

INFLUÊNCIA DE 1-METILCICLOPROPENO NA EXPRESSÃO DE GENES DO ETILENO E NO FLORESCIMENTO DE *Coffea arabica*¹

Iasminy Silva Santos²; André Almeida Lima³; Antonio Chalfun Júnior⁴

¹Trabalho financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

²Doutoranda em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, iasminysilvas@gmail.com

³Pós-Doutorando em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, andrelima4@yahoo.com.br

⁴Professor Associado III, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Fisiologia Vegetal, Lavras-MG, chalfunjunior@ufla.br

RESUMO: A assincronia no florescimento do cafeeiro resulta da desuniformidade no desenvolvimento das gemas, processo influenciado por fatores ambientais, considerando que a antese ocorre após um período de deficiência hídrica seguida por precipitação. Alterações no balanço hormonal têm sido observadas após ciclos de restrição hídrica e reidratação, e essa oscilação sobre o status hídrico da planta promoveu o aumento nos níveis de etileno em algumas espécies. Essa constatação levou a associação entre as exigências na fase de florescimento do cafeeiro e o envolvimento do etileno na promoção da antese. Com o objetivo de melhor entender o envolvimento do etileno na regulação do florescimento, esse trabalho avaliou os efeitos da aplicação exógena de 1-MCP na expressão de genes relacionados à biossíntese em folhas e gemas do cafeeiro sob condição de campo. As avaliações e coletas foram realizadas em diferentes tempos após a implementação dos tratamentos: T1 - controle, T2 - 1-MCP+Break-Thru e T3 - Break-Thru. As análises de RT-qPCR demonstraram diferente comportamento quanto ao perfil de expressão dos genes (*CaACS1 - like*, *CaACO1*) em folhas e gemas analisadas nesse estudo e os níveis de expressão foram alterados poucas horas (2h) após aplicação dos produtos. Entretanto, o florescimento ocorreu somente nas plantas tratadas com 1-MCP, na ausência de chuva e irrigação.

PALAVRAS-CHAVE: Cafeeiro. Etileno. 1-MCP.

INFLUENCE OF 1-METHYLCYCLOPRENE ON THE EXPRESSION OF ETHYLENE GENES AND ON THE FLOWERING OF *COFFEA ARABICA*

ABSTRACT: The asynchronous flowering of the coffee tree comes from the uneven development of buds, which can be influenced by environmental factors, taking into account that the anthesis takes place after a water deficit period, followed by precipitation. Changes in the hormone balance have been observed after water deficit and rehydration cycles, and such oscillation on the water status of the plant increased the level of ethylene in some species. This finding led to the association between the requirements at the flowering stage of the coffee tree and the involvement of the ethylene in promoting anthesis. Thus, in order to better understand the role of the ethylene in regulation of flowering, we analyzed the effects of the exogenous application of 1-MCP in the expression of genes related to the ethylene biosynthesis and signaling pathways in coffee leaves and bud from plants under field conditions. The evaluations and tissue sampling were carried out in different times treatments implementation: T1 – control, T2 – 1-MCP+Break-Thru, and T3 – Break-Thru. RT-qPCR analyses showed a different behavior in relation to the profile of gene expression in leaves and buds analyzed in the present study (*CaACS1 - like*, *CaACO1 - like*) and the expression levels were changed a few hours (2h) after applying the products. However, there was flowering only in plants treated with 1-MCP, in the absence of rain and irrigation.

KEY WORDS: Coffee tree. Ethylene. 1-MCP.

INTRODUÇÃO

O fitormônio etileno está envolvido com inúmeros eventos de crescimento e desenvolvimento, relacionando-se também com respostas das plantas sobre diferentes condições de estresses bióticos e abióticos (ABELES et al., 1992). O estresse hídrico é um dos fatores associados com o aumento na taxa de produção do etileno e genes que codificam as enzimas sintase e oxidase do Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), ACS e ACO respectivamente, integrantes da rota de biossíntese do etileno, podem ser regulados positivamente em plantas nessa condição (KADER, 1992; WANG et al., 2002). Em relação ao florescimento, o etileno tem se mostrado um regulador desse evento inibindo ou induzindo a antese em algumas espécies. O etileno inibiu o florescimento em *Arabidopsis* (ACHARD et al., 2007), entretanto, induziu a antese em rosas (MENG et al., 2014). Observa-se no estudo de Meng et al. (2014) que um período de restrição hídrica, seguido por reidratação pode levar a um rápido e intenso aumento na produção de etileno, o qual se mostrou responsável por induzir o restabelecimento de água em botões florais de rosas e promover a antese. Essa constatação sugere que o etileno possa estar envolvido na indução do florescimento do cafeeiro. Com base no padrão de floração do

cafeeiro, e considerando-se a necessidade de ciclos de desidratação e reidratação para indução floral, Lima (2015) propôs a existência de conexão entre o etileno e a promoção do florescimento em café, de modo que esse hormônio atuaria como um indutor da abertura floral. O 1-metilciclopropeno (1-MCP) é um regulador do crescimento vegetal indicado para controlar os efeitos do etileno pela inibição da ação deste fitormônio (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; KAWAKAMI et al., 2006; VAN STADEN, 1979) ao ligar-se de maneira irreversível aos seus receptores (BLANKENSHIP, 2001). Com o objetivo de melhor compreender o modo com que o etileno regula o florescimento do cafeeiro, esse trabalho avaliou os efeitos da aplicação exógena de 1-MCP na expressão de genes relacionados à biossíntese do etileno, em folhas e gemas do cafeeiro sob condição de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Material vegetal

O experimento foi conduzido na Fazenda Cafuá no município de Ijací – Minas Gerais. O experimento foi composto por um grupo controle, sem aplicação dos produtos, e dois grupos tratados (Tabela 1). Para o grupo tratado com 1-MCP (3,8% de ingrediente ativo (i.a)– produto comercial Harvista™- AgroFresh) diluiu-se 50 mg de i.a. em 1L de água para cada planta (LIMA, 2015). Nesse tratamento foi adicionado o Break-Thru (surfactante de organosilicone - S240, Evonik Industries AG, Essen, Alemanha) na concentração de 0,025 V/V. Visando otimizar a pulverização, as soluções foram preparadas a cada 3L de água. Para o grupo tratado apenas com Break-Thru, adicionou-se o produto na concentração descrita para o T2, seguindo também o mesmo padrão para preparo. A pulverização foi realizada entre 8 e 9 horas, com o auxílio de um pulverizador costal de 12L (S12 - Brudden Pulverizadores) logo após a preparação das soluções. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 3 tratamentos e 6 repetições biológicas, totalizando 18 plantas no experimento. A localização das repetições biológicas nos blocos ocorreu aleatoriamente e entre cada linha experimental existia uma linha de bordadura.

Tabela 1: Descrição dos Tratamentos do experimento

Tratamentos	Descrição	Abreviação
T1	Controle	CTL
T2	1-MCP + Break-Thru	1-MCP+BTH
T3	Break-Thru	BTH

Coleta do Material

O material vegetal foi coletado de ramos plagiotrópicos, preferencialmente, no terço médio das plantas. Para a análise da expressão gênica, coletou-se folhas completamente expandidas localizadas no 3º e 4º nós, e gemas a partir no estágio G4, de acordo com Morais et al. (2008). O material coletado foi mantido em nitrogênio líquido, e em seguida armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

Análises moleculares

Folhas e gemas foram maceradas em cadinho utilizando nitrogênio líquido, armazenando-se 100mg (0,25ml) de material vegetal para extração de RNA em tubos tipo eppendorf de 1,5ml. Para extração, utilizou-se o Protocolo do Concert (Plant RNA Purification Reagent - Invitrogen, USA), com pequenas alterações. Em seguida, as amostras foram tratadas com o Turbo DNA free™ kit (Ambion) para eliminação do DNA residual e a síntese de cDNA utilizando o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Para a análise da expressão gênica por RT-qPCR dos genes relacionados com a síntese de etileno (*CaACO1 – like* e *CaACS1 – like*) foram conduzidas utilizando-se o termociclador Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Qiagen) com o sistema de detecção SYBR® Green. O volume final da reação para cada amostra foi de 15 µL: 7,5 µL de SYBR Green (QuantiFast SYBR Green PCR Kit – Qiagen), 0,6 µL de primers específicos para cada gene alvo (0,3 µL primer forward + 0,3 µL primer reverse), 1,5 µL de cDNA a 10 ng/µL e 5,4 µL de água livre de RNase e demais contaminantes. Foram utilizadas três repetições biológicas de cada tratamento para cada um dos tempos analisados (2, 6 e 24h), sendo utilizadas triplicadas técnicas para cada uma das amostras. A eficiência de amplificação dos primers dos genes alvos e de referência foi determinada por meio de curva de diluição (Tabela 2). A análise da expressão relativa foi calculada através do método $\Delta\Delta CT$, de acordo com Pfaffl (2001), utilizando os genes de referência AP47 e RPL39. A diferença relativa da expressão de cada gene foi feita com base em uma amostra calibradora, que foi escolhida de acordo com o menor nível de expressão para cada um dos genes nos tecidos analisados.

Tabela 2: Sequência de primers e eficiência da amplificação por RT-qPCR.

Gene	Primer Forward (5' para 3')	Primer Reverse (5' para 3')	Eficiência de Amplificação (%)
CaACO1 – like	ACGTGGAAGCCAATGTTACC	GAGGGAGAAGAAAACATCCTAGC	96
CaACS1 - like	TCCTTACCATCCCACCAGAA	CCATGAATTTGTTTCGCTCCT	90
AP47	GGTGTACGCTCACCATTTTCATC	AGCCAACAGCACCAGTAACCTTG	99
RPL39	GCGAAGAAGCAGAGGCAGAA	TTGGCATTGTAGCGGATGGT	87

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do perfil de expressão do gene *CaACS1-like* permitiu observar diferenças na expressão deste gene entre os tecidos de café avaliados (Figura 1). Em folhas, *CaACS1-like* apresentou nível de expressão semelhante entre controle e 1-MCP, diferindo apenas 6h após a pulverização das plantas. Em relação ao Break-Thru, somente após 2h ocorreu mudança significativa na expressão do *CaACS1-like*, sendo três e quatro vezes maior do que o 1-MCP e controle, respectivamente. A aplicação do 1-MCP promoveu um aumento na regulação desse gene 6 horas após a pulverização nas plantas, mostrando um aumento de duas e três vezes nos níveis de expressão quando comparado com os níveis de expressão do mesmo gene no tratamento do Break-Thru e o Controle. Decorrido 24h, não foi detectada diferenças entre os tratamentos. Nos tecidos de gema, não houve diferença na expressão do *CaACS1-like* entre o tratamento com 1-MCP e o controle após 2h. A diferença significativa na expressão foi observada somente após 6h, reduzindo na amostragem de 24h. Interessantemente, esse padrão de expressão após 6h foi análogo para ambos os tecidos. Nas gemas, o tratamento com Break-Thru apresentou aumento na expressão do *CaACS1-like* em cinco vezes quando comparado ao 1-MCP no tempo de 24h, mas não exibiram diferença em comparação com as plantas controle. O gene *CaACO1-like*, análogo ao gene da oxidase do ACC, foi nitidamente mais expresso em folhas do que em gemas de café (Figura 1). Nas folhas, esse gene foi mais expresso a 2h após as pulverizações.

As plantas tratadas com Break-Thru apresentaram expressão duas e dez vezes superior em relação aos tratamentos com 1-MCP e controle, respectivamente. Após 6h não houve diferença na expressão para os tratamentos com 1-MCP e Break-Thru, mas ambos expressaram o *CaACO1-like* 4 vezes mais que as plantas controle. Nota-se que ao longo do tempo, a expressão do *CaACO1-like* reduziu no tratamento com Break-Thru, e para o tratamento com 1-MCP, após 24h ocorreu um ligeiro aumento na expressão desse gene quando comparado com os demais tratamentos. Os níveis de expressão do *CaACO1-like* em gema foram extremamente baixos quando comparados com as folhas e semelhante em todos os tempos de amostragem, exceto no tempo 2 onde no tratamento com Break-Thru esse gene foi 2 vezes mais expresso em comparação com o tratamento do 1-MCP e do controle. Analisando os membros relacionados com a via de biossíntese do etileno, verificou-se que os padrões de expressão nos tecidos de gema e folha são distintos. No gene homólogo da sintase do ACC, *CaACS1-like*, o nível de expressão foi semelhante entre os tecidos analisados. Mas, um pico de expressão ocorrido nas gemas após 2h da pulverização sugere que nos botões florais a síntese do precursor do etileno (ACC) ocorre bruscamente e de maneira mais intensa, respondendo rapidamente ao 1-MCP. É interessante notar que os genes relacionados com a expressão da enzima oxidase do ACC foi mais regulada nas folhas após as pulverizações com 1-MCP+BTH e BTH. O aumento nos níveis de expressão de *CaACO1-like* em resposta a esses produtos sugerem que ocorreram elevações nas taxas de etileno foliar, especialmente após 2 horas das pulverizações. Esses resultados estão de acordo com a análise de expressão, para ambos os genes, realizada por Lima (2015) em folhas de mudas de café cultivadas em casa de vegetação.

O autor relatou picos na expressão do *CaACO1-like* poucas horas após o início dos tratamentos com 1-MCP e BTH, assim como ocorrido neste estudo, mostrando que nas folhas a conversão do ACC em etileno, provavelmente, foi acentuada. Aparentemente, essa produção é súbita e transitória considerando que os níveis de expressão dos genes oscilaram rapidamente, geralmente apresentando intensidade e duração dos picos inferiores a 24h. Outro fato interessante foi a baixa expressão do *CaACO1-like* em gemas quando comparado com as folhas, principalmente nas plantas do controle, e apesar da aplicação dos produtos, o nível de expressão desse gene não foi significativo. Possivelmente existem outras oxidases atuando nos botões florais, realizando a conversão do ACC em etileno. Certamente, um mecanismo de *feedback* possa ser uma possível explicação para os resultados divergentes observados na expressão desses genes quando as plantas foram tratadas com 1-MCP Break-Thru, especialmente para o BTH que, surpreendentemente, exerceu grande influência na expressão gênica, obtendo algumas vezes nível de expressão superior ao 1-MCP. Considerando que a ligação do 1-MCP estabiliza os receptores (KEVANY et al., 2007), ao ocupar os sítios

de ligação do etileno essas moléculas podem ter induzido a interpretação pela planta de redução nos níveis de etileno celular. Assim, provavelmente o 1-MCP estimulou a autocatálise do etileno através da perda do *feedback* negativo, assim como descrito por Ella et al. (2003). Isto sugere que a ligação do 1-MCP bloqueou a sinalização na rota de biossíntese do etileno. Assim, os sinais que eram enviados para reduzir a síntese cessaram e a planta foi estimulada a produzir mais etileno, elevando a sensibilidade da planta ao hormônio. Conjuntamente, esses efeitos provavelmente promoveram um aumento no nível e ação do etileno, culminando na antese dos botões florais competentes no cafeeiro (Figuras 2 e 3)

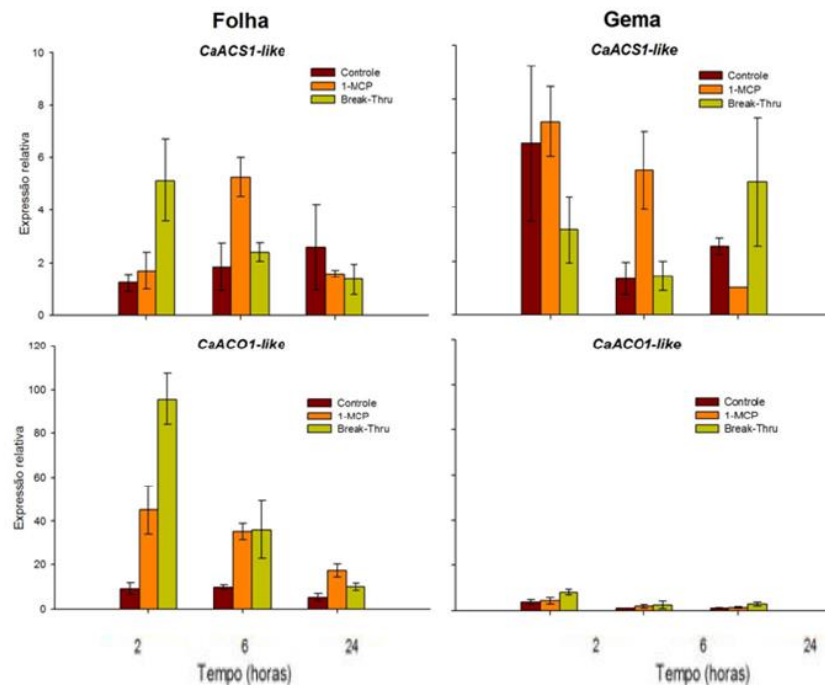


Figura 1: Expressão gênica relativa dos genes *CaACS1-like* e *CaACO1-like* em folhas (painel à esquerda) e gemas (painel à direita) de café nos tempos 2, 6 e 24 h após a implementação dos tratamentos: controle, 1-MCP+Break-Thru e Break-Thru.



Figura 2: Representação da condição fenológica em campo das repetições biológicas antes da implementação dos tratamentos: (A) T 1 - Controle; (B) T 2 - 1-MCP+BTH; (C) T 3 - BTH.

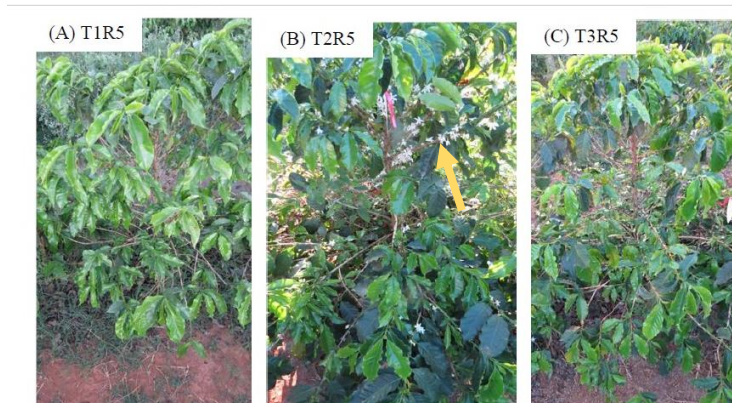


Figura 3: Representação fenológica em campo das repetições biológicas após a implementação dos tratamentos: (A) T 1 - Controle; (B) T 2 - 1-MCP+BTH; (C) T 3 – BTH. Seta amarela indica a presença de flores.

CONCLUSÕES

- 1 - Esses resultados de expressão sugerem que um aumento nos níveis de etileno ocorra logo após as primeiras horas de aplicação do 1-MCP, considerando o perfil de expressão de todos os genes analisados neste estudo.
- 2 - O aumento nos níveis de etileno provavelmente ocorrer de forma rápida e transitória, considerando os picos na expressão imediatamente após 2h das pulverizações, mas o tempo de duração parece não exceder 24 horas.
- 3 - Este trabalho também evidencia que, provavelmente, ocorreu aumento na produção de etileno nas folhas após os tratamentos com 1-MCP+BTH e BTH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, J.R. Ethylene in plant biology. 2. ed. London: Academic press., 414p., 1992.
- ACHARD, P. et al. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6484–6489, 2007.
- BLANKENSHIP, S. Ethylene effects and the benefits of 1-mcp. *Perishables Handling Quarterly*, n.108, 2001.
- BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, J. M. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharv. Biol. Technol.* 28:1-25, 2003.
- ELLA, L. et al. . Effect of the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene on parsley leaf senescence and ethylene biosynthesis. *Postharvest Biology and Technology*, v. 30, n. 1, p. 67-74, 2003.
- EVONIK. Break Thru. 2013. Disponível em: <<http://www.BreakThru.com>>. Acesso em: 08 fev. 2016.
- EVONIK. Brochure Break Thru S240. 2014. Disponível em: <<http://www.BreakThru.com/product/BreakThru/Documents/brochure-BreakThru-s-240-PT-web.pdf>> . Acesso em: 08 fev. 2016.
- KADER, A. A. Postharvest technology of horticultural crops. Oakland: Divisão of Agricultural and Natural Resources, 2ed. California: university of California, 296p., 1992.
- KAWAKAMI, E. M. et al. Effect of 1-MCP on the Growth and Yield of Cotton. *Summaries of Arkansas Cotton Research*, p. 58-61, 2006.
- KEVANY, B. et al. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant Journal*, v. 51, n. 481, p. 458-467, 2007.
- LIMA, A. A. Ethylene regulation under different watering conditions and its possible involvement in coffee (*Coffea arabica* L.) flowering. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 151p., 2015.
- MENG, Y. et al. Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration. *Plant J.*, p. 941-50, 2014.
- MORAIS, H. et al. Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *Coffea arabica*. *Bragantia* 67(1): 257:260, 2008.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, 2001.
- VAN STADEN, J. The effect of emasculation on the endogenous cytokinin levels of *Cymbidium* flowers. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.10, n.3, p. 277-284, 1979.
- WANG, K.; LI, H.; ECKER, J. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14:S131-S151, 2002.