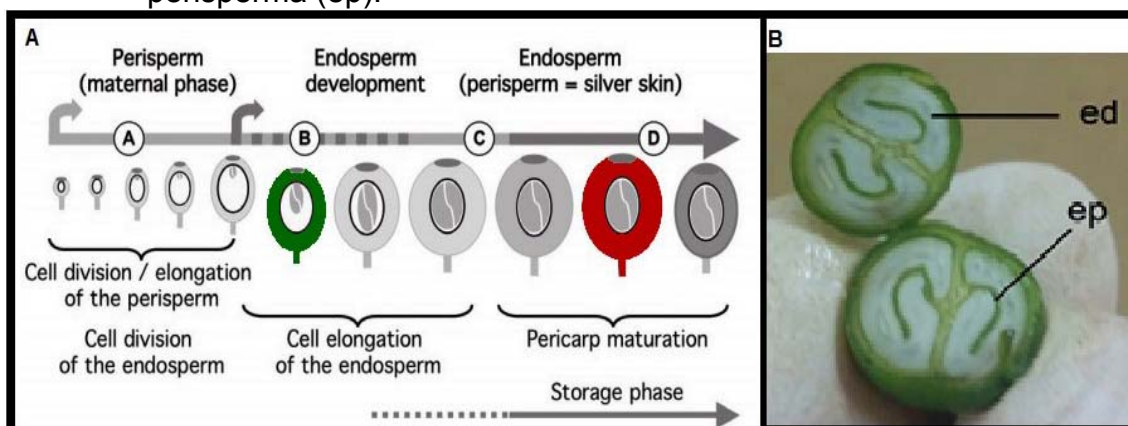
4.2.1. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados frutos de *C. arabica* (cultivar IAPAR 59) desenvolvidos em SAF de cafeeiros conveniados com seringueiras (Figura 4) e a PS, em dois períodos de maturação: 90 dias após o florescimento (DAF) e 210 DAF (Figura 5A). As coletas foram realizadas em triplicatas biológicas (frutos de plantas individuais por cada repetição) e de cada amostra foi feita triplicata técnica. Os frutos foram imediatamente congelados com nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80°C.

Figura 4. Área de coleta em sistema agroflorestal de *Coffea arabica* em convênio com seringueiras.



Figura 5. A) Desenvolvimento de frutos de café, frutos verdes com 90 DAF; frutos vermelhos com 210 DAF (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006); B) Tecidos de cafeeiro utilizados: endosperma (ed) e perisperma (ep).



Fonte: (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006)

Dos frutos congelados, foram separados o endosperma e perisperma (Figura 5B), e o primeiro foi macerado em nitrogênio líquido para extração de RNA.

4.2.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

O RNA total de endosperma foi extraído a partir de 2000 mg conforme descrito por Chang et al. (1993), seguido por tratamento com DNase I. Foi verificada a integridade das amostras, avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE (2 M Tris – acetato, 0,05 M EDTA), contendo brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e visualizada sob luz UV em transluminador. A concentração do RNA e a pureza foram determinadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, com espectrometria a 260 e 280 nm e as razões 260/280 e 260/230, sendo considerados de alta qualidade quando entre 1,8 e 2.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit *Super Script III Transcriptase Reversa* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, com volume final de 20 μL , a partir de 5 μg de RNA total. Para cada 1 μg do RNA total extraído, foram adicionados 50 μM de Oligo (dT) 12-18 e 1 mM de dNTPmix. A remoção do RNA original foi feita por meio de incubação a 37°C por 20 minutos com 2 unidades de RNase H (Invitrogen).

4.2.3. ANÁLISE TRANSCRICIONAL POR RT-qPCR

Quatro *contigs* para *Cyt P450* foram escolhidos por estarem potencialmente envolvidos nas etapas finais da via metabólica de cafestol e caveol (IVAMOTO, 2012). Os genes aqui descritos como *Ca_28*, *Ca_33*, *Ca_37* e *Ca_107* participam da biossíntese de metabólitos secundários das plantas e possuem similaridade com monooxigenases (IVAMOTO, 2012). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados (Tabela 2) foram descritos por Ivamoto (2012). Para cada amostra biológica foram efetuadas três repetições analíticas e o normalizador utilizado foi o gene *GAPDH*, que foi selecionado a partir de trabalhos prévios de expressão gênica em cafeeiros (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009; CRUZ et al., 2009).

Tabela 2. Sequência de *primers* para qPCR de *Cyt P450* ligados à biossíntese de cafestol e caveol.

<i>Primer</i>	Sequência <i>forward</i> (5'-3')	Sequência <i>reverse</i> (5'-3')	Eficiência
<i>Ca_37</i>	GTCAGTCCTGGACGCTGTTA	AGGTGGTGGAGGGCATGTAG	91,9 %
<i>Ca_28</i>	TCTTCGCCTTACGCATTGGT	CGTGAGGAAAGGGCTTTGTC	97,4 %
<i>Ca_33</i>	CGCCAGTCCCACTACTCGTT	GCCCAAGCGTTCACCATTAC	99,45 %
<i>Ca_107</i>	TCGGGCTTACCAACCAAAAA	GATGTGGTCGAGGCTTTCCA	110 %
<i>GAPDH</i>	CAAGGACAAGGCTGCTGCTCA	TGGGTGCATCCTTGCTAGGAG	100 %

Fonte: (IVAMOTO, 2012)

Ainda neste estudo, foi avaliada a expressão dos genes das vias MVA e MEP de biossíntese de isoprenóides: *Ca_HMGR*, *Ca_DXR*, *Ca_IDS* e *Ca_MPDC*. Os *primers* foram desenhados no programa *Primer Express* (Tabela 3), o tamanho do amplicon foi de 100 pb e temperatura de melting de 60°C, foi verificado a não formação de dímeros e de *hairpins*. Para cada amostra biológica foram realizadas três repetições analíticas e o normalizador foi o gene *GAPDH*, selecionado com base em trabalhos prévios de expressão gênica em cafeeiros (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009; CRUZ et al., 2009).

Tabela 3. Sequência de *primers* para qPCR de genes que codificam para enzimas das vias MEP e MVA para avaliação da expressão gênica.

<i>Primer</i>	Sequência <i>forward</i> (5'-3')	Sequência <i>reverse</i> (5'-3')	Eficiência
<i>CaHMGR_3</i>	CCACTACGGAGGGCTGTTTG	CATCCCATCTCTCAACAGGATACC	100 %
<i>CaIDS_1</i>	ATTGGACAATGGCGGTGCTA	AACTTTACCCCCAGCATTACACA	100 %
<i>CaMPDC_3</i>	CCCAGACGCCACCAATATA	CAAGGGTGACGCTGATGCT	100 %
<i>CaDXR_3</i>	CCACGCCTTGATCTTTGCA	CCCAGCAGCATATGCGAGTT	97%
<i>GAPDH</i>	CAAGGACAAGGCTGCTGCTCA	TGGGTGCATCCTTGCTAGGAG	100 %

Para análise de expressão única, foi feita PCR comum das amostras, todas elas apresentaram apenas um amplicon, como esperado no desenho dos *primers*.

A expressão dos genes selecionados foi detectada por meio de PCR em Tempo Real (qPCR) no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). As reações de quantificações relativas foram feitas em triplicatas técnicas com o *kit SYBR Green qPCR Master Mixes* (*Thermo Scientific*), conforme recomendação do fabricante. Para cada reação foram utilizados 5 μ L de *SYBR Green*, 0,5 μ L de *primers forward* e *reverse*, 1 μ L de cDNA e 3 μ L de água MilliQ autoclavada, totalizando volume de reação de 10 μ L. Para a reação, foi utilizado o programa, com denaturação de 95°C por 10 segundos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A linha de base foi coletada entre os ciclos 3 e 15 e todas as amplificações foram analisadas utilizando um valor fixo de *threshold* para a obtenção dos *quantification cycle* (Cq). O cálculo de expressão relativa (RQ) foi feito de acordo com a metodologia desenvolvida por LIVAK & SCHMITTGEN (2001), utilizando a fórmula: $RQ = 2^{-\Delta Cq}$, onde $\Delta Cq = Cq$ do gene alvo – Cq do controle endógeno.

4.2.4. ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os dados de RQ foram transformados para Log_2 , para que entrassem em distribuição normal. A análise estatística foi utilizado o programa Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2009), a diferença entre tratamentos foi averiguada pela análise de variância – ANOVA e quando significativa, aplicou-se o teste t de Student para avaliação do contraste de médias ($P < 0,05$).

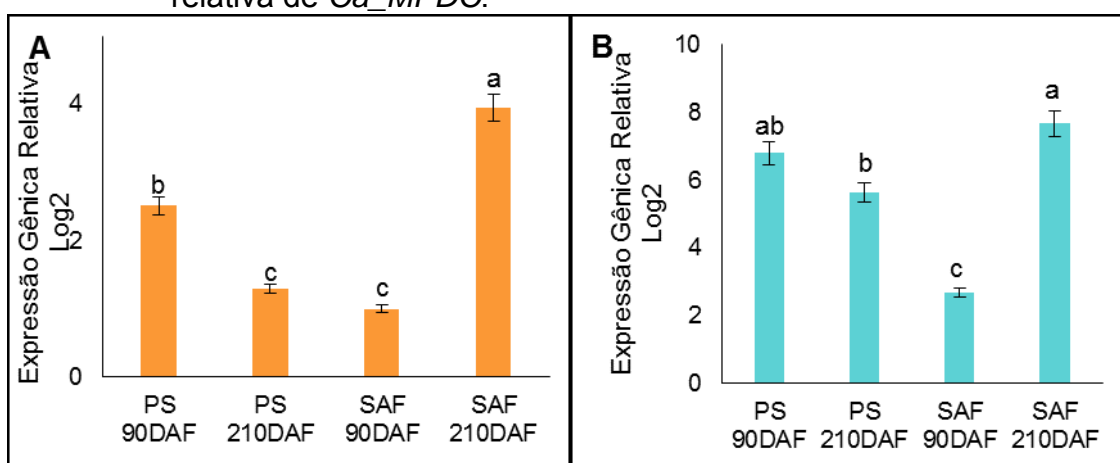
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. EXPRESSÃO DE GENES QUE CODICAM PARA ENZIMAS DAS VIAS MEP E MVA

Para os genes da via MVA, houve maior expressão de *Ca_HMGR* em frutos cultivados sob SAF 210 DAF (Figura 6A), seguido de PS 90 DAF e por fim PS 210 DAF e SAF 90 DAF, que não diferiram

estatisticamente. Para *Ca_MPDC* um padrão similar foi observado, com a maior expressão em frutos desenvolvidos sob SAF 210 DAF e PS 90 DAF, seguida por PS 210 DAF e SAF 90 DAF.

Figura 6. Padrão de expressão de genes da via MVA (*Ca_HMGR* e *Ca_MPDC*) de biossíntese de isoprenóides de *Coffea arabica* em frutos com 90 DAF e 210 DAF de plantas cultivadas a PS e em SAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- desvio padrão de 3 repetições A) Expressão gênica relativa de *Ca_HMGR*; B) Expressão gênica relativa de *Ca_MPDC*.



HMGR é uma enzima-chave na formação dos isoprenóides. Sua expressão é controlada tanto por fatores bióticos e abióticos, dentre eles intensidade luminosa (STERMER et al., 1994). Alguns trabalhos demonstram que vários fotorreceptores participam repressão de *HMGR* em plântulas de *Arabidopsis sp.* (RODRIGUEZ-CONCEPCION, 2004), ou seja, quanto menor a incidência de luz mais expresso esses genes serão.

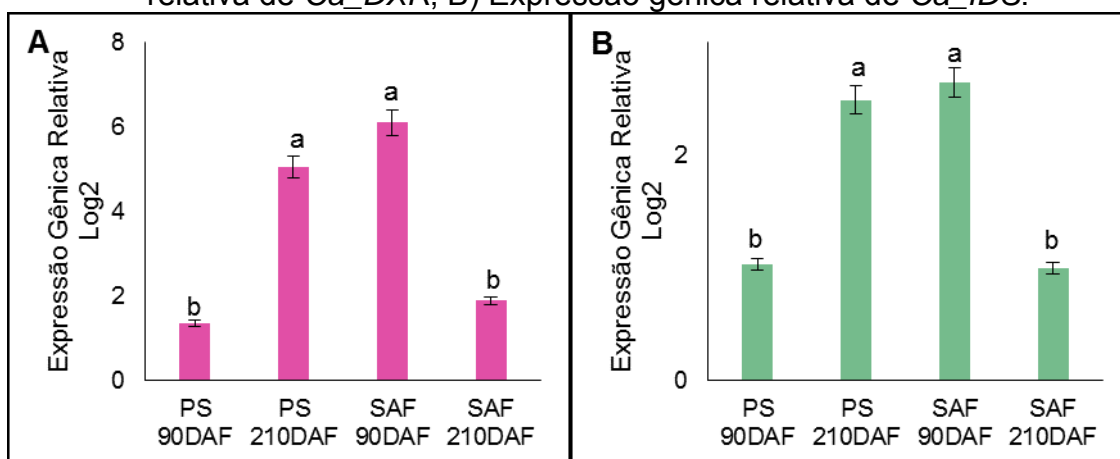
As enzimas MPDC e HMGR têm sido amplamente estudadas na medicina, com potencial de inibir a síntese de colesterol (VINOKUR et al., 2015; KIM et al., 2014). Alguns trabalhos acreditam ainda no potencial de MPDC como inibidor seletivo de bactérias, servindo como uma opção para problemas de resistência a antibióticos (BARTA et al., 2012).

Apesar da sua grande importância e da existência em todos os reinos (HUANG et al., 2013), pouco se sabe sobre a regulação de *MPDC* em plantas. Nenhum trabalho foi relatado na literatura sendo este, portanto, o

primeiro que evidencia a regulação de *Ca_MPDC* em função do sistema de cultivo em cafeeiros (sombreado ou a PS).

Os genes da via MEP, *Ca_DXR* e *CA_IDS* (Figura 7A e B) também apresentaram entre si o mesmo padrão de expressão, sendo mais expressos em PS em frutos com 210 DAF e SAF 90DAF, seguido dos demais tratamentos que não se distinguiram significativamente.

Figura 7. Padrão de expressão de genes da via MEP (*Ca_DXR* e *Ca_IDS*) de biossíntese de isoprenóides de *Coffea arabica* em frutos com 90 DAF e 210 DAF de plantas cultivadas a PS e em SAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições A) Expressão gênica relativa de *Ca_DXR*; B) Expressão gênica relativa de *Ca_IDS*.



Yao et al. (2008) relataram que a expressão de *DXR* ocorre em raiz, caule e folhas de *Cyanae acuminata*, sugerindo que sua expressão é constitutiva, mas em diferentes níveis, em função do tecido, estes mesmos autores monitoraram as mudanças na expressão sob tratamento de Metil Jasmonato (MeJa) e relataram que *DXR* é altamente induzido pelo fitohormônio, voltando à níveis mais baixos de expressão após algum tempo. Em *Salvia miltiorrhiza*, *DXR* foi diferencialmente expresso em vários tecidos e foi encontrado em maiores níveis em folhas, seguidos por raiz e caule (YAN et al., 2009), mas uma vez sugerindo expressão constitutiva.

Não foi evidenciado padrão entre expressão de *DXR* e idade dos frutos, o que sugere que esse gene não participa do processo de amadurecimento dos frutos. Rodríguez-Concepción et al. (2001), relatam que o aumento na biossíntese de carotenóides durante o amadurecimento da fruta

não tem relação com a expressão de *DXR*, o que corrobora com os dados aqui observados.

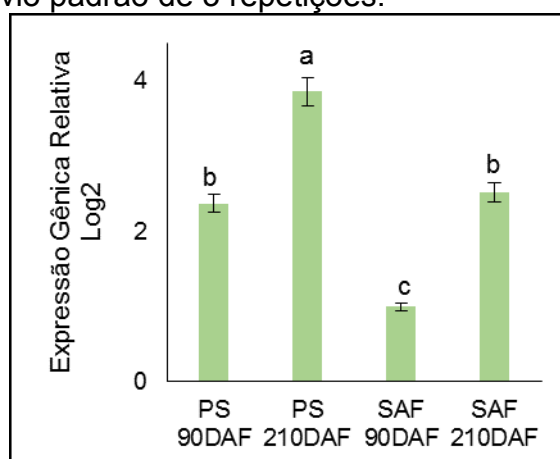
Com relação a *Ca_IDS*, nenhum trabalho de expressão gênica foi encontrado. Possivelmente este é o primeiro relato de regulação de expressão deste gene em café. É interessante notar que a expressão tanto de *Ca_DXR* como *Ca_IDS* apresentaram o mesmo padrão, sugerindo que as expressões desses genes são influenciadas pelas mesmas variáveis.

A expressão desses genes ainda pode ser influenciada pelas condições edafoclimáticas no sistema de cultivo, que não foram aferidas nesse trabalho.

4.3.2. EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES *Cyt P450*

O gene *Ca_28* (Figura 8) apresentou maior expressão em frutos com 210DAF de plantas cultivadas a PS, seguida por PS 90DAF e SAF 210DAF e por último, frutos coletados em SAF 90DAF. Os frutos de plantas cultivadas a PS tiveram expressões maiores do que as observadas em frutos de plantas sob SAF, quando comparadas com a respectiva idade entre os sistemas de cultivo.

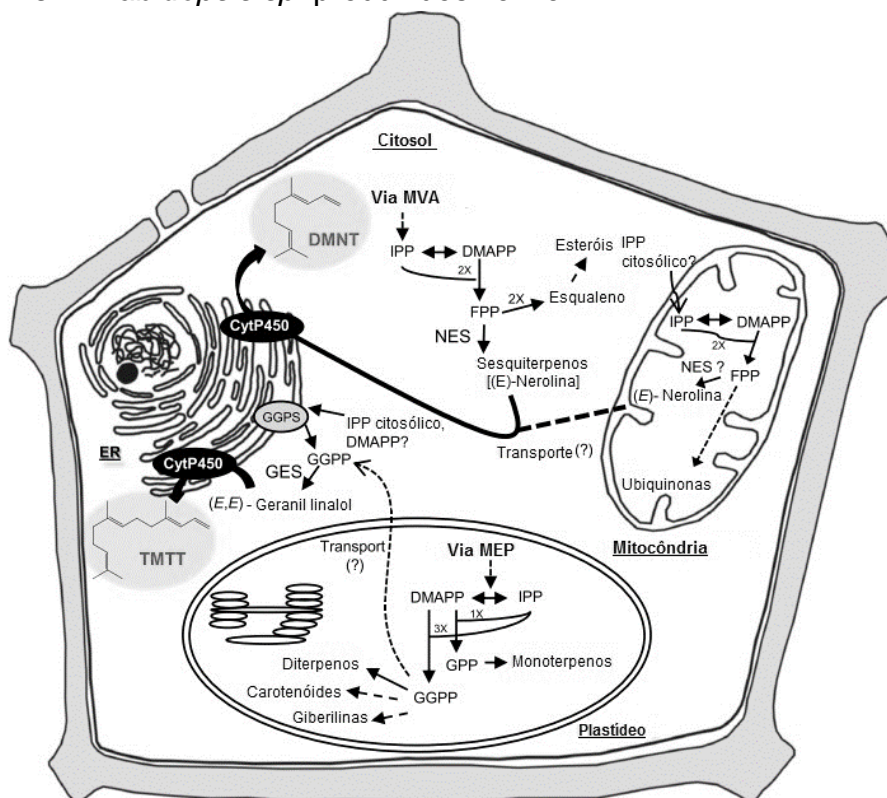
Figura 8. Padrão de expressão de *Ca_28* de *Coffea arabica* em frutos de plantas cultivadas a PS e SAF em 90 DAF e 210 DAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem média +/- o desvio padrão de 3 repetições.



O gene *Ca_28* é similar aos *Cyts P450* pertencentes à família CytP82 de plantas e participam da biossíntese de homoterpenos (IVAMOTO,

2012), como *4,8-dimethylnona-1,3,7-triene* (DMNT) e *4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene* (TMTT) (BOLAND & GABLER, 1989). Além da função de atração de polinizadores, DMNT e TMTT também atraem predadores de insetos herbívoros em folhas danificadas (THOLL et al., 2011). Tholl et al. (2011) propuseram que esses compostos são produzidos na via MVA de biossíntese de diterpenos em *Arabidopsis sp.* (Figura 9). Embora, pouco se saiba sobre estes homoterpenos em cafeeiros, possivelmente *Ca_28* atua na mesma via proposta para *Arabidopsis sp.*, participando na síntese de isoprenóides em cafeeiros no citosol.

Figura 9. Esquema subcelular da biossíntese de homoterpenos DMNT e TMTT em *Arabidopsis sp.* produzidos na via MVA.



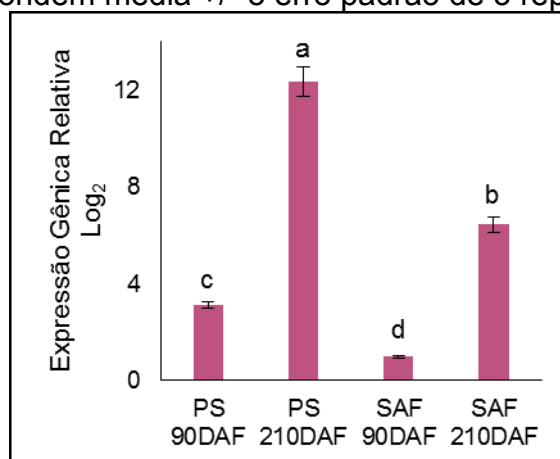
Fonte: (THOLL et al., 2011)

Brillada et al. (2013) evidenciaram que em *Lotus japonicus* transgênicas TMTT e DMNT são reguladas por *alamethicin* (antibiótico produzido por fungos) e também por ácaros. Outro trabalho realizado com *Arabidopsis sp.* também evidencia a indução de expressão de TMTT por *alamethicin* e por larvas de *Plutella xylostella* (HERDE et al., 2008). Embora neste trabalho seja evidente a maior expressão de *Ca_28* em frutos de plantas cultivadas a PS, indicando a influência da luz na regulação deste gene, essa

diferença também pode ser devida a maior incidência de pragas nesse sistema de cultivo do que em SAF, ou a influência de ambos.

O gene *Ca_33* (Figura 10) foi mais expresso aos 210 DAF em frutos de plantas cultivadas a PS, seguido por SAF 210DAF, PS 90 DAF e SAF 90 DAF. Todas as amostras diferiram estatisticamente. Assim como para *Ca_28*, a expressão de *Ca_33* foi superior em frutos cultivados a PS quando comparados com frutos da mesma idade de plantas cultivadas em SAF.

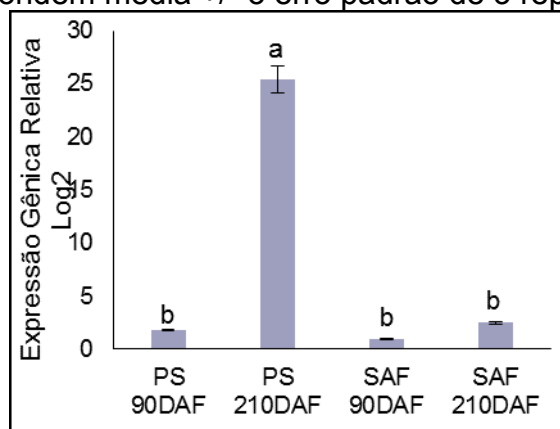
Figura 10. Padrão de expressão de *Ca_33* de *Coffea arabica* em frutos de plantas cultivadas a PS e SAF em 90 DAF e 210 DAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem média +/- o erro padrão de 3 repetições.



Ca_33 tem função na biossíntese de monoterpenos e foi correlacionado com a produção de cafestol e caveol (IVAMOTO, 2012). Mochizuki et al. (2011) observaram que a expressão de monoterpenos em *Chamaecyparis obtusa* é dependente de temperatura, isso explicaria a maior expressão em 210DAF a PS.

O gene *Ca_37*, ao contrário dos demais genes em estudo, participa do metabolismo primário das plantas e faz parte da subfamília CytP74 (IVAMOTO, 2012) que participa da defesa da planta contra herbívoros, patógenos e estresse abiótico (KOEDUKA et al., 2015). *Ca_37* foi induzido apenas em frutos de 210 DAF cultivados a PS (Figura 11), não havendo diferença significativa entre os demais tratamentos. Possivelmente a expressão desse gene foi afetada por ataque de algum patógeno presente nesse sistema de cultivo.

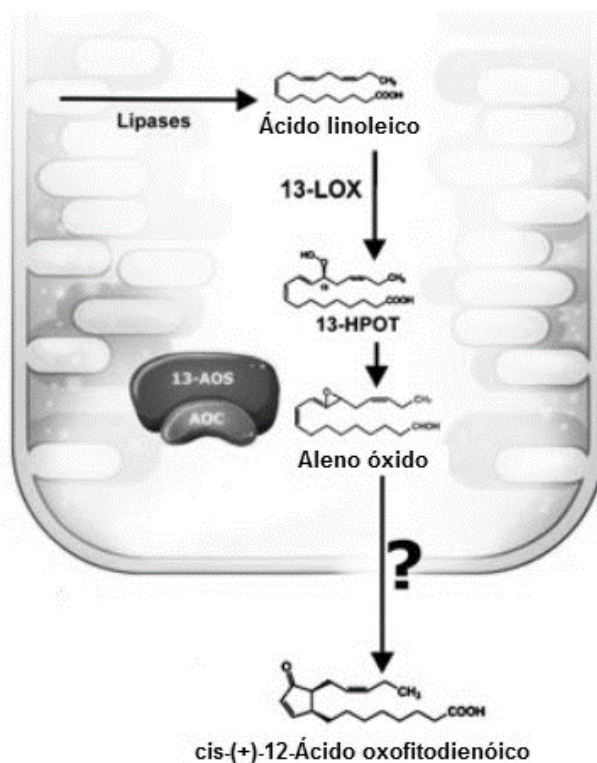
Figura 11. Padrão de expressão de *Ca_37* de *Coffea arabica* em frutos de plantas cultivadas a PS e SAF em 90 DAF e 210 DAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem média +/- o erro padrão de 3 repetições.



Ca_37 tem a função enzimática de aleno óxido sintase (AOS) e hidroperoxiliase (HPL) (IVAMOTO, 2012), que participam da biossíntese de jasmonato e compostos voláteis de 6 carbonos respectivamente (KOEDUKA et al., 2015), além de participarem em inúmeras vias metabólicas (HOWE et al., 2000).

Estudos demonstram em tomate, que tanto AOS e HPL são mais expressos quando a planta é danificada por larvas de insetos (HOWE et al., 2000). Em *Arabidopsis sp.*, AOS é uma das enzimas-chave da biossíntese de jasmotato (JA) e é encontrada dentro dos plastídeos (Figura 12) (HAGA & IINO, 2004; SVYATYNA & RIEMANN, 2012). Outros estudos relatam que a luz tem função central para regular a biossíntese e sinalização da via de JA, e possui implicações para as vias de resposta a estresses (CARVALHO et al., 2011), o que explica o porquê deste gene ter sido mais expresso em PS para frutos com 210 DAF, porém não dá suporte à expressão observada aos 90 DAF no mesmo sistema de cultivo.

Figura 12. Reação enzimática de aleno óxido sintase em plastídeos de *Arabidopsis sp.*: conversão de 13-HPOT em aleno óxido.

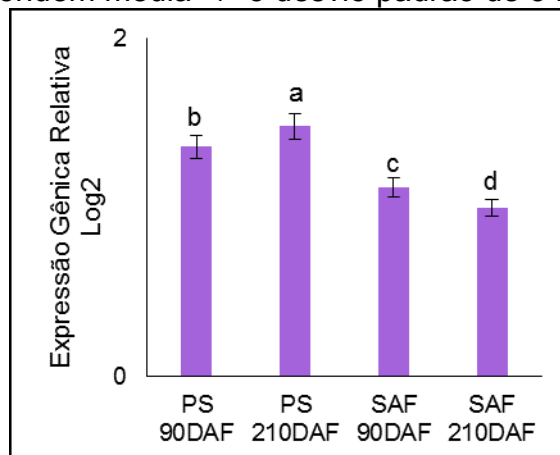


Fonte: (SVYATYNA & RIEMANN, 2012)

Nenhum estudo em café, com CytP74 AOS ou HPL, levando em consideração a luz, foi relatado no momento, além disso, apenas Ivamoto (2012) relatou a presença de um gene putativo em *Coffea sp.* Acredita-se que esse gene aja da mesma forma que em *Arabidopsis sp.*: nos plastídeos, participando na via MEP de biossíntese de isoprenóides.

O gene *Ca_107* (Figura 13) foi mais expresso em frutos com 210 DAF a PS, seguido de PS 90DAF, SAF 90 DAF e SAF 210 DAF. Todas as amostras diferiram estatisticamente. A expressão de *Ca_107* em frutos desenvolvidos a PS, independente da idade dos mesmos, é maior do que a observada em frutos de plantas cultivadas sob SAF.

Figura 13. Padrão de expressão de *Ca_107* de *Coffea arabica* em frutos de plantas cultivadas a PS e SAF em 90 DAF e 210 DAF. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem média +/- o desvio padrão de 3 repetições.



Esse gene pertence à família CYP701 (IVAMOTO, 2012), cujos membros são descritos como ent-caureno oxidase (MORRONE et al., 2011). Estes realizam três reações de catálise nas etapas iniciais de biossíntese de giberelinas e brassinoesteróis, e seu último produto é considerado o precursor dos diterpenos cafestol e caveol. Não foram encontrados trabalhos até o presente momento que relatem e comparem o perfil de expressão desse gene em diferentes tecidos ou em plantas cultivadas a PS e em SAF, em café.

Tanto o metabolismo primário, quanto o secundário passam por reprogramação em condições de alta incidência de luz. Isso pode ser esperado dada a natureza séssil do crescimento das plantas, juntamente com a sobrevivência em um ambiente em constante mudança, o que exige que o metabolismo da planta opere de forma extremamente dinâmica (MARTINS et al., 2014).

Martins et al. (2014) sugerem também que para espécies, tais como café, que evoluíram em habitats de sombra, mas podem se desenvolver com sucesso sob condições de plena luz, o gasto energético por meio da reprogramação metabólica pode ser crucial para o aumento do crescimento, da capacidade fotossintética e da aptidão quando a energia da luz é abundante. Geromel et al. (2008), por sua vez, sugerem que a luz modifica a expressão de genes em grãos de café e que transcritos de *CaSUS1* acumulam-se durante o desenvolvimento precoce do endosperma.

Este, portanto, é o primeiro trabalho que busca evidenciar a expressão de genes em endosperma de frutos de café cultivados sob SAF e PS; contudo, muito ainda deve ser feito para comprovar as teorias aqui propostas. Correlacionar dados genéticos a bioquímicos, por exemplo, é uma opção que pode ajudar a elucidar diversos pontos levantados pelo estudo apresentado.

4.4. CONCLUSÃO

Os genes que codificam enzimas da via MVA (*Ca_HMGR* e *Ca_MPDC*) demonstraram similaridade de expressão, havendo maior expressão em frutos com 210 DAF cultivados sob SAF. Da mesma maneira os genes que codificam para enzimas da via MEP (*Ca_DXR* e *Ca_IDS*) também apresentam padrões de expressão similares, apresentando maiores expressões em frutos com 210 DAF e 90 DAF em PS e SAF, respectivamente.

Esses genes têm suas expressões relacionadas com o microclima do sistema de cultivo, porém não se pode aferir que apenas essas variáveis atuaram no experimento, sendo essas plantas afetadas por um contraste de variáveis que ocorrem em cada sistema de cultivo, não avaliadas nesse trabalho.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTA, M. L. et al. Structural basis for nucleotide binding and reaction catalysis in mevalonate diphosphate decarboxylase. **Biochemistry**, v. 51, n. 28, p. 5611–5621, 2012.

BEDNAREK, P. et al. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. **Science (New York, N.Y.)**, v. 323, n. 5910, p. 101–106, 2009.

BEER, J. et al. Shade management in coffee and cacao plantations. **Agroforestry Systems**, v. 38, p. 139–164, 1998.

BOLAND, W.; GABLER, A. Biosynthesis of Homoterpenes in Higher Plants by. **HELVETICA CRIMICA ACTA**, v. 72, p. 1–7, 1989.

BRILLADA, C. et al. Metabolic engineering of the C16 homoterpene TMTT in *Lotus japonicus* through overexpression of (E,E)-geranylinalool synthase attracts generalist and specialist predators in different manners. **New Phytologist**, v. 200, n. 4, p. 1200–1211, 2013.

CARVALHO, R. F.; CAMPOS, M. L.; AZEVEDO, R. A. The role of phytochrome in stress tolerance. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 12, p. 920–929, 2011.

COLTRI, P. P. et al. Empirical models to predict LAI and aboveground biomass of *Coffea arabica* under full sun and shaded plantation: a case study of South of Minas Gerais, Brazil. **Agroforestry Systems**, 2015.

DAMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: A review. **Field Crops Research**, v. 86, n. 2-3, p. 99–114, 2004.

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

HAGA, K.; IINO, M. Phytochrome-Mediated Transcriptional Up-regulation of ALLENE OXIDE SYNTHASE in Rice Seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 2, p. 119–128, 2004.

HERDE, M. et al. Identification and regulation of TPS04/GES, an *Arabidopsis* geranylinalool synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C16-homoterpene TMTT. **The Plant cell**, v. 20, n. April, p. 1152–1168, 2008.

HOWE, G. A et al. Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. **Plant physiology**, v. 123, n. 2, p. 711–724, 2000.

HUANG, M. et al. Role of Arg228 in the phosphorylation of galactokinase: The mechanism of GHMP kinases by quantum mechanics/molecular mechanics studies. **Biochemistry**, v. 52, n. 28, p. 4858–4868, 2013.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2014: Synthesis Report**.

IVAMOTO, S. T. **Diterpenos em Coffea arabica : aspectos bioquímicos, e caracterização in silico e transcricional de genes de Cyt P450s candidatos**

na biossíntese de cafestol e caveol. Dissertação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, 2012

JARAMILLO, J. et al. Climate Change or Urbanization? Impacts on a Traditional Coffee Production System in East Africa over the Last 80 Years. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e51815, 2013.

JOSE, S. Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: An overview. **Agroforestry Systems**, v. 76, n. 1, p. 1–10, 2009.

KIM, Y.-J. et al. Functional Analysis of HMGR Encoding Genes in Triterpene Saponin-Producing *Panax ginseng* Meyer. **Plant physiology**, v. 165, n. 1, p. 373–387, 2014.

KOEDUKA, T. et al. Biochemical characterization of allene oxide synthases from the liverwort *Marchantia polymorpha* and green microalgae *Klebsormidium flaccidum* provides insight into the evolutionary divergence of the plant CYP74 family. **Planta**, v. 242, n. 5, p. 1175–1186, 2015.

MARTINS, S. C. V. et al. In High-Light-Acclimated Coffee Plants the Metabolic Machinery Is Adjusted to Avoid Oxidative Stress Rather than to Benefit from Extra Light Enhancement in Photosynthetic Yield. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94862, 2014.

MOCHIZUKI, T. et al. Factors affecting monoterpene emission from *Chamaecyparis obtusa*. **Geochemical Journal**, v. 45, n. 6, p. e15–22, 2011.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during *Arabidopsis* Seedling Development. **the Plant Cell Online**, v. 16, n. 1, p. 144–156, 2004.

ROSSONI, L. et al. The putative mevalonate diphosphate decarboxylase from *Picrophilus torridus* is in reality a mevalonate-3-kinase with high potential for bioproduction of isobutene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 7, p. 2625–2634, 2015.

STERMER, B. A.; BIANCHINI, G. M.; KORTH, K. L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. **Journal of lipid research**, v. 35, n. 7, p. 1133–40, 1994.

SVYATYNA, K.; RIEMANN, M. Light-dependent regulation of the jasmonate pathway. **Protoplasma**, v. 249, n. SUPPL.2, p. 137–145, 2012.

THOLL, D. et al. The biochemistry of homoterpenes - Common constituents of floral and herbivore-induced plant volatile bouquets. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1635–1646, 2011.

VINOKUR, J. M. et al. Structural analysis of mevalonate-3-kinase provides insight into the mechanisms of isoprenoid pathway decarboxylases. **Protein Science**, v. 24, n. 2, p. 212–220, 2015.

YAN, X. et al. Molecular characterization and expression of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 5, p. 1015–1022, 2009.

5. CAPÍTULO 2: ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES DA BIOSÍNTESE DE DITERPENOS EM PLANTAS COM ALTO E BAIXO TEOR DE CAFESTOL E CAVEOL

5.1. INTRODUÇÃO

Os lipídios são importantes componentes ligados ao sabor e aroma da bebida de café (KITZBERGER et al., 2013), além de serem ricos em diterpenos, que são metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Os diterpenos de café são da família Caureno e os dois principais são cafestol ($C_{20}H_{28}O_3$) e caveol ($C_{20}H_{26}O_3$).

Vários trabalhos demonstram os efeitos benéficos dos diterpenos na saúde humana como elevação das enzimas hepáticas (BOEKSCHOTEN et al., 2004), atividade antioxidante (LEE & JEONG, 2007), anticarcinogênica (CAVIN et al., 2002), anti-inflamatória (CÁRDENAS et al., 2011) e propriedades anti-angiogênicas (CÁRDENAS et al., 2011; WANG et al., 2012), além de efeitos protetores contra aflatoxina B1 (CAVIN et al., 1998). Porém, o cafestol foi relacionado com o aumento do colesterol sérico (URGERT et al., 1997). Os diterpenos também têm atraído interesse substancial como biopesticidas e atividade de anti-herbivoria (PATERAKI et al., 2015), e também na qualidade de bebida do café (CAVIN et al., 2002).

A produção de café de alta qualidade depende de três fatores principais: o recurso genético, condições ambientais e de boas práticas agrícolas principalmente associadas a colheita e pós-colheita. As condições ambientais são de difíceis controle pelo produtor, enquanto que o recurso genético depende da escolha da variedade de café e de sua proveniência (BOSELNANN et al. 2009). O conhecimento acerca da composição dos grãos pode permitir melhor aproveitamento da diversidade genética de café existente no país e é uma ferramenta útil para ampliar o mercado de exportação, manter a qualidade e a competitividade (KITZBERGER et al, 2013).

Nesse sentido, cafeeiros da coleção da Etiópia do Instituto Agrônomo do Paraná com produção de alto e baixo nível de cafestol e/ou caveol foram previamente determinados por Pagiatto (2013). O perfil transcricional de genes que participam da biossíntese desses diterpenos, foram

pela primeira vez elucidados em endosperma de café no capítulo anterior, com o intuito de melhor compreender a atuação desses genes e posteriormente estas informações serem utilizadas em programas de melhoramento. No presente trabalho foram utilizadas essas plantas descritas por Pagiatto (2013) para avaliação do envolvimento de genes relacionados a biossíntese de diterpenos com o acúmulo de cafestol e caveol.

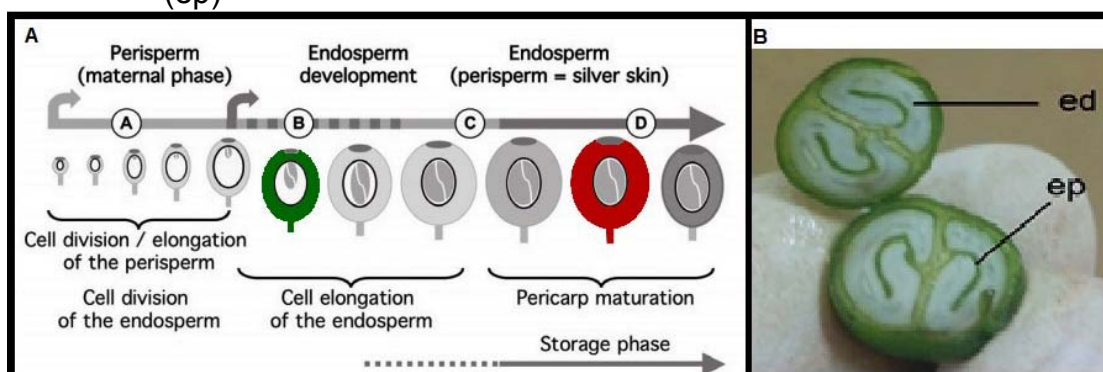
5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados frutos de 90 DAF de *C. arabica* da coleção proveniente da Etiópia pertencente ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). As coletas foram realizadas em triplicatas biológicas (frutos de uma única planta por cada repetição), dos cafeeiros denominados como: E88/34, E159/180, E261/52, E139/54, E270/44, E287/29, E268/67, E81/41, E183/138 e E57/497. Durante à coleta, os frutos foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80°C.

A partir dos frutos congelados, foram separados o endosperma e perisperma (Figura 14). O endosperma foi macerado em nitrogênio líquido para extração de RNA.

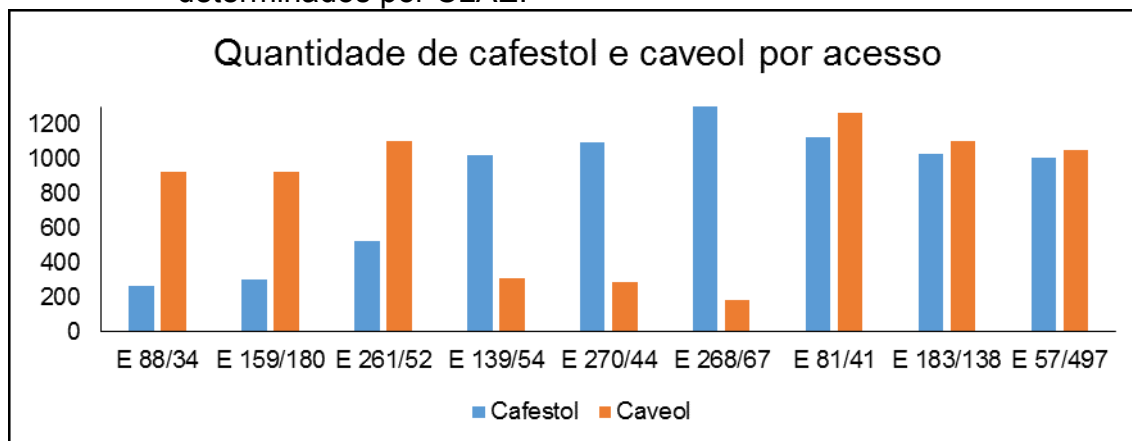
Figura 14. A) Desenvolvimento de frutos de café, fruto verde com 90 DAF; fruto vermelho com 210 DAF (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006); B) tecidos de cafeeiro utilizados: endosperma (ed) e perisperma (ep)



Fonte: (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006)

Pagiatto (2013) aferiu as concentrações de cafestol e de caveol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da coleção da Etiópia do IAPAR, incluindo os 10 genótipos aqui estudados (Figura 15)

Figura 15. Teor de cafestol e caveol dos genótipos utilizados nesse trabalho, determinados por CLAE.



Fonte: (PAGIATTO, 2013)

Os genótipos foram divididos em grupos de acordo com as relação entre o teor de caveol e cafestol (cav/caf). O Grupo 1 contém os acessos que apresentam maiores níveis de caveol, o Grupo 2 pelos que apresentam maiores níveis de cafestol (Tabela 4) e por fim, o Grupo 3 pelos genótipos que apresentam altos índices de diterpenos totais (cav + caf) (Tabela 5).

Tabela 4. Acessos da Etiópia da coleção do IAPAR e suas respectivas relações entre caveol e cafestol determinadas por CLAE (PAGIATTO, 2013). Grupo 1: maiores concentrações de caveol; Grupo 2: maiores concentrações de cafestol e Grupo 3: concentração alta de cafestol e caveol

Grupo de Estudo	Acessos da Etiópia	Diterpeno em maior quantidade	Concentração de diterpenos
1	E 88/34	Cav	3,44*
1	E 159/180	Cav	3,09*
1	E 261/52	Cav	2,11*
2	E 139/54	Caf	0,3*
2	E 270/44	Caf	0,26*
2	E 268/67	Caf	0,14*
3	E 81/41	Caf e Cav	2389,7**
3	E 183/138	Caf e Cav	2128,13**
3	E 57/497	Caf e Cav	2056,14**

*cav/caf

**caf + cav

Fonte: (PAGIATTO, 2013)

5.2.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

O RNA total de endosperma foi extraído a partir de 2000 mg conforme descrito por Chang et al. (1993), seguido por tratamento com DNase I. Foi verificada a integridade das amostras, avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE (2 M Tris – acetato, 0,05 M EDTA), contendo brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹) e visualizada sob luz UV em transluminador. A concentração do RNA e a pureza foram determinadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, com espectrometria a 260 e 280 nm e as razões 260/280 e 260/230.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit Super Script III Transcriptase Reversa (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, com volume final de 20 µL, a partir de 5 µg de RNA total. Para cada 1 µg do RNA total extraído, foram adicionados 50 µM de Oligo (dT) 12-18 e 1 mM de dNTPmix. A remoção do RNA original foi feita por meio de incubação a 37°C por 20 minutos com 2 unidades de RNase H (Invitrogen).

5.2.3. ANÁLISE TRANSCRICIONAL POR qPCR

A expressão dos genes selecionados foi detectada por meio de PCR em Tempo Real (qPCR) no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. As reações de quantificações relativas foram feitas com o kit *SYBR Green qPCR Master Mixes (Thermo Scientific)*, conforme recomendação do fabricante. Para cada reação foram utilizados 5 µL de *SYBR Green*, 0,5 µL de *primers forward* e *reverse*, 1 µL de cDNA e 3 µL de água MilliQ autoclavada, totalizando volume de reação de 10 µL. Para a reação, foi utilizado o programa, com denaturação de 95°C por 10 segundos, seguida 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A linha de base foi coletada entre os ciclos 3 e 15 e todas as amplificações foram analisadas utilizando um valor fixo de *threshold* para a obtenção dos *quantification cycle* (Cq). O cálculo de expressão relativa (RQ) foi feito de acordo com a metodologia desenvolvida por Livak & Schmittgen (2001), utilizando a fórmula: $RQ = 2^{-\Delta Cq}$, onde $\Delta Cq = Cq$ do gene alvo – Cq do controle endógeno.

A expressão dos mesmos genes descritos no Capítulo 1 será avaliada neste trabalho e os *primers* utilizados estão listados nas Tabelas 1 e 2.

5.2.4. ANÁLISE ESTÁTISTICA

Para que os dados entrassem em distribuição normal, estes foram convertidos utilizando Log_2 . Para a análise estatística foi utilizado o programa Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2009), a diferença estatística foi averiguada pela análise de variância – ANOVA e para localização das diferenças foi feito o teste *t* de Student ($P < 0,05$).

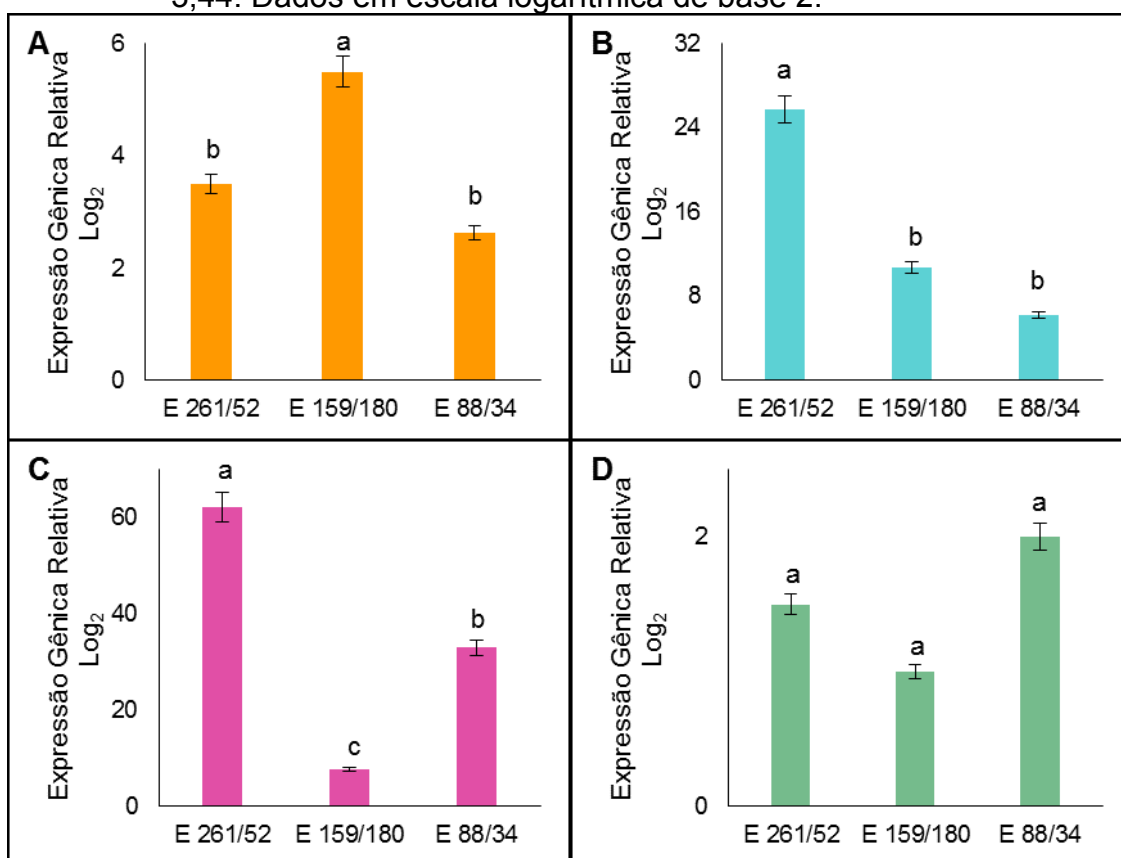
Correlações de Pearson ($P < 0,05$) foram estimadas entre os teores de caveol e cafestol obtidos por Pagiatto (2013) dos genótipos da Etiópia avaliados neste trabalho e a expressão dos genes *Cyt P450* e das vias de biossíntese de isoprenóides MVA e MEP.

5.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.6. EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES DAS VIAS MVA E MEP

No Grupo 1, o gene *Ca_HMGR* foi mais expresso no genótipo E159/180 (Figura 16A), não diferindo nos demais genótipos. O gene *Ca_MPDC* (Figura 16B) foi mais expresso genótipo E261/52 e não houve diferença nos outros acessos. *Ca_DXR* (Figura 16C) apresentou maior expressão no genótipo E261/52, seguido de E88/34 e E159/180. Para o gene *Ca_IDS*, diferenças significativas na expressão não foram detectadas entre os acessos.

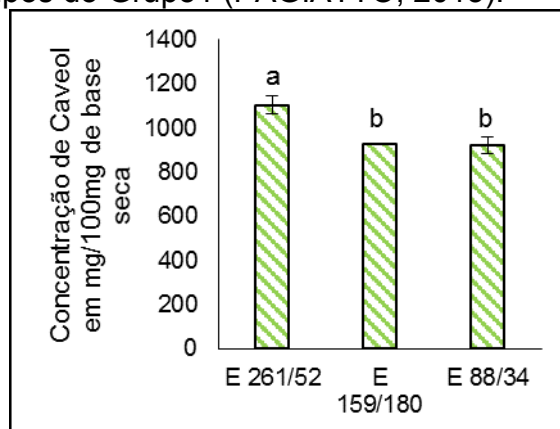
Figura 16. Padrão de expressão relativa dos genes *Ca_HMGR*, *Ca_MPDC*, *Ca_DXR* e *Ca_IDS* para o Grupo 1 [com maiores níveis de caveol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão Gênica Relativa de *Ca_HMGR*; B) Expressão Gênica Relativa de *Ca_MPDC*; C) Expressão Gênica Relativa de *Ca_DXR*; D) Expressão Gênica Relativa de *Ca_IDS*. Totalidade de diterpenos nas respectivas amostras são: Relações de cav/caf das respectivas amostras são: E261/52: 2,11; E159/180: 3,09; E88/34: 3,44. Dados em escala logarítmica de base 2.



Fonte: (PAGIATTO,2013)

Apenas o gene *Ca_MPDC* apresentou padrão de expressão seguindo a mesma tendência que as concentrações de caveol observadas para os genótipos do grupo 1 observadas por Pagiatto (2013) (Figura 17).

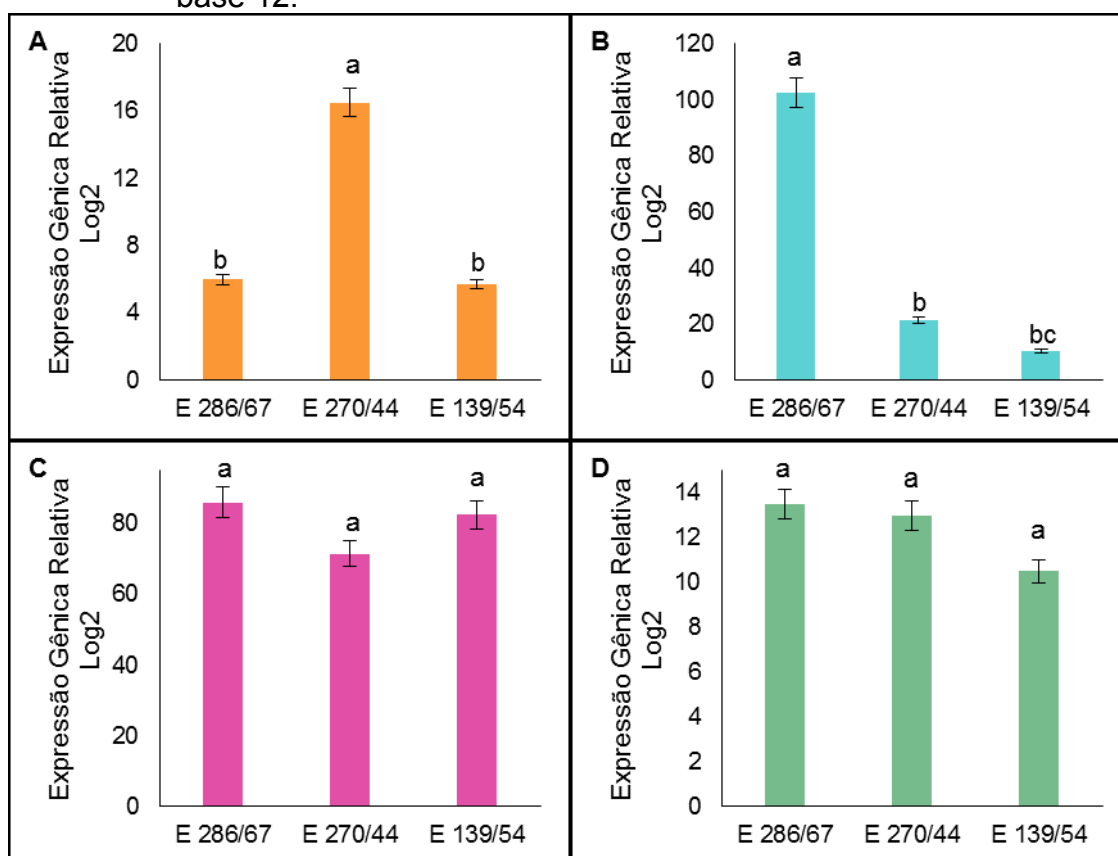
Figura 17. Concentrações de caveol determinados por CLAE para os genótipos do Grupo1 (PAGIATTO, 2013).



Fonte: (PAGIATTO,2013)

No Grupo 2, destaca-se a expressão de *Ca_HMGR* (Figura 18A) no genótipo E270/44, não havendo diferença na expressão desse gene entre os demais genótipos do grupo. Para o gene *Ca_MPDC*, o genótipo que apresentou maior expressão foi E286/67 (Figura 18B). Para os demais genes (*Ca_DXR* e *Ca_IDS*, Figuras 18C e D) observa-se a mesma tendência de expressão no qual o genótipo E287/29 apresentou menor expressão e nos demais genótipos não foi detectada diferença significativa.

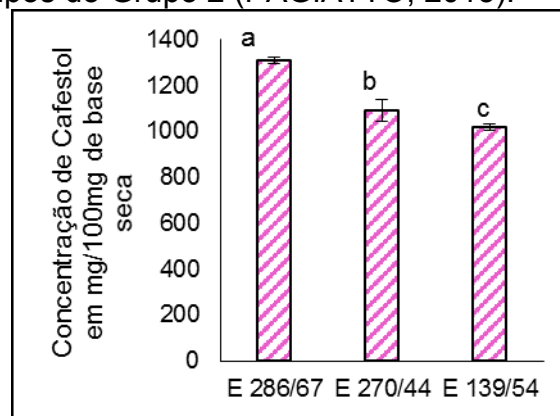
Figura 18. Padrão de expressão relativa dos genes *Ca_HMGR*, *Ca_MPDC*, *Ca_DXR* e *Ca_IDS* para o Grupo 2 [com maiores níveis de caveol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes para todos os genes. A) Expressão Gênica Relativa de *Ca_HMGR*; B) Expressão Gênica Relativa de *Ca_MPDC*; C) Expressão Gênica Relativa de *Ca_DXR*; D) Expressão Gênica Relativa de *Ca_IDS*. Relações de cav/caf das respectivas amostras são: E286/67: 0,14; E287/29: 0,25; E270/44: 0,26; E139/54: 0,3. Dados em escala logarítmica de base 12.



Fonte: (PAGIATTO,2013)

Se comparada a Figura 18 com a Figura 19, observa-se que não há tendência na expressão do gene *Ca_MPDC* nos genótipos com as concentrações de cafestol relatada por Pagiatto (2013).

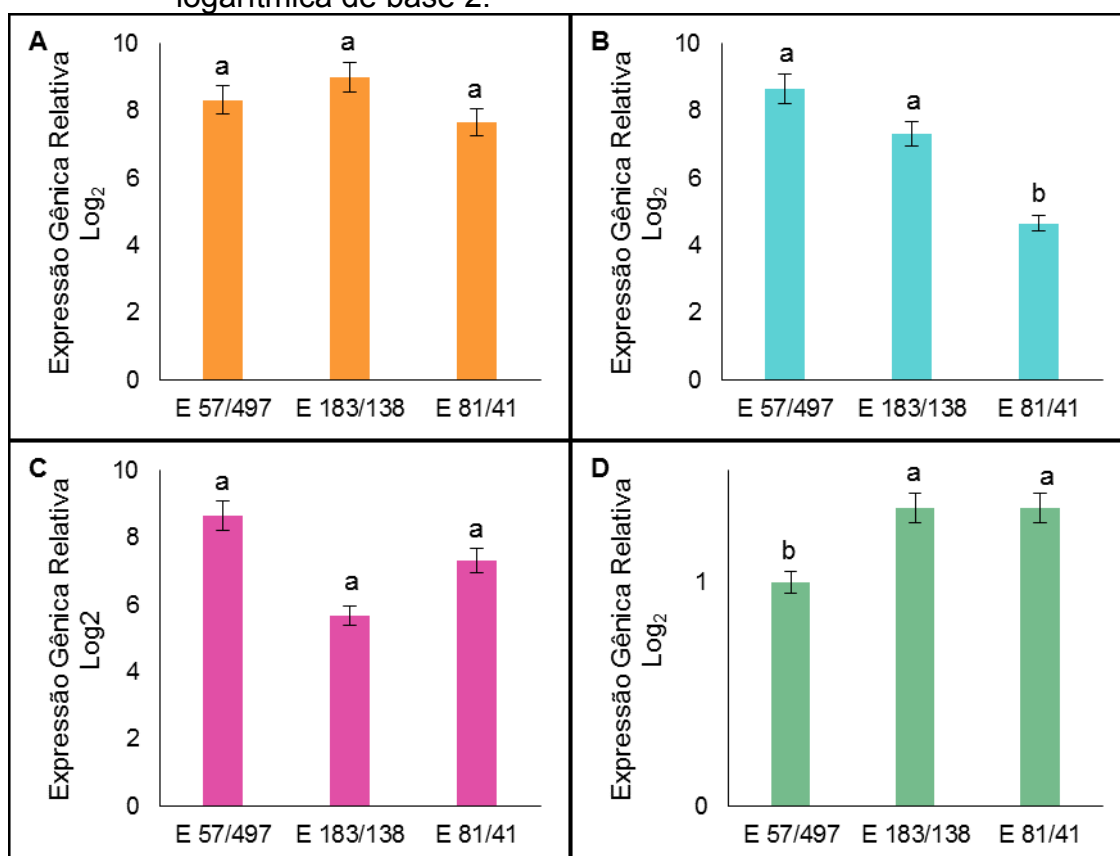
Figura 19. Concentrações de cafestol determinados por CLAE para os genótipos do Grupo 2 (PAGIATTO, 2013).



Fonte: (PAGIATTO,2013)

Para o Grupo 3, os genes *Ca_HMGR* e *Ca_DXR* (Figura 20A e C) não apresentaram diferença de expressão entre os genótipos. *Ca_MPDC* (Figura 20B) foi igualmente expresso nos genótipos E57/497 e E183/138, seguidos por E81/41. Já para *Ca_IDS* (Figura 20D) os genótipos com maior expressão foram E183/138 e E81/41, seguidos por E57/497.

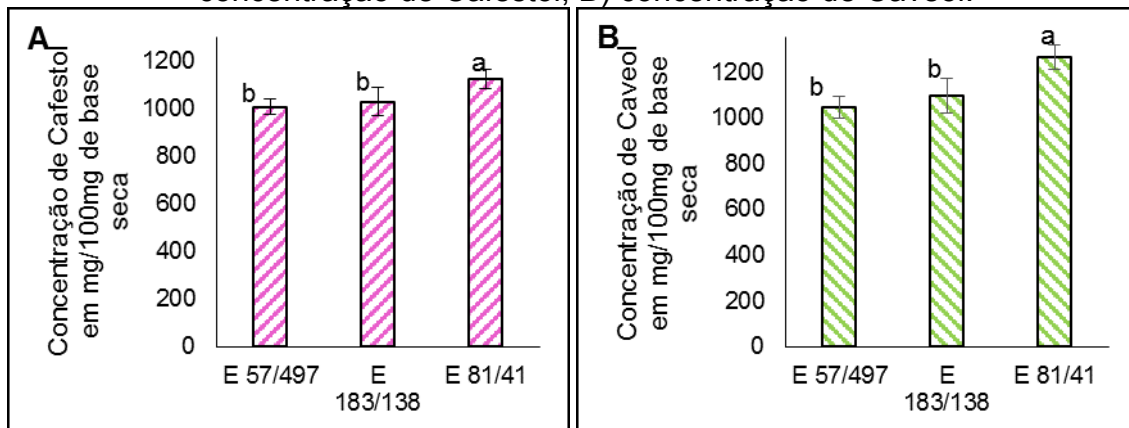
Figura 20. Padrão de expressão relativa dos genes *Ca_HMGR*, *Ca_MPDC*, *Ca_DXR* e *Ca_IDS* para o Grupo 3 [com altos níveis de cafestol e caveol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão Gênica Relativa de *Ca_HMGR*; B) Expressão Gênica Relativa de *Ca_MPDC*; C) Expressão Gênica Relativa de *Ca_DXR*; D) Expressão Gênica Relativa de *Ca_IDS*. Totalidade de diterpenos nas respectivas amostras são: E57/497: 2056,14; E183/138: 2128,13; E81/41: 2389,7. Dados em escala logarítmica de base 2.



Fonte: (PAGIATTO,2013)

Não houve padrão de expressão dos genes das vias MVA e MEP com as concentrações de cafestol (Figura 21A) e caveol (Figura 21B) do Grupo 3.

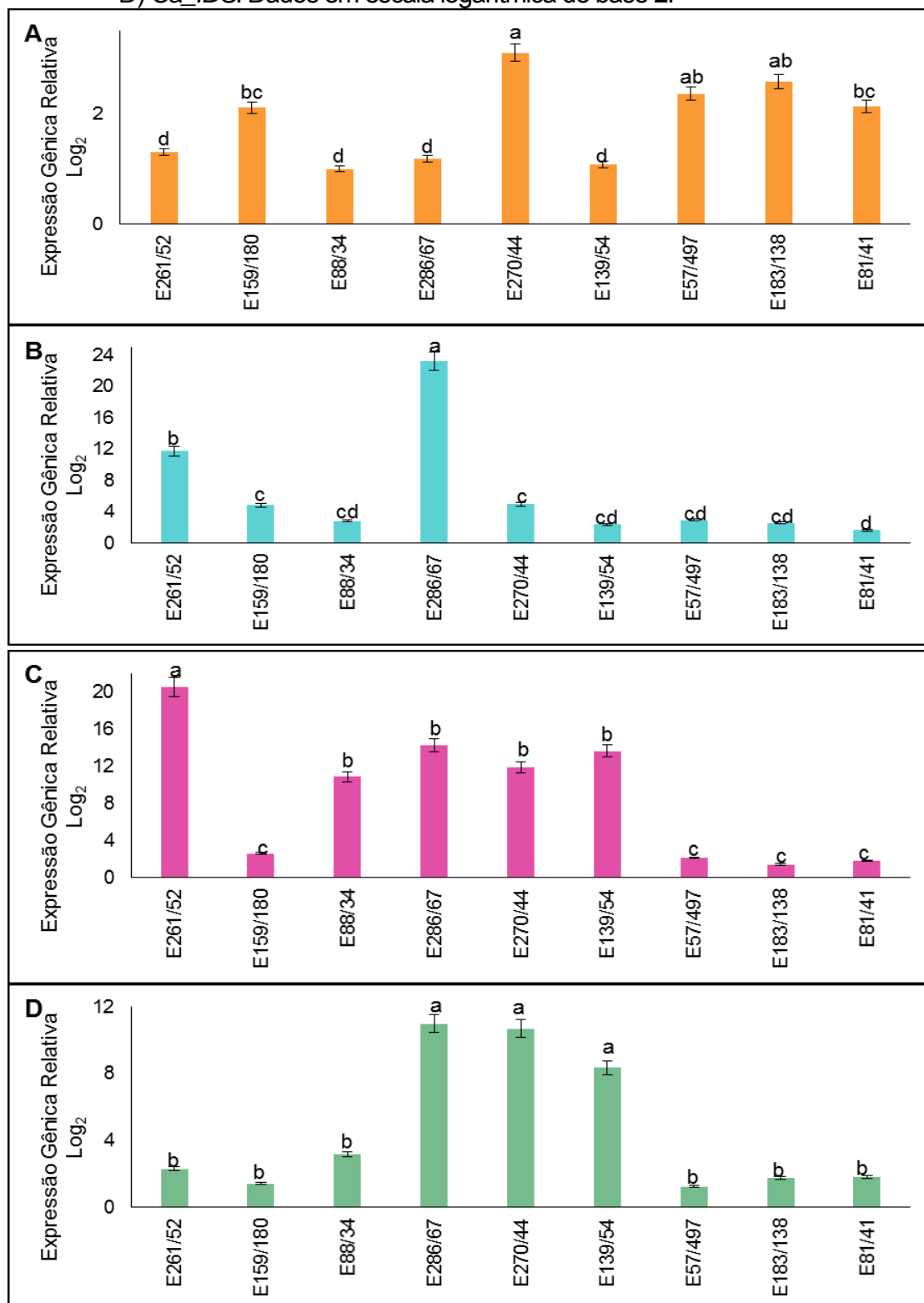
Figura 21. Concentrações de cafestol e caveol determinados por CLAE (PAGIATTO, 2013) para os genótipos do Grupo 3. Os dados no gráfico correspondem à média de mg cafestol/100mg de base seca, +/- o desvio padrão de 3 experimentos independentes. A) concentração de Cafestol; B) concentração de Caveol.



Fonte: (PAGIATTO,2013)

Não há um padrão para todos os genes das vias MVA e MEP em estudo e os genótipos da Etiópia (Figura 22), no entanto, observa-se que em geral os genótipos do Grupo 2 apresentaram expressão maior dos demais Grupos. O Grupo 2 apresenta maior expressão do que o Grupo 3, com exceção para o gene *Ca_HMGR* (Figura 22A), onde a expressão foi maior para o Grupo 3.

Figura 22. Visão geral do padrão de expressão relativa para os genes das vias MVA e MEP para todos os genótipos em estudo. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. Grupo 1: E261/52, E159/180 e E88/34; Grupo 2: E286/67, E287/29, E270/44 e E139/54; Grupo 3: E57/497, E183/138 e E81/41. A) *Ca_HMGR*, B) *Ca_MPDC*, C) *Ca_DXR* e D) *Ca_IDS*. Dados em escala logarítmica de base 2.



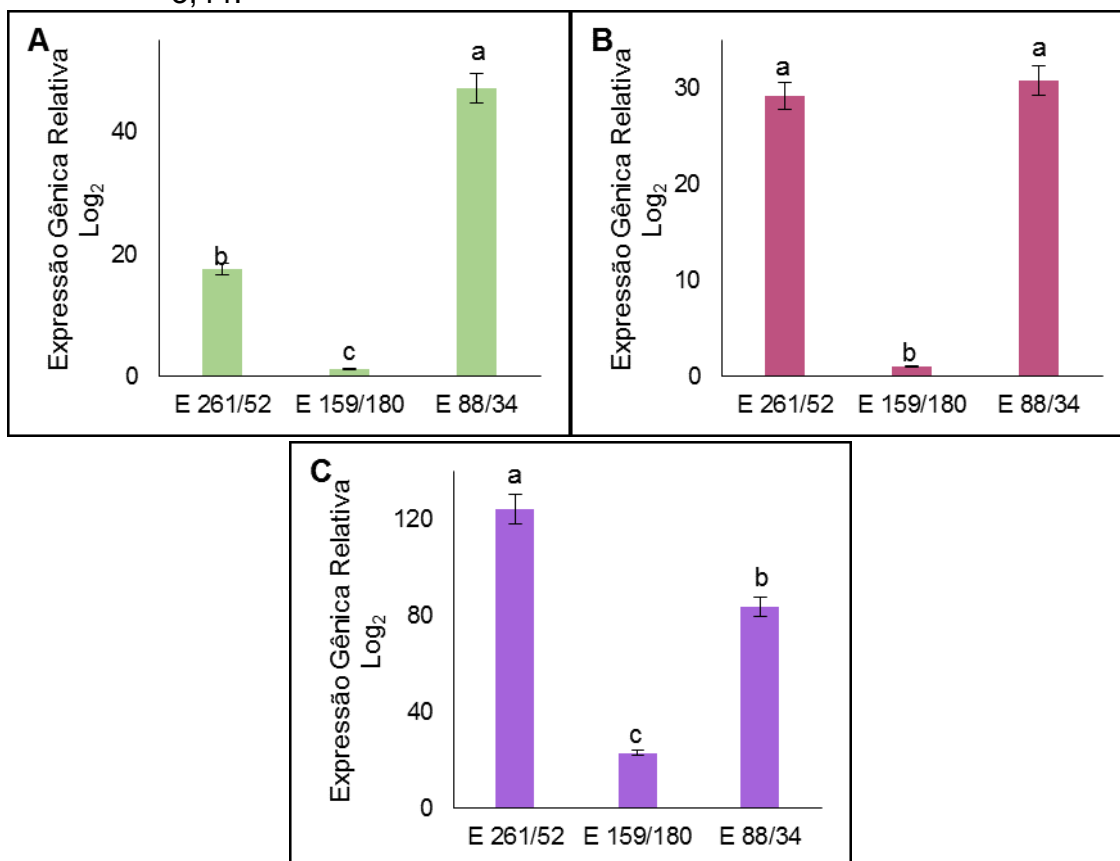
Como os Grupos foram divididos de acordo com a similaridade de concentração de cafestol ou caveol, esperava-se que não houvesse diferença significativa entre as expressões dos genótipos do mesmo Grupo, no entanto, isso não foi observado para os Grupos 1 e 2, apenas o Grupo 3 foi o único que não apresentou diferença significativa entre os genótipos que o pertencem para nenhum dos genes em estudo.

5.2.7. EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES *Cyt P450*

Foi possível avaliar a expressão dos genes que codificam para *Cyt P450* denominados *Ca_28*, *Ca_33* e *Ca_107*, porém é interessante notar que o gene *Ca_37* não foi expresso nos acessos da Etiópia aqui estudados. Na análise no capítulo anterior observamos uma alta expressão de *Ca_37* em 210 DAF mas uma expressão muito pequena em 90DAF. Análise da expressão deste gene em perisperma demonstrou expressão constitutiva porém muito pequena, cerca de cinco a dez vezes menos que o controle. (Ivamoto 2012). Como no estudo anterior observa-se alta expressão desse gene em 210 DAF, para os dois tratamentos, possivelmente o pico de expressão desse gene para os acessos da Etiópia sejam similares.

Dentro do Grupo 1, *Ca_28* foi mais expresso no genótipo E88/34 (Figura 23A), seguido de E261/52 e E159/180. Já para *Ca_33* (Figura 23B), E88/34 e E261/52 foram mais expressos do que E159/180. Enquanto que, *Ca_107* (Figura 23C) apresentou maior expressão em E261/52, seguido de E88/34 e E159/180.

Figura 23. Padrão de expressão relativa dos genes *Ca_28*, *Ca_33* e *Ca_107* para o Grupo 1 [com maiores níveis de caveol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão gênica relativa de *Ca_28*; B) Expressão gênica relativa de *Ca_33*, C) Expressão gênica relativa *Ca_107*. Relações de cav/caf das respectivas amostras são: E261/52: 2,11; E 159/180: 3,09; E88/34: 3,44.



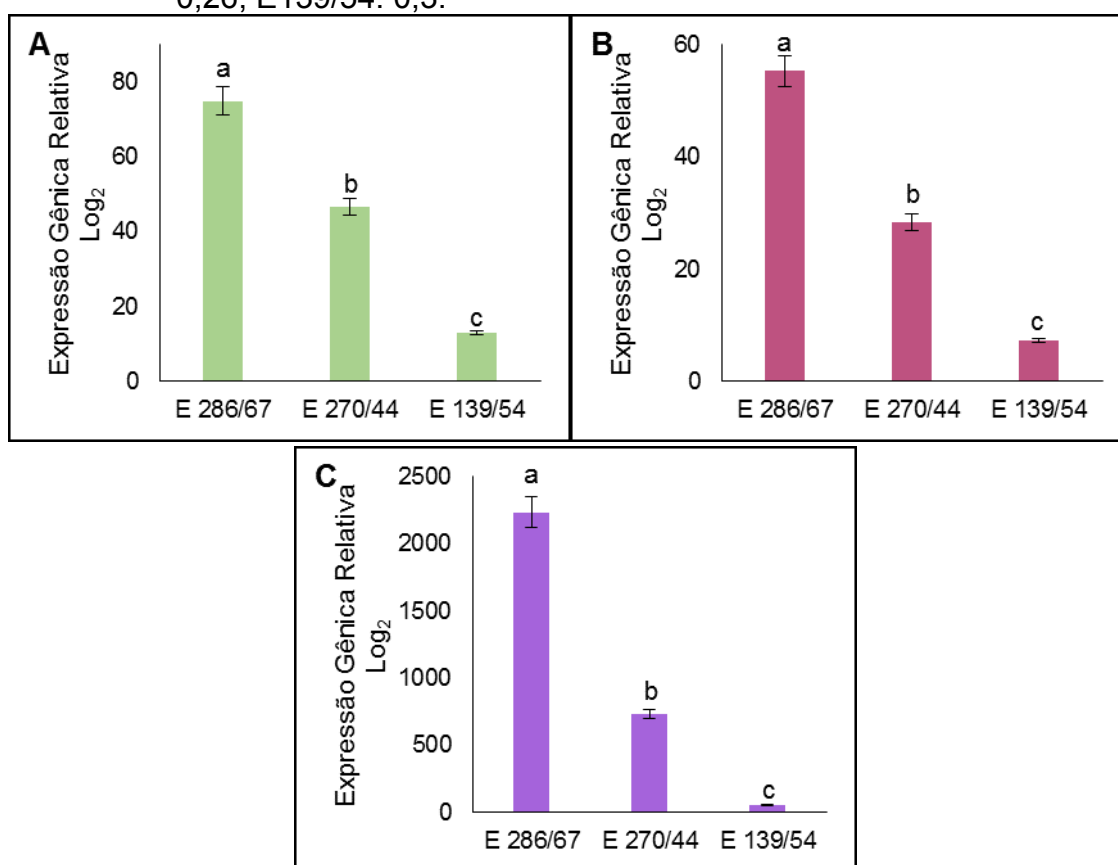
Fonte: (PAGIATTO,2013)

Apesar de não haver semelhança de padrões de expressão entre os genótipos pertencentes ao Grupo 1, observa-se uma tendência de expressão, onde, geralmente os genótipos E261/52 e E88/34 apresentam maiores níveis de transcritos de todos os genes em relação ao genótipo E159/180. Tendências entre a expressão gênica e o teor de cafeol não foram evidenciadas nos respectivos genótipos (Figura 17).

Os genes do Grupo 2 apresentaram padrão de expressão semelhante (Figura 24A, B e C). Foi observada maior expressão para todos os

genes de *Cyt P450* no genótipo E286/67, seguido por E270/44 e por E287/29 e E139/54, cujas expressões não diferiram significativamente.

Figura 24. Padrão de expressão relativa dos genes *Ca_28*, *Ca_33* e *Ca_107* para o Grupo 2 [com maiores níveis de cafestol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão gênica relativa de *Ca_28*; B) Expressão gênica relativa de *Ca_33*, C) Expressão gênica relativa *Ca_107*. Relações de cav/caf das respectivas amostras são E286/67: 0,14; E287/29: 0,25; E270/44: 0,26; E139/54: 0,3.

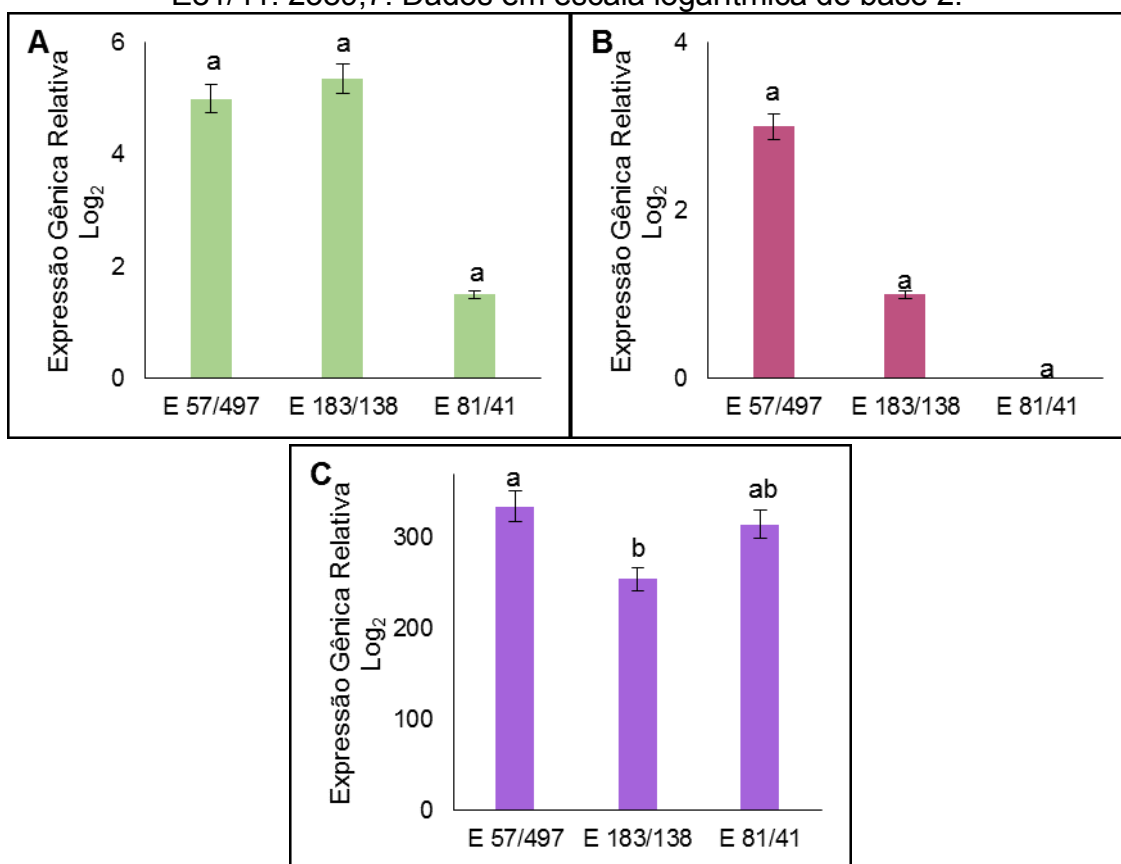


Fonte: (PAGIATTO,2013)

Apesar de não haver semelhança nos padrões de expressão individuais entre os genótipos do Grupo 2 para cada gene avaliado, entre os genes houve a mesma tendência de expressão. Os dados de Pagiatto (2013), demonstram que há a mesma tendência de teores de cafestol nos genótipos (Figura 19) e padrão de expressão gênica, dando indícios de que possivelmente os genes que codificam para *Cyts P450* estão relacionados com síntese/acúmulo de cafestol.

No Grupo 3, os genes *Ca_28* e *Ca_33* apresentaram o mesmo padrão de expressão (Figura 25A e B), não havendo diferença significativa entre os genótipos do Grupo 3. Já o gene *Ca_107* foi igualmente expresso em E57/497 e E81/41, seguido por E183/138.

Figura 25. Padrão de expressão relativa dos genes *Ca_28*, *Ca_33* e *Ca_107* para o Grupo 3 [com altos níveis de caveol e cafestol determinados por CLAE (PAGIATTO,2013)]. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. A) Expressão gênica relativa de *Ca_28*; B) Expressão gênica relativa de *Ca_33*, C) Expressão gênica relativa *Ca_107*. Totalidade de diterpenos nas respectivas amostras são: E57/497: 2056,14; E183/138: 2128,13; E81/41: 2389,7. Dados em escala logarítmica de base 2.



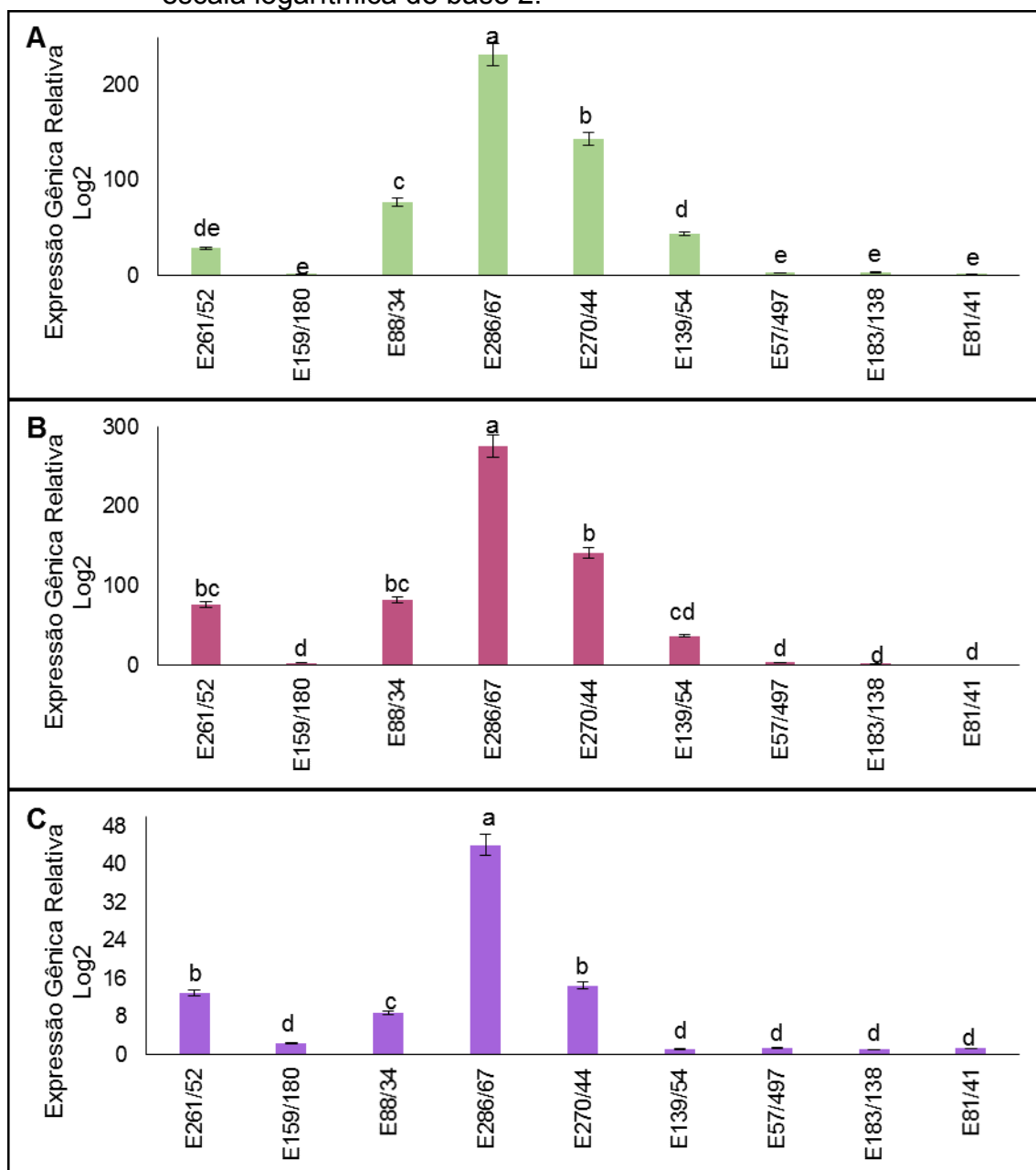
Fonte: (PAGIATTO,2013)

Da mesma forma que observado para os genótipos do Grupo 1, no Grupo 3 não há tendências entre o padrão de expressão dos genes *Cyt P450*, e os teores de cafestol e caveol nos respectivos genótipos (Figura 21).

Houve um padrão similar entre a expressão entre os grupos e os genes de *Cyt P450*. O Grupo 2 o que apresentou maior padrão de

transcritos (Figura 26A, B e C), apresentando também o genótipo E286/67 com maior expressão entre todas as amostras em estudo. Após o Grupo 2, o Grupo 1 apresentou maior expressão, seguido pelo Grupo 3, que assim como para os genes das vias MEP e MVA, não apresentou diferença significativa para os genes de Cyt P450 (Figura 26A, B e C).

Figura 26. Visão geral do padrão de expressão relativa para os genes das vias MVA e MEP para todos os genótipos em estudo. A abundância relativa dos transcritos foi normalizada utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os dados no gráfico correspondem à média +/- o desvio padrão de 3 repetições independentes para todos os genes. Grupo 1: E261/52, E159/180 e E88/34; Grupo 2: E286/67, E287/29, E270/44 e E139/54; Grupo 3: E57/497, E183/138 e E81/41. A) *Ca_28*, B) *Ca_33* e C) *Ca_107*. Dados em escala logarítmica de base 2.



5.3. CONCLUSÃO

Em geral, não houve relação entre os padrões de expressão dos genes avaliados com os teores de cafestol e caveol nas plantas do Grupo

1 e 3, porém ficou houve padrão entre os genes *Cyt P450* em plantas que apresentam maior concentração de cafestol (Grupos 2).

Este é o primeiro trabalho que evidencia expressões de genes ligados a biossíntese de diterpenos de café em acessos da coleção da Etiópia do IAPAR, portanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados com o intuito de avançar no conhecimento da regulação destes genes, e sua empregabilidade nos programas de melhoramento de café.

5.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOEKSCHOTEN, M. V.; SCHOUTEN, E. G.; KATAN, M. B. Coffee bean extracts rich and poor in kahweol both give rise to elevation of liver enzymes in healthy volunteers. v. 8, p. 1–8, 2004.

BOSELNANN, A. S. et al. The influence of shade trees on coffee quality in small holder coffee agroforestry systems in Southern Colombia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 129, n. 1-3, p. 253–260, 2009.

BURLAT, V. et al. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. **Plant Journal**, v. 38, n. 1, p. 131–141, 2004.

CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene. v. 6, n. 8, 2011.

CAVIN, C. et al. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. v. 19, n. 8, p. 1369–1375, 1998.

CAVIN, C. et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1155–1163, 2002.

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

FUKUSHIMA, E. O. et al. Combinatorial biosynthesis of legume natural and rare triterpenoids in engineered yeast. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 5, p. 740–749, 2013.

KITZBERGER, C. S. G. et al. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 1, p. 52–57, 2013a.

KITZBERGER, C. S. G. et al. Composição química de cafés árabica de cultivares tradicionais e modernas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 11, p. 1498–1506, 2013b.

LEE, K. J.; JEONG, H. G. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. v. 173, p. 80–87, 2007.

PAGIATTO, N. F. **Análise de Diterpenos e Cafeína em uma coleção da Etiópia de *Coffea arabica***. Dissertação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, 2013.

PATERAKI, I.; HESKES, A. M.; HAMBERGER, B. Cytochromes P450 for Terpene Functionalisation and Metabolic Engineering. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 123, n. July 2015, p. 127–141, 2015.

URGERT, R. et al. Separate kahweol effects of the coffee diterpenes cafestol and on serum lipids and liver aminotransferases. **The American journal of clinical nutrition**, v. 65, n. 2, p. 519-524, 1997.

WANG, S. et al. Antiangiogenic properties of cafestol , a coffee diterpene , in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 3, p. 567–571, 2012.

6. CONCLUSÃO GERAL

- Os genes que codificam enzimas da via MVA demonstraram padrão de expressão similar, havendo maior expressão em frutos com 210 DAF cultivados sob SAF.
- Os genes *Cyt P450* apresentam maior expressão em frutos com 210 DAF cultivados a PS. Apresentam também maior expressão quando cultivados a PS do que sob SAF.
- É evidente que esses genes têm expressões relacionadas com incidência de luz ou, no mínimo, com o microclima do sistema de cultivo a PS, porém não se pode aferir que apenas essas variáveis atuaram na regulação da expressão gênica.
- Não houve tendência entre os padrões de expressão dos genes avaliados com os teores de cafestol e caveol dos acessos pertencentes ao Grupo 1 e 3, porém ficou evidenciado a participação dos genes *Cyt P450* em plantas que apresentam maior concentração de cafestol (Grupos 2).
- Este é o primeiro trabalho que evidencia: 1) a expressão de genes associados à biossíntese de isoprenóides em endosperma de frutos de café; 2) a regulação da expressão desses genes em relação ao sistema de cultivo e à idade dos frutos; 3) teores de cafestol e caveol correlacionados com dados de expressão gênica.

7. REFERÊNCIAS

- BEER, J. et al. Shade management in coffee and cacao plantations. **Agroforestry Systems**, v. 38, p. 139–164, 1998.
- CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol , a Coffee Diterpene. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23407, 2011.
- CAVIN, C. et al. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 8, p. 1369-1375, 1998
- CAVIN, C. et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1155–1163, 2002.
- COLTRI, P. P. et al. Empirical models to predict LAI and aboveground biomass of *Coffea arabica* under full sun and shaded plantation: a case study of South of Minas Gerais, Brazil. **Agroforestry Systems**, 2015.
- CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira - Café**, 2016
- COSTA, C. C. DA; GUILHOTO, J. J. M.; IMORI, D. Importância dos setores agroindustriais na geração de renda e emprego para a economia brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 51, n. 4, p. 787–814, 2013.
- DAMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: A review. **Field Crops Research**, v. 86, n. 2-3, p. 99–114, 2004.
- DARABI, M.; MASOUDI-NEJAD, A.; NEMAT-ZADEH, G. Bioinformatics study of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR) gene in Gramineae. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 9, p. 8925–35, 2012.
- DAVIS, A. P. et al. Growing coffee : *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data ; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357-377, 2011.
- ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012.
- GUTENSOHN, M. et al. Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in tomato fruits via introduction of the non-canonical substrate neryl diphosphate. **Metabolic Engineering**, v. 24, p. 107–116, 2014.
- HALKIER, B. A.; GERSHENZON, J. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 303–333, 2006.
- ISLAM, B. et al. Insight into the mechanism of polyphenols on the activity of HMGR by molecular docking. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 4943–4951, 2015.
- JACKSON, C. J. et al. A Novel Sterol 14 -Demethylase/Ferredoxin Fusion Protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* Represents a New Class of the Cytochrome P450 Superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46959–46965, 2002.

- JOSE, S. Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: An overview. **Agroforestry Systems**, v. 76, n. 1, p. 1–10, 2009.
- KITZBERGER, C. S. G. et al. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 1, p. 52–57, 2013.
- KOULOURA, E. et al. **Plant Sesquiterpenes and other Terpenoids**. [s.l: s.n.].
- KY, C. L. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 223–230, 2001.
- LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 261, n. 2, p. 259–66, mar. 1999.
- LEE, K. J.; JEONG, H. G. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. **Toxicology letters**, v. 173, n. 2, p. 80-87, 2007.
- LEE, S. et al. Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 49, p. 21205–21210, 2010.
- MONDEGO, J. M. C. et al. Molecular characterization of a miraculin-like gene differentially expressed during coffee development and coffee leaf miner infestation. **Planta**, v. 233, p. 123–137, jan. 2011.
- NELSON, D. R. Plant cytochrome P450s from moss to poplar. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2-3, p. 193–204, 2006.
- NELSON, D.; WERCK-REICHHART, D. A P450-centric view of plant evolution. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 194–211, 2011.
- OLIVEIRA, I. P. DE; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T. Cultura de café: histórico, classificação botânica e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, p. 17–32, 2012.
- PATERAKI, I.; HESKES, A. M.; HAMBERGER, B. Cytochromes P450 for Terpene Functionalisation and Metabolic Engineering. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 123, n. July 2015, p. 127–141, 2015.
- PEREIRA, L. F. P.; IVAMOTO, S. T. Characterization of Coffee Genes Involved in Isoprenoid and Diterpene Metabolic Pathways. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l: s.n.]. p. 45–51.
- PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. Microclimatic changes and the indirect loss of ant diversity in a tropical agroecosystem. **Oecologia**, v. 108, n. 3, p. 577–582, 1996.
- SCHULER, M. A. **Plant Cytochrome P450 Monooxygenases**. [s.l: s.n.]. v. 15
- TISKI, I. et al. Characterization and expression of two cDNA encoding 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoforms in coffee (*Coffea arabica* L.). **Omics : a journal of integrative biology**, v. 15, n. 10, p. 719–727, 2011.

URGERT, R. et al. Separate kahweol effects of the coffee diterpenes cafestol and on serum lipids and liver aminotransferases. **The American journal of clinical nutrition**, v. 65, n. 2, p. 519-524, 1997.

VELMOUROUGANE, K. Shade Trees Improve Soil Biological and Microbial Diversity in Coffee Based System in Western Ghats of India. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, 2015.

WANG, S. et al. Antiangiogenic properties of cafestol , a coffee diterpene , in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 3, p. 567–571, 2012.