

ANÁLISE FUNCIONAL DE SEMENTES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Felipe Vieira de Souza¹
Ídina Rezende Galvão²
Renato Delmondez de Castro³
Darío Abel Palmieri⁴
Luzimar Gonzaga Fernandez⁵

Resumo: O café é um produto agrícola de extrema importância no cenário atual brasileiro e mundial. Porém a concorrência com outros países exportadores exige dos produtores um grão de melhor qualidade. Considerando a falta de uniformidade na maturação das sementes de café, fazem-se necessários estudos que forneçam informações para contornar este problema. O presente trabalho está sendo desenvolvido com o objetivo de fazer a análise funcional das sementes de café (*Coffea arabica* L.), utilizando técnicas de biologia celular e molecular através das quais seja possível identificar genes responsáveis pelo processo de maturação da semente.

Palavras-chave: Semente; *Coffea arabica*; Expressão gênica; RNA; Maturação

INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas, sendo considerado o segundo item em importância do comércio internacional de “commodities”. O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae, que também inclui outras plantas de importância econômica. Este gênero compreende aproximadamente 100 espécies, mas a produção comercial é baseada somente em duas espécies, *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner, que representam aproximadamente 70 % e 30 % do mercado total de café, respectivamente (VIEIRA et al., 2006). Este grão representa uma fonte de renda significativa para diversos países da África, Ásia e América Latina, gerando em torno de U\$10-12 bilhões por ano. O Brasil, Vietnã e Colômbia são responsáveis por 50% da produção mundial de café, sendo o nosso País quem responde sozinho por mais de um terço dessa produção (VIEIRA et al., 2006). Vale ressaltar que o consumo interno brasileiro equipara-se à soma das exportações para os Estados Unidos, Alemanha, Itália, Japão e França (AMSTALDEN, 2001).

A demanda por um produto diferenciado intensificou-se a partir da década de 90, criando novas oportunidades e estimulando a relação entre o cafeicultor e o cliente (CAIXETA, 1998). Essa crescente demanda dos países importadores, aliada ao aumento da oferta do produto por parte dos outros países exportadores, torna necessário o estabelecimento de programas que visem aumentar a oferta do produto brasileiro e assim melhorar a competição no mercado externo (LEITE, 1996).

¹ Graduando em Ciências Biológicas pela UCSal; Bolsista PIBIC/FAPESB do LEMA/ UCSal

² Estagiária Voluntária/UCSal

³ Dr. em Fisiologia Vegetal/UFBA

⁴ Orientador, Dr. em Ciências Biológicas, LEMA/ UCSal

⁵ Dra. em Bioquímica e Biologia Molecular Estrutural, Coordenadora do LEMA/ UCSal, Departamento de Biofunção - ICS/UFBA

A forma mais utilizada de propagação do cafeeiro é por meio de mudas. Há consenso sobre a importância do processo de formação de mudas para o sucesso da lavoura cafeeira e que falhas na escolha da semente e na formação das mudas causam desenvolvimento irregular do cafezal, atraso no início da fase produtiva e redução do rendimento da cultura (GUIMARÃES, 1995; MELO, 1999; SILVA et al., 2000; FAVARIN, 2003). Uma cultura irregular implica em grãos em diversos estágios de desenvolvimento, podendo acarretar em modificações consideráveis no produto final, visto que variações na maturação das sementes podem alterar as concentrações de alguns compostos, alterando assim a qualidade final da bebida. Segundo Leite (1996), o café verde tem alto teor de compostos fenólicos, baixos teores de umidade, atividade enzimática e acidez. A qualidade da bebida é caracterizada pelo seu sabor e aroma, sendo influenciada por diversos fatores pré e pós-colheita, os quais garantem a expressão final da qualidade do produto (AMSTALDEN, 2001). Dentre os fatores pré-colheita se destacam os seguintes: espécie e variedade cultivada, local de cultivo, maturação dos grãos, incidência de microrganismos e efeito de adubações.

O armazenamento das sementes para adequação da época ideal de produção de mudas é problemático do ponto de vista da qualidade fisiológica, uma vez que as sementes de *Coffea* spp. são, em geral, menos tolerantes à dessecação e ao armazenamento, com tendência a serem mais “recalcitrantes” (ESTANISLAU, 2002). A semente de cafeeiro se caracteriza por ter uma germinação lenta e variável, conforme as condições de produção (WENT, 1957). O potencial de germinação das sementes vai se moldando no decorrer do seu desenvolvimento, e se relaciona diretamente ao estágio de maturação da semente, por ocasião da colheita e subseqüente fases de processamento, que incluem despolpamento, degomagem, secagem e armazenamento.

A semente do café apresenta uma maturação heterogênea, o que representa um desafio para os produtores. Segundo Sylvain (1958), o crescimento vegetativo do cafeeiro é complexo, e a periodicidade estacional pode ser atribuída a diversos fatores, tais como a lixiviação de nitrato pelas chuvas, competição dos frutos por fotoassimilados, menor intensidade de luz devido à nebulosidade e baixas temperaturas, entre outros (AMARAL et al., 2006). A manutenção da qualidade fisiológica possibilitaria a germinação e formação de mudas uniformes com qualidade apropriada para a comercialização e o plantio em anos posteriores ao de sua colheita, facilitando dessa forma o planejamento e redução dos custos na implantação de uma nova lavoura (ESTANISLAU, 2002).

Todos estes aspectos fazem parte de um contexto fisiológico e funcional no qual o desenvolvimento e a diferenciação da planta exigem integração de um espectro amplo de sinais específicos dos tecidos, do desenvolvimento e do ambiente na regulação de padrões complexos de expressão gênica (SINGH, 1998). No caso do desenvolvimento do fruto e sementes de cafeeiro, o estabelecimento sistematizado e multidisciplinar de modelos funcionais (DE CASTRO, 1998; DE CASTRO et al., 2000; ESTANISLAU, 2002) constitui ferramenta preliminar essencial, para que os componentes do processo possam ser isolados com precisão e a sua regulação investigada, aproveitando os recursos biotecnológicos hoje existentes para a execução de estudos em nível genômico e de transcriptoma.

Estudos de padrões globais de expressão gênica têm contribuído para identificação de genes individuais ou conjuntos de genes e seus envoltórios em vias metabólicas. Por sua vez o entendimento genético destas vias tem sido fundamental, não só para a compressão dos mecanismos biológicos estudados como também para o desenvolvimento de novas estratégias de manipulação genética (Bruno & WETZEL 2004). Esta tecnologia tem provado ser de grande utilidade também em estudos da fisiologia molecular do desenvolvimento, permitindo a identificação de genes expressos em estágios e condições específicas, tanto em plantas como em animais (TABATA e CABOCHE, 2001).

Uma metodologia alternativa para o isolamento de genes diferencialmente expressos foi desenvolvida por Diatchenko et al., (1996). Este método, denominado Hibridização Subtrativa por Supressão (HSS), baseia-se na amplificação preferencial, pela reação de PCR, de seqüências diferencialmente representadas em duas populações de cDNA. Distintamente de outros métodos de obtenção de genes diferencialmente expressos, que permitem a identificação de pequena quantidade de genes, como o *differential display* (DD), por exemplo, a HSS resulta em uma minibiblioteca enriquecida destes genes, fornecendo amplo material para a comparação de populações de mRNAs. Dada sua eficiência, a HSS vem sendo amplamente empregada na identificação de genes envolvidos em diferentes tipos de câncer e em processos de diferenciação celular. Ainda são poucos os trabalhos na área vegetal que fizeram uso da HSS, entretanto, estes já confirmaram a eficiência desta técnica (BIRCH et al., 1999; DELLAGI et al., 2000; XIAO et al., 2001; XIONG et al., 2001; KÜRKCÜOĞLU et al., 2007).

O presente trabalho tem como objetivo estudar a expressão diferencial dos genes responsáveis pelo processo de maturação de sementes em *C. arabica* e que têm influência na produção e na qualidade do produto final.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA), na Universidade Católica do Salvador (UCSAL), utilizando sementes de café (*C. arabica*) colhidas no campo experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais.

As sementes foram retiradas do freezer -80°C e, em seguida, maceradas diretamente em microtubo de 1,5 mL utilizando um homogeneizador. O tecido pulverizado (150 mg aproximadamente) foi ressuscitado em 700 μL de tampão de extração contendo 8M de hidrocloreto de guanidina, 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 20mM de EDTA (pH 8.0), 50 mM β -mercaptoetanol e água tratada com DEPC (Diethyl-Pyrocabonate). Em seguida foram adicionados 700 μL da mistura Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneizado com auxílio de um vortex e centrifugado a 13000 rpm por 15 min a 4°C . Após centrifugação, a fase superior (~700 μL) foi transferida cuidadosamente para um novo tubo, no qual foi adicionado igual volume da solução de Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado novamente a 13000 rpm por 15 min a 4°C .

Novamente a fase superior (~500 μL) foi recuperada cuidadosamente e transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado com 0.2 volume de Acetato de sódio a 3 M (pH5.2) e 1 volume de Etanol absoluto gelado, incubando os tubos por 2 horas a -80°C . Após esse período, as amostras foram retiradas do ultra-freezer e centrifugadas a 13000 rpm por 10 min a temperatura ambiente; o sobrenadante foi descartado por inversão; os *pellets* foram lavados e centrifugados três vezes com Etanol 70% gelado e uma vez com Etanol absoluto gelado. Após evaporação do excesso de álcool os *pellets* foram ressuscitados em 10 a 40 μL de água tratada com DEPC e os tubos mantidos no gelo até serem congelados e estocados em ultra-freezer (-80°C).

A qualidade e concentração do RNA extraído foram verificadas em gel de agarose/formaldeído a 1%, o qual foi preparado conforme o seguinte protocolo: 0,7 g de agarose livre de RNase foram adicionados a 60 mL de água tratada com DEPC e solubilizados em forno de microondas por aproximadamente 2-3 min. Após resfriamento do gel até $\sim 60^{\circ}\text{C}$, foram adicionados 7 mL de MOPS 10X [0.2 M MOPS (pH 7.0), 20 mM acetato de sódio, 10 mM EDTA (pH 8.0)] e 3,5 mL de Formaldeído 37%, homogeneizado e a solução colocada

rapidamente no suporte do gel para polimerização. A cuba de eletroforese foi previamente tratada com uma solução de álcool 70% e água com DEPC para descontaminação. Feito isso, 200 mL de tampão de corrida (20 mL de MOPS 10X, 180 mL água DEPC) foram adicionados para início da eletroforese.

As amostras (3 uL) foram diluídas em tampão de desnaturação contendo MOPS 10X, Formaldeído 37%, Formamida deionizada e Brometo de Etídio, incubadas a 55°C por 15 min e imediatamente colocadas no gel. Antes de aplicar no gel, 5 uL de tampão de carregamento contendo 50% glicerol, 10 mM de EDTA, 0.25% (w/v) de azul de bromofenol e 0.25% (w/v) de xileno cianol FF foram misturados às amostras.

RESULTADOS

Diversos testes e avaliações de protocolos de extração de RNA tiveram que ser conduzidos até definir aquele que oferecesse a melhor relação custo/benefício para o trabalho a ser desenvolvido. Nessa relação, os fatores mais importantes a serem considerados são a qualidade e a quantidade (concentração) do RNA obtido. Nesse sentido, reagentes e kits comerciais como o *Concert™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen) e o *NucleoSpin® RNA Plant Kit* (BD Biosciences) e alguns protocolos “caseiros” baseados na utilização de tiocianato e hidrocloreto de guanidina foram avaliados.

Após todas essas avaliações, foi definida a utilização do protocolo descrito acima (Material e Métodos) como o mais apropriado para as necessidades nessa primeira fase do projeto. A utilização de 8 M de hidrocloreto de guanidina no tampão de extração se mostrou eficiente na obtenção de RNA a partir dos tecidos da semente testados (embrião e endosperma), porém o tampão 4 M de tiocianato de guanidina apresentou resultados semelhantes. A confirmação dessas eficiências precisa ser obtida em géis de agarose com formaldeído devido às características da molécula de RNA. Na Figura 1 são apresentados os resultados obtidos usando duas amostras de umburana de cheiro (*Amburana cearensis* Fr. All) e cinco amostras de café (*C. arábica*). Os outros protocolos testados não permitiram obter o mesmo sucesso, sendo frequentemente observada a degradação total do RNA extraído ou até mesmo a ausência total de RNA.

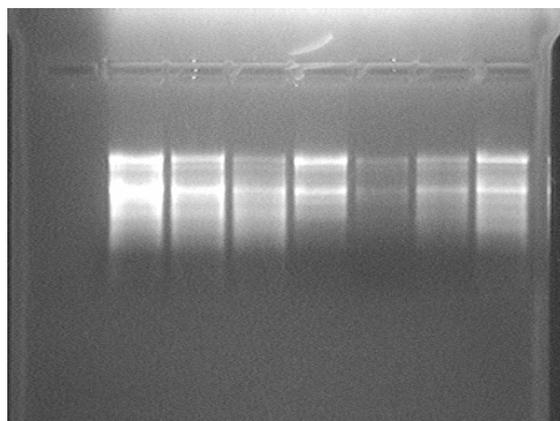


Figura 1: Eletroforese de RNA (LEMA, 2007)

O estudo aqui apresentado se encontra no início da sua segunda fase, onde o RNA total extraído na primeira fase será utilizado na síntese de moléculas de DNA complementar (cDNA) com auxílio de uma transcriptase reversa de origem viral (AMV). Essas moléculas dupla fita

serão posteriormente digeridas com uma enzima de restrição (*RsaI*) e os fragmentos resultantes, uma vez aliquotados, poderão ser ligados ou não a seqüências adaptadoras específicas para obtenção das bibliotecas contrastantes (sub-populações de cDNA), as quais são necessárias na fase seguinte.

Na terceira fase, as sub-populações de cDNA serão submetidas ao processo chamado de hibridização subtrativa, onde as moléculas que são comuns a ambas sub-populações que estão sendo testadas serão desconsideradas e as moléculas decorrentes daqueles genes diferencialmente expressos (hiper ou hipo) serão subtraídas e posteriormente amplificadas pelas reações de PCR subseqüentes. Por esse motivo, este último passo é conhecido como PCR supressivo, já que só permite a amplificação das moléculas representativas dos genes diferencialmente expressos nas populações testadas.

Espera-se que os resultados finais sirvam para desvendar os mecanismos envolvidos no controle da maturação de frutos e sementes de café e, possivelmente, gerar ferramentas biotecnológicas que colaborem para a maior eficácia e rendimento de lavouras.

REFERÊNCIAS

AMARAL, José Augusto Teixeira do; RENA, Alemar Braga; AMARAL, José Francisco Teixeira do. Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro e sua relação com fotoperíodo, frutificação, resistência estomática e fotossíntese. Brasília, Pesq. Agropec. Bras., v.41, n.3, p377-384, 2006.

AMSTALDEN, Leonardo César; LEITE, Flávio; MENEZES, Hilary Castle de. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VOLÁTEIS DE CAFÉ ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO / ESPECTROMETRIA DE MASSAS EMPREGANDO UM AMOSTRADOR AUTOMÁTICO DE "HEADSPACE". Campinas, Ciênc. Tecnol. Alimen, 21(1): 123-128, 2001.

ANDERSSON, A.; KESKITALO, J.; SJODIN, A.; BHALERAO, R.; STERKY, F.; WISSEL, K.; TANDRE, K.; ASPEBORG, H.; MOYLE, R.; OHMIYA, Y. A transcriptional timetable of autumn senescence. Genome Biol. 5: R24, 2004.

BERSHADSKY, A.D.; VASILIEV, J.M. Cytoskeleton. NY, Plenum Press, 1st Edition, 1988.

BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. Plant Cell 9: 1055-66, 1997.

CAIXETA, G.Z.T. Comportamento atual do mercado de café. Informe Agropecuário, v.19, p.9-13, 1998.

BIRCH, P.R.J., AVROVA, A. O., DUNCAN, J. M., LYON, G. D., TOTH. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to the *P. infestans*. Mol. Plant-Microbe Interactions 12: 356-61, nº 4, 1999.

BRUNO, A.K.; WETZEL, C.M. (2004) The early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. J. Exp. Bot. 55: 2541-8.

CASU, R.E.; DIMMOCK, C. M.; CHAPMAN, S.C.; GROF, C. P. L.; MCINTYRE, C. L.; BONNETT, G. D.; MANNERS, J. M. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by *in silico* analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. Australia, Plant Mol. Biol., 2004.

DELLAGI, A.; HELIBRONN, J.; AVROVA, A.O.; MONTESANO, M.; PALVA, E.T.; STEWART, H.E.; TOTH, I.K.; COOKE, D.E.; LYON, G.D.; BIRCH, P.R. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *P. infestans* and is co-regulated with class I endochitinase expression. Mol. Plant- Microbe Interactions 13: 1392-401, 2000.

DERISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science 278: 680-6, 1997.

DE CASTRO, R.D. A functional analysis of cell cycle events in developing and germinating tomato seeds. CIP-Data Koninklijke Bibliotheek, Den Haag, p. 110, 1998.

DE CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W. Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 12: 105-36, 2000.

DIAS, T.C.S.; ALVES, P.L.C.A.; LEMES, L.N. Períodos de interferência de *Commelina benghalensis* na cultura do café recém-plantada. Viçosa, Planta daninha, v.23, n.3, p.397-404, 2005.

FAVARIN, José Laércio; VILLELA, André Luis Gnaccarini; MORAES, Maria Heloisa Duarte; CHAMMA, Helena Maria Carmignani Pescarin; COSTA, José Dias e DOURADO-NETO, Durval. Qualidade da bebida de café de frutos cereja submetidos a diferentes manejos pós-colheita. Brasília, Pesq. Agropec. Bras., v.39, n.2, p.187-192, 2002.

FAVARIN, José Laércio; COSTA, José Dias; NOVENBRE, Ana Dionísia Coelho; FAZUOLI, Luiz Carlos; FAVARIN, Maria da Graça Guilherme Vieira. CARACTERÍSTICAS DA SEMENTE EM RELAÇÃO AO SEU POTENCIAL FISIOLÓGICO E A QUALIDADE DE MUDAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.). Revista Brasileira de Sementes, vol. 25, nº 2, p.13-19, 2003.

GASPARI-PEZZOPANE, Cristiana de; MEDINA-FILHO, Herculane Penna; BORDIGNON, Rita; SIQUEIRA, Walter José; AMBRÓSIO, Luís Alberto; MAZZAFERA, Paulo. MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL. Campinas, Bragantia, v.64, n.1, p.39-50, 2005.

LEITE, Irã Pereira; VILELA, Evódio Ribeiro; CARVALHO, Vânia Déa de. Efeito do armazenamento na composição física e química do grão de café em diferentes processamentos. Brasília. Pesq. agropec. bras., v.31, n.3, p.159-163, 1996.

MALAJOVICH, Maria Antonia. Biotecnologia. Axcel Books do Brasil, p.193, 2004.

MALUF, Mirian Perez; SILVESTRINI, Milene; RUGGIERO, Luciana Machado de Campos; GUERREIRO-FILHO, Oliveira; COLOMBO, Carlos Augusto. GENETIC DIVERSITY OF CULTIVATED *Coffea arabica* INBRED LINES ASSESSED BY RAPD, AFLP AND SSR MARKER SYSTEMS. Piracicaba, Sci. Agric., v.62, n.4, p.366-373, 2005.

MAZZAFERA, Paulo; GONÇALVES, Kátia Viviane; SHIMIZU, Milton Massao. EXTRAÇÃO E DOSAGEM DA ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE DO CAFÉ. *Scientia Agrícola*, v.59, n.4, p.695-700, 2002.

SYLVAIN, P.G. El ciclo de crecimiento de *Coffea arabica*. Turrialba: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, 1958. 17p.

VIEIRA, Antônio Rodrigues; OLIVEIRA, João Almir; GUIMARÃES, Renato Mendes; PEREIRA, Carlos Eduardo; CARVALHO, Fernanda Elisa de. ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE CAFEEIRO: AMBIENTES E MÉTODOS DE SECAGEM. *Revista brasileira de sementes*, vol.29, nº1, p.76-82, 2007.

VIEIRA, Luiz Gonzaga Esteves; ANDRADE, Alan Carvalho; COLOMBO, Carlos Augusto; MORAES, Ana Heloneida de Araújo; METHA, Ângela; OLIVEIRA, Angélica Carvalho de; LABATE, Carlos Alberto; MARINO, Celso Luís; MONTEIRO-VITORELLO, Cláudia de Barros; MONTE, Damares de Castro; GIGLIOTI, Éder; KIMURA, Edna Teruko; ROMANO, Eduardo; KURAMAE, Eiko Eurya; LEMOS, Eliana Gertrudes Macedo; ALMEIDA, Elionor Rita Pereira de; JORGE, Érika C.; ALBUQUERQUE, Érika V. S.; SILVA, Felipe Rodrigues da; VINECKY, Felipe; SAWAZAKI, Haiko Enok; DORRY, Hamza Fahmi A.; CARRER, Helaine; ABREU, Ilka Nacif; BATISTA, João A. N.; TEIXEIRA, João Batista; KITAJIMA, João Paulo; XAVIER, Karem Guimarães; LIMA, Liziane Maria de; CAMARGO, Luis Eduardo Aranha de; PEREIRA, Luiz Filipe Protasio; COUTINHO, Luis Lehmann; LEMOS; Manoel Victor Franco; ROMANO, Marcelo Ribeiro; MACHADO, Marcos Antonio; COSTA, Marcos Mota do Carmo; SÁ, Maria Fátima Grossi de; GOLDMAN, Maria Helena S. ; FERRO, Maria Inês T.; TINOCO, Maria Laine Penha; OLIVEIRA, Mariana C.; SLUYS, Marie-Anne Van; SHIMIZU, Milton Massao; MALUF, Mirian Perez; EIRA, Mirian Therezinha Souza da; GUERREIRO-FILHO, Oliveira; ARRUDA, Paulo; MAZZAFERA, Paulo; MARIANI, Pilar Drummond Sampaio Correa; OLIVEIRA, Regina L.B.C. de; HARAKAWA, Ricardo; BALBAO, Silvia Filippi; TSAI, Siu Mui; MAURO, Sonia Marli Zingaretti di; SANTOS, Suzana Neiva; SIQUEIRA, Walter José; COSTA, Gustavo Gilson Lacerda; FORMIGHIERI, Eduardo Fernandes; CARAZZOLE, Marcelo Falsarella; PEREIRA; Gonçalo Amarante Guimarães. Brazilian coffea genome Project: an EST-based genomic resource. *Plant Physiol.* 18(1):95-108,2006.

ESTANISLAU, W.T. Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil, 2002.

HARADA, J.J. Seed maturation and control of germination. In: *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. Edited by Larkins BA, Vasil IK. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 545-592, 1997.

HILHORST, H.W.; GROOT, S.P.; BINO, R.J. The tomato seed as a model system to study seed development and germination. *Acta Bot. Neerl.* 47: 169-83, 1998.

HU, X.; BIDNEY, D. L.; YALPANI, N.; DUVICK, J. P.; CRASTA, O.; FOLKERTS, O.; LU, G. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.* 133: 170-81, 2003.

KEHOE, D.M.; VILLAND, P.; SOMERVILLE, S. DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. *Trends in Plant Sci.* 4: 38-41, 1999.

KOORNNEEF, M., ALONSO-BLANCO, C.; BLANKESTIJN-DE VRIES, H.; HANHART, C. J.; PEETERS, A. J. M. Genetic interactions among late flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 148: 1-9, 1998.

KÜRKCÜOĞLU, S.; DEGENHARDT, J.; LENSING, J.; AL-MASRI, A. N.; GAU, A. E. Identification of differentially expressed genes in *Malus domestica* after application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the phyllosphere. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 3, pp. 733–741, 2007.

LOCKART, D.J.; WINZELER, E.A. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827-36, 2000.

PIÑEIRO, M.; COUPLAND, G. The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 11: 1-8, 1998.

RAGHAVAN, V. *Molecular Embryology of Flowering Plants*. First Edition. Cambridge University Press, New York, 1997.

SEKI, M.; NARUSAKA M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI K. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61-72, 2001.

SINGH, K.B. Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* 118: 1111-20, 1998.

TABATA, S.; CABOCHE, M. Genome studies and molecular genetics. We know the sequence, how do we identify the function? *Cur. Opinion in Plant Biol.* 4: 103-4, 2001.

WELLER, J. L.; REID, J. B.; TAYLOR, S. A.; MURFET, I.C. The genetic control of flowering in pea. *Trends in Plant Sci.* 2: 412-8, 1997.

XIAO, F.; TANG, X.; ZHOU, J.-M. Expression of 35::Pto globally activates defense-related genes in tomato plants. *Plant Physiol.* 126: 1637-45, 2001.

XIONG, L.; LEE, M.; QI, M.; YANG, Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 14: 685-92, 2001.

XUHAN, X. *Seed Development in Phaseolus vulgaris L., Populus nigra L., and Ranunculus sceleratus L. with Special Reference to the Microtubular Cytoskeleton*. Tese de Doutorado, Wageningen Agric. Univ., Wageningen, The Netherlands, 1995.

DE CASTRO, R.D. *A Functional Analysis of Cell Cycle Events in Developing and Germinating Tomato Seeds*. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia de Sementes), p.110 Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1998.

WENT, F. W. The experimental control of plant growth. In: AN INTERNATIONAL BIOLOGICAL AND AGRICULTURAL SERIES, *Chronica Botanica*. 17., New York, USA: The Ronald, p. 164-168, 1957.