



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IRIS TISKI

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DE GENES DAS
VIAS DE BIOSÍNTESE DE ISOPRENÓIDES EM *COFFEA*
SPP.**

Londrina
2007

IRIS TISKI

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DE GENES DAS
VIAS DE BIOSÍNTESE DE ISOPRENÓIDES EM *COFFEA*
SPP.**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Biotecnologia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito à
obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Luiz Filipe Protásio Pereira
Co-Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Estevez
Vieira

Londrina
2007

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T613c Tiski, Iris.

Caracterização *in silico* e *in vivo* de genes das vias de biossíntese de isoprenóides em *Coffea* spp. / Iris Tiski. – Londrina, 2007.
78f. : il.

Orientador: Luiz Filipe Protásio Pereira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2007.

Inclui bibliografia.

1. *Coffea* – Teses. 2. Isoprenóides – Teses. 3. MEP – Teses. 4. MVA Teses. I. Pereira, Luiz Filipe Protásio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em B. III. Título.

CDU 663.8/9

IRIS TISKI

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DE GENES DAS VIAS DE
BIOSSÍNTESE DE ISOPRENÓIDES EM *COFFEA* SPP.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Filipe Protásio Pereira
Embrapa Café/lapar

Dr. David Pot
Cirad – França

Dr. José Eduardo Garcia
UEL – Londrina – PR

Londrina, 20 de abril de 2007.

AGRADECIMENTOS

A Deus que está acima de todas as coisas.

Aos meus pais, Dimas Tiski e Aparecida Tiski pelo amor, carinho, dedicação e apoio.

A minha irmã Maíra, pelas horas compartilhadas, amizade e companheirismo.

Aos meus queridos avós que foram exemplo de vida e dedicação.

Ao Dr. Luiz Felipe e Dr. Luiz Gonzaga pela orientação e conhecimento compartilhado que se mostram preciosos desde a graduação.

Aos companheiros e amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal do Iapar.

A minhas amigas de apartamento, Priscila, Elizângela e Eloísa que fizeram que esta etapa fosse mais facilmente vencida.

As minhas amigas Caryna e Solange pelos momentos de descontração.

TISKI, Iris – **Caracterização *in silico* e *in vivo* de genes das vias de biossíntese de isoprenóides em *Coffea* SPP.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Os diterpenos cafestol e caveol, presentes na fração lipídica em grãos de café, originam-se da via de síntese de isoprenóides. Em vegetais superiores, duas vias localizadas em compartimentos intracelulares separados estão envolvidas na biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e do isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). No citosol IPP é derivado da via do ácido mevalônico (MVA), e no plastídeo é formado pela via do metileritritol fosfato (MEP). Visando estudar os genes envolvidos na biossíntese dos isoprenóides, foram realizadas buscas por palavras-chave no banco de dados do Projeto Genoma Café e analisadas as seqüências dos genes 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA redutase (*HMGR*) e mevalonato difosfato decarboxilase (*MPDC*) para a via MVA e 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase (*DXR*) e isopentenil difosfato sintase (*IDS*) para a via MEP. O número de isoformas dos genes analisados, *DXR*, *IDS* e *HMGR* de *Coffea* são os mesmos relatados para *Arabidopsis thaliana*, com exceção de *MPDC*. A seqüência completa de *MPDC* só foi possível após clusterização das seqüências de *MPDC* do banco do Projeto Genoma Café com as seqüências do banco HarvEST. As análises de expressão por Northern blot em diferentes fases de desenvolvimento do fruto, folha jovem e expandida exposta à luz, botão floral jovem e maduro, ramo e raiz de *C. arabica* detectaram principalmente transcritos de *DXR* no início do desenvolvimento de perisperma, em botão floral e folhas expostas à luz. Transcritos da isoforma *CaHMGR1* foram observados em polpa e na fase inicial de desenvolvimento de perisperma e endosperma, assim como em botão floral e folhas expostas à luz. Para *CaHMGR2* foram observados transcritos em todos os tecidos analisados e em todas as fases de desenvolvimento do fruto. Os resultados sugerem expressão constitutiva da isoforma *CaHMGR2*, enquanto a isoforma *CaHMGR1* teria indução específica. O gene *DXR* apresentou maior transcrição que *HMGR* tanto através das análises obtidas *in silico* com *in vivo*. A análise *in silico* permitiu uma adequada predição do número de isoformas e da atividade dos genes estudados, no entanto é necessário a confirmação desses resultados *in vivo*, como demonstrado para os genes de *HMGR*.

Palavras-chave: *Coffea*. Isoprenoides. MEP. MVA.

TISKI, Iris. ***In silico* and *in vivo* analysis of genes from the isoprenoids biosynthesis pathway in *Coffea* SPP.** 2007. 78 f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The diterpenes khaweol and cafestol, which are present in the coffee lipid fraction, are originated from the isoprenoid pathway. In higher plants, there are two independent pathways located in the cytosol (mevalonic acid or MVA pathway) and in the plastids (methylerythritol phosphate – MEP pathway). Throughout the data mining of the Brazilian Coffee Genome Project we studied the genes that code for the enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) and mevalonate diphosphate decarboxylase (MPDC) for the MVA pathway and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) and isopentenyl diphosphate/dimethylallyl diphosphate synthase (IDS) for the MEP pathway. The number of isoforms of the genes datamined was the same reported for *Arabidopsis thaliana*, with the exception for the *MPDC* that has two isoforms in *A. thaliana*. Northern blots analysis in different tissues of coffee fruits during maturation, as well as in buds, roots, shoots and leaves detected transcripts of *DXR* in the initial development of perisperm, flower buds and leaf. Analysis of two *HMGR* isoforms showed transcription of *CaHMGR2* in all tissues and fruit development stages analysed. Meanwhile, *CaHMGR1* was observed in pulp, at the initial stages of perisperm and endosperm, and similar do *DXR*, in flower buds and leaf. Those results suggest a constitutive expression of isoform *CaHMGR2*, while the isoform *CaHMGR1* would have specific induction. The *in silico* analysis was able to predict most of the number of isoforms and gene activity, but *in vivo* experiments to confirm the *in silico* data are necessary.

Keywords: *Coffea*. Isoprenoids. MEP. MVA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Via de síntese de isoprenóides	20
Figura 2	–	Fórmula estrutural cafestol, caveol e 16-O-metilcafestol	24
Figura 3	–	Dendograma filogenético de <i>IDS</i>	37
Figura 4	–	Clusterização dos contigs 13239, 2777 e 3173	38
Figura 5	–	Clusterização dos contigs 11965 e 7547	40
Figura 6	–	Dendograma filogenético de <i>MPDC</i>	40
Figura 7	–	Dendograma de <i>MPDC</i> de <i>Coffea</i> e <i>A. thaliana</i>	40
Figura 8	–	Clusterização dos contigs 1357 11695, 7547 e singlet EA1- 009-C09	41
Figura 9	–	Clusterização dos contigs 1503 e 10351	42
Figura 10	–	Dendograma filogenético de <i>DXR</i>	44
Figura 11	–	Clusterização dos contig 1503 e contig 1017.....	44
Figura 12	–	Clusterização dos singletons CA-FB2-069 e CA-FB2-011	46
Figura 13	–	Dendograma filogenético de <i>HMGR</i>	47
Figura 14	–	Clusterização dos contig 000, 5087 e singlet 13713	49
Figura 15	–	Clusterização do contig 6175 e singlet 11805	49
Figura 16	–	Southern blot com <i>DXR</i>	51
Figura 17	–	Seqüência de <i>A. thaliana</i> e de <i>Coffea</i> para análise do Southern Blot.....	51
Figura 18	–	Northern blot de polpa, perisperma e endosperma com <i>DXR</i>	52
Figura 19	–	Northern blot de diferentes tecidos de <i>Coffea</i> com <i>DXR</i>	52
Figura 20	–	Amplificação das isoformas de <i>HMGR</i> de café	53
Figura 21	–	Southern Blot com <i>CaHMGR1</i>	54
Figura 22	–	Northern Blot com polpa, perisperma e endosperma e <i>HMGR</i>	55
Figura 23	–	Northern Blot com diferentes tecidos de <i>Coffea</i> e <i>HMGR</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Principais lipídios em grãos de café	17
Tabela 2	– Genes amplificados por PCR e tamanho esperado dos fragmentos	32
Tabela 3	– Seqüências expressas de <i>IDS</i>	36
Tabela 4	– Clusterização das seqüências de <i>IDS</i> na plataforma HarvEST	37
Tabela 5	– Comparação entre contigs de <i>IDS</i>	38
Tabela 6	– Seqüências expressas do gene <i>MPDC</i>	38
Tabela 7	– Clusterização das seqüências de <i>MPDC</i> na plataforma HarvEST	41
Tabela 8	– Comparação entre contigs de <i>MPDC</i>	41
Tabela 9	– Seqüência genômica expressa de <i>DXR</i>	42
Tabela 10	– Análise das seqüências de <i>DXR</i> na plataforma HarvEST.....	44
Tabela 11	– Seqüência genômica expressa de <i>HMGR</i>	45
Tabela 12	– Análise das seqüências de <i>HMGR</i> na plataforma HarvEST	48
Tabela 13	– Comparação dos contigs de <i>HMGR</i>	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	adenosina trifosfato
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DXS	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase
DXR	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase
IDS	isopentenil difosfato sintase
MEP	via metileritritol 4-fosfato
MOPS	ácido 3 (N-morfolino) propanossulfônico
MPDC	mevalonato difosfato decarboxilase
MVA	via do ácido mevalônico
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PCR	reação em cadeia da polimerase
PVP	polivinilpirrolidona
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	ribonuclease
SDS	dodecil sulfato de sódio
TRIS	tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	HISTÓRICO	13
3.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	14
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES E VARIEDADES DE CAFÉ	14
3.4	LIPÍDEOS DO CAFÉ	16
3.5	ÁCIDOS GRAXOS DO CAFÉ.....	17
3.6	SÍNTESE DE ISOPRENÓIDES	18
3.7	DITERPENOS DE CAFÉ	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS GENES <i>DXR</i> , <i>IDS</i> (VIA <i>MEP</i>), <i>HMGR</i> E <i>MPDC</i> (VIA <i>MVA</i>).....	28
4.1.1	Busca dos Genes <i>DXR</i> , <i>IDS</i> , <i>HMGR</i> e <i>MPDC</i>	28
4.2	ANÁLISE MOLECULAR DE <i>DXR</i> E <i>HMGR</i>	29
4.2.1	Material Vegetal.....	29
4.2.2	Extração de DNA.....	29
4.2.3	Extração de RNA.....	30
4.2.4	Obtenção de cDNA.....	31
4.2.5	Amplificação dos Genes <i>DXR</i> e <i>HMGR</i>	32
4.2.6	Sequenciamento das Sondas.....	33
4.2.7	Caracterização dos Genes por Southern Blot	34
4.2.8	Análise da Expressão dos Genes por Northern Blot.....	35
5	RESULTADOS	36
5.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DE <i>DXR</i> , <i>HMGR</i> , <i>IDS</i> E <i>MPDC</i>	36
5.1.1	Análise <i>in silico</i> de <i>IDS</i>	36

5.1.2	Análise <i>in silico</i> de <i>MPDC</i>	38
5.1.3	Análise <i>in silico</i> de <i>DXR</i>	41
5.1.4	Análise <i>in silico</i> de <i>HMGR</i>	45
5.2	ANÁLISE MOLECULAR DE <i>DXR</i> E <i>HMGR</i>	49
5.2.1	Sequenciamento das Sondas.....	49
5.2.2	Análise Molecular de <i>DXR</i>	50
5.2.2.1	Análise de <i>DXR</i> por Southern blot.....	50
5.2.2.2	Análise de <i>DXR</i> por Northern blot	51
5.2.3	Análise Molecular de <i>HMGR</i>	53
5.2.3.1	Seqüências amplificadas de <i>HMGR</i>	53
5.2.3.2	Análise de <i>HMGR</i> por Southern Blot.....	54
5.2.3.3	Análise da expressão de <i>HMGR</i> por Northern Blot	54
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	61
8	PERSPECTIVAS	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	71
ANEXO A –	Artigo a ser submetido á Brazilian Archives of Biology an Techonology	72
ANEXO B –	Normas para submissão do artigo	77

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a posição de maior produtor, exportador e o segundo maior consumidor de café do mundo. A produção comercial é baseada principalmente em duas espécies, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que representam aproximadamente 70% e 30% do mercado total de café (VIEIRA et al., 2006).

A qualidade é um dos aspectos mais importantes para o mercado consumidor de café. Entretanto, o conhecimento sobre vários componentes que afetam o aroma e sabor do café, como os lipídeos, ainda é escasso. Cerca de dez a vinte por cento da fração lipídica do café corresponde a diterpenos que além da provável relação com a qualidade também são considerados anticancerígenos. Os principais diterpenos em café são cafestol ($C_{20}H_{28}O_3$) e caveol ($C_{20}H_{26}O_3$) (SPEER; KOLLING-SPEER, 2001). A concentração destes diterpenos pode variar de acordo com a espécie analisada (ROSS et al., 1997). A produção de diterpenos ocorre a partir dos isoprenóides que são sintetizados pela via biossintética do mevalonato (MVA) no citossol ou pela via independente do mevalonato – metileritritol 4-fosfato (MEP) nos plastídeos (TAIZ; ZEIGER, 2002). Com a disponibilização das seqüências dos genes expressos (ESTs) pelo Projeto Genoma Café, tornou-se possível a identificação *in silico* e estudo funcional dos genes envolvidos nas vias metabólicas de isoprenóides e na formação de diterpenos. Visando um entendimento maior da síntese de diterpenos de café, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão *in silico* e *in vivo* de genes das vias de biossintese de isoprenóides.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e identificar os genes das vias biossintéticas de isoprenóides em cafeeiro e verificar sua relação com a síntese de diterpenos (cafestol e caveol).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar *in silico* os principais genes das vias metabólicas MEP e MVA;
- Analisar a expressão de genes envolvidos nas vias MEP e MVA;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO

A espécie *C. arabica* é originária da Etiópia, África, entretanto foram os árabes os responsáveis pela propagação do cultivo e consumo do café. Os manuscritos mais antigos mencionando a cultura do café datam de 575 (d.c.) no Yêmen, onde, consumido como fruto *in natura*, passou a ser cultivado. O café foi de grande importância para os árabes, que tinham completo controle sobre o cultivo e preparação da bebida. Era proibido que estrangeiros se aproximassem das plantações, e os árabes protegiam extremamente as mudas.

O café chegou a Europa em 1615, levado por viajantes oriundos do oriente. A produção da planta, no entanto, só foi possível alguns anos depois. Mas, foram os holandeses que conseguiram as primeiras mudas, em 1658, cultivadas em Java na Indonésia. De lá, transplantaram um arbusto nas estufas do jardim botânico de Amsterdã. A bem-sucedida experiência holandesa estimulou outros países a investirem em cafezais. O crescente mercado consumidor europeu propiciou a expansão do plantio de café em países africanos e a sua chegada ao Novo Mundo. Pelas mãos dos colonizadores europeus, o café chegou ao Suriname, São Domingos, Cuba, Porto Rico e Guianas. Foi por meio das Guianas em 1727 que o café chegou ao norte do Brasil. Devido às favoráveis condições climáticas, o cultivo de café se espalhou rapidamente, com produção voltada para o mercado doméstico. Em sua trajetória pelo Brasil o café passou pelo Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Num espaço de tempo relativamente curto, o café passou de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira. Desenvolveu-se com total independência, ou seja, apenas com recursos nacionais, sendo considerada, a primeira realização exclusivamente brasileira que visou a produção de riquezas. Por quase um século, o café foi a grande riqueza brasileira, e as divisas geradas pela economia cafeeira aceleraram o desenvolvimento do Brasil e o inseriram nas relações internacionais de comércio.

3.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Atualmente, o café enquanto produto do agronegócio mundial movimenta recursos anuais de cerca de 91 bilhões de dólares e emprega meio bilhão de pessoas. Seu cultivo, processamento, comercialização e transporte têm um importante papel na economia e no mercado de trabalho de países em desenvolvimento.

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo seguido pelo Vietnã e a Colômbia (EMBRAPA CAFÉ, 2005). A cafeicultura é responsável por cerca de 6% das exportações nacionais, envolvendo dois milhões de empregos diretos (EMBRAPA CAFÉ, 2005). O estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro, com 49,84% da produção nacional, seguido do Espírito Santo com 26%, São Paulo com 10,25% e Rondônia com 5,54%. Bahia e Paraná ocupam a quinta e a sexta colocação, com uma produção de 5,36% e 4,53% respectivamente (CAFÉ DO PARANÁ, 2005).

O café é uma importante fonte de renda para a economia brasileira, pela sua participação na receita cambial, pela transferência de renda aos outros setores da economia, pela contribuição à formação de capital no setor agrícola do país, além da expressiva capacidade de absorção de mão-de-obra.

No Paraná, apesar das transformações ocorridas na cafeicultura brasileira a partir dos anos 70, o café ainda constitui uma importante atividade agrícola para geração de renda e emprego, sendo cultivado nas regiões do Norte Pioneiro, Norte, Noroeste e Oeste.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES E VARIEDADES DE CAFÉ

Café é uma planta arbustiva, do gênero *Coffea*, pertencente à família Rubiaceae (KEMSLEY et al., 1995), com algumas espécies chegando a atingir até 12 metros de altura em seu estado nativo. Este gênero apresenta aproximadamente 100 espécies, das quais cinco, são cultivadas comercialmente (CARVALHO et al.,

2001). As mais importantes são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que correspondem a cerca 70% e 30% da produção mundial.

A espécie *C. arabica* é uma planta de clima tropical úmido, de temperaturas amenas, que encontra no Brasil extensas áreas apropriadas para seu cultivo (THOMAZIELLO et al., 1996). Essa espécie se originou na Etiópia, a partir da hibridização natural entre duas espécies ancestrais diplóide, *Coffea eugenoides* ($2n = 2x = 22$ cromossomos) e *C. canephora* ($2n = 2x = 22$ cromossomos) (LASHERMES et al., 1997). No híbrido resultante teria havido uma duplicação do número de cromátides de todos os cromossomos ao invés de migrarem cada uma delas para ambas as células-filhas, teriam permanecido na mesma célula. Deste modo, originou-se uma nova espécie tetraplóide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) (ANTONY et al., 2002).

A *C. canephora* é originário da África Central. É uma planta de clima tropical, sendo bastante cultivado por sua resistência a variações climáticas. Apresenta grande aceitação no mercado industrial norte-americano e europeu por ser utilizado na fabricação de café solúvel. O *C. canephora* também é usada para enxertar plantas de *C. arabica*.

As espécies *C. arabica* e *C. canephora*, apresentam distinções quanto à preço, qualidade e aceitabilidade, produzindo bebidas com características diferentes (CARVALHO et al., 2001). A espécie *C. arabica* possui aroma intenso e os mais diversos sabores, com inúmeras variações de corpo e acidez, e por isso tem maior valor de mercado (MENDES, 1999). A *C. canephora*, por possuir características sensoriais próprias, produz bebida classificada como de “sabor único”, considerado tecnicamente de qualidade inferior por provadores treinados. Tem acidez baixa sendo utilizado para a fabricação de cafés solúveis por apresentar elevado teor de sólidos solúveis (CARVALHO et al., 2001; SOUZA et al., 2004).

Os grãos crus das duas espécies podem ser distinguidos facilmente: o de *C. arabica* é verde claro e de forma ovalar, levemente azedo, de superfície lisa e intenso aroma e com gosto mais picante e adstringente (ALVES et al., 2006). Entretanto, estes indicadores são eliminados nos processos de torra e moagem, requisitando métodos alternativos de diferenciação (KEMSLEY et al., 1995). O grão de *C. arabica* apresenta maiores concentrações de carboidratos, lipídios e proteínas, comparado a *C. canephora*, que exhibe teores mais elevados de compostos fenólicos e de cafeína (LOPES, 2000). Em *C. arabica*, a soma das quantidades de cafeína,

trigonelina, ácidos clorogênicos totais (ACGs) e sacarose representa 16% em média de matéria seca, enquanto que em *C. canephora* o teor destes componentes chega a 20% (KY et al., 2001). Fernandes *et al.* (2005) estudaram a composição química das diferentes safras cultivadas no Brasil. Constatou-se que o *C. arabica* apresenta maior teor de proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e maior pH. Não houve diferença significativa para os teores do resíduo mineral fixo e acidez titulável total entre as espécies estudadas.

3.4 LIPÍDEOS DO CAFÉ

Os lipídeos de café desempenham papel importante na qualidade da bebida e do aroma, principalmente devido à hidrólise de triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos que são em seguida oxidados (SPEER et al., 1993a). Os lipídios possuem grande importância comercial, são largamente empregados na aromatização de café solúvel (CLARKE, 1985), no entanto, têm sido pouco estudados.

A quantidade total de lipídeos encontra-se ao redor de 12% da massa seca em grãos de café. No entanto, esses valores podem apresentar variação dependendo da espécie e variedade. Por exemplo, para *C. liberica* a quantidade de lipídeos corresponde de 8-9% da massa seca e *C. salvatrix* a 30% (MAZZAFERA et al., 1998). O teor de lipídios (extração com éter de petróleo e/ou hexano) de *C. arabica* é de aproximadamente 11%, podendo chegar a 15% após o processo de torra, devido à degradação de carboidratos e perda de compostos voláteis. Para *C. canephora*, a concentração é de 6% antes e de 10% depois da torra. Além dos triacilgliceróis (75% dos lipídios) e dos ésteres dos ácidos graxos diterpênicos (20% dos lipídios), observa-se quantidade considerável de outros componentes lipídicos específicos, como apresentado na tabela 1 (LAGO, 2001). Condições de cultivo e fatores climáticos também parecem influenciar a composição dos lipídeos em grãos de café (SPEER et al., 1993a). Neste sentido, foi demonstrado que a temperatura influencia a relação de ácidos graxos saturados e insaturados em folhas de café, com um aumento global da porcentagem de linoléico (18:2) e ácido linolênico (18:3) acompanhado por uma diminuição de palmítico (16:0)

e palmitoleico (16:1) em plantas submetidas ao estresse ao frio (CAMPOS et al., 2003). Existe uma correlação inversa entre a altitude/temperatura e conteúdo de matéria graxa (GUYOT et al., 1996; DECAZY et al., 2003). Lipídeos são importantes para estabilizar a estrutura de membranas. Foram demonstradas correlações entre a composição de lipídeos em membrana de mitocôndria e a sensibilidade ao frio (LYONS et al., 1964). Plantas com membranas apresentando alta proporção de ácidos graxos não saturados em relação aos saturados foram mais resistentes ao resfriamento.

Baseado nestas informações, o aumento do conhecimento sobre o metabolismo de lipídeos em café poderia ser vantajoso para modificar o conteúdo de óleo nos grãos através de melhoramento convencional ou de transformação genética, aumentando o valor agregado do café através da modificação da sua fração lipídica em diferentes maneiras (TURATTI, 2001) e também possibilitando uma tolerância maior a estresses abióticos, como geadas.

Tabela 1 – Principais lipídios em grãos de café. AGL=ácidos graxos livres; DG=diacilgliceróis; AD=álcoois diterpênicos; TG=triacilgliceróis; E=outros ésteres; tr=quantidade traço, nas condições utilizadas. Resultados expressos em % em relação a quantidade total de lipídeos.

Classes	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>	
	Cru	Torrado	Cru	Torrado
AGL	0,95	0,72	0,98	0,09
Não-identificados	0,53	0,86	Tr	Tr
Esteróis	0,06	0,06	Tr	Tr
DG + AD	15,46	14,15	7,04	10,95
TG + E	83	84,21	91,98	88,95

Fonte: Lago (2001).

3.5 ÁCIDOS GRAXOS DO CAFÉ

Ácidos graxos representam 75% do óleo de café (SPEER; KOLLING-SPEER, 2001). Estão principalmente presentes na forma esterificada em glicerol para formar triacilgliceróis (75% dos ácidos graxos) ou outros componentes relacionados como digalactosídeo diacilglicerol. Finalmente 10 a 20% dos ácidos

graxos são encontrados em diterpenos esterificados, uma pequena fração (2%) é encontrada em ésteres de esteróis e uma menor porcentagem na forma de ácidos graxos livres (PICARD et al., 1984).

Existe uma variação muito grande entre as espécies de café em relação às proporções relativas dos quatro principais ácidos graxos em café verde (palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), e linoléico (18:2)) (DUSSERT et al., 2001). Os ácidos graxos encontrados na fração triacilglicerólica dos grãos de café verde são principalmente linoléico (30-50%), palmítico (16-38%), oléico (7-18%) e esteárico (4-10%). Comparando as espécies de *Coffea*, nota-se que *C. arabica* contém mais oléico que *C. canephora*, 52-54%, comparado com 43-49%, respectivamente (SPEER et al., 1993b). Porém, *C. canephora* contém mais esteárico do que *C. arabica*, 9-14% e 6-8%, respectivamente. Esta é uma característica que pode ser usada para dar uma primeira indicação da presença de *C. canephora* em misturas de café (SPEER et al., 1993b; SPEER; KOLLING-SPEER, 2001).

O teor de matéria insaponificável em óleos vegetais é em geral, ao redor de 1%. No óleo de café este valor é anormalmente alto, podendo chegar a 12% (KHAN; BROWN, 1953). Os principais constituintes do material insaponificável são dois álcoois diterpênicos, cafestol e caveol que ocorrem na forma livre ou como monoésteres de ácidos graxos (LAGO, 2001). O conteúdo total de diterpenos é de 1.3% e 1.9% (w/w) em grãos verdes de *C. arabica* e 0,2% e 1,5% em grãos de *C. canephora* (RATNAYAKE et al., 1993).

3.6 SÍNTESE DE ISOPRENÓIDES

Plantas sintetizam uma enorme variedade de metabólitos que podem ser classificados em dois grupos: metabólitos primários, com participação em processos essenciais do metabolismo da planta e metabólitos secundários com participação ativa em importantes funções ecológicas da planta (CROTEAU et al., 2000).

Isoprenóides também chamados terpenóides, são sintetizados em todos os organismos, no entanto, são principalmente abundantes em plantas, com cerca de 10 mil componentes relatados (CHAPPELL, 1995, 2002; MC GAVEY;

CROTEAU, 1995; CROTEAU et al., 2000). Muitos isoprenóides presentes em plantas são metabólitos primários com papel na respiração, fotossíntese, crescimento e desenvolvimento. Contudo, a maioria dos isoprenóides são metabólitos secundários, que atuam tanto na proteção de plantas contra herbívoros e patógenos microbianos, como na atração para agentes polinizadores (CROTEAU et al., 2000; CHAPPELL, 2002).

Sob ótimas condições de crescimento, as plantas usam a maioria da energia que absorvem durante a fotossíntese e assim outros mecanismos de fotoproteção não são necessários. Contudo, quando as plantas são expostas a condições ambientais adversas, (temperaturas extremas, déficit de nutrientes, poluentes no ar ou ataque de patógenos) particularmente combinado com alta intensidade de luz, a situação é o inverso: a fotossíntese é reduzida e mecanismos de fotoproteção são necessários para permitir a segura dissipação do excesso de energia. As plantas apresentam diversos mecanismos para livrar-se do excesso de energia, alguns envolvidos com a síntese de isoprenóides (PENUELAS; MUNNÉ-BOSCH, 2005). Portanto, cada molécula de isoprenóide apresenta características distintas e sua ação é em função de sua estrutura molecular. A dupla ligação, presente em todos os componentes isoprenóides, é requerida para a desativação física de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por exemplo, a dupla ligação conjugada da estrutura do isopreno pode extinguir oxigênio singlet, por facilitar a transferência de energia e dissipação de calor (VELIKOVA, 2004).

Apesar da diversidade de funções e estruturas todos os isoprenóides derivam de cinco átomos de carbonos comuns (C_5), o isopentenil difosfato (IPP) e do isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), também chamada de unidade isopreno (RODRIGUEZ; BORONAT, 2002). Muitos isoprenóides complexos são usualmente formados por adição de unidades de isopreno. Monoterpenos são isoprenóides C_{10} que consistem de duas unidades de isoprenos e são componentes de essência de flores e ervas. Os isoprenóides que derivam de três unidades isopreno são C_{15} sesquiterpenos, que pode ser encontrado em óleos essenciais (CROTEAU et al., 2000). Os diterpenos possuem vinte carbonos (quatro unidades C_5), incluem fitol, as giberilinas, fitoalexinas e um grande número de metabólitos farmacológicos importantes como, por exemplo, agentes anti-cancerígenos e compostos usados no tratamento de glaucoma (CROTEAU et al., 2000). Os triterpenos (C_{30}) são semelhantes a fitosteróis, brassinoesteróis e algumas fitoalexinas, toxinas e ceras,

são gerados pela união de duas cadeias C_{15} . Os tetraterpenos (C_{40}) são carotenóides, pigmentos em muitas flores e frutos, contribuem com a absorção de luz e protegem o aparato fotossintético de fotooxidação (MC GARVEY; CROTEAU et al., 2000).

A biossíntese de isoprenóides pode ser dividida em quatro fases. A fase I inclui a formação do isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalildifosfato (DMAPP). Em vegetais superiores, duas vias independentes localizadas em compartimentos intracelulares separados estão envolvidas na biossíntese de IPP e DMAPP (Figura 1). No citossol, IPP é derivado da via clássica do ácido mevalônico (MVA), ela se inicia com a condensação de Acetil-CoA (QURESHI; PORTER, 1981; NEWMAN; CHAPPELL, 1999). No entanto, no plastídeo, IPP é formado a partir de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato pela via do metileritritol fosfato (MEP ou não-mevalonato) (EISENREICH, et al., 1998; ROHMER, 1999). Estudos indicam que a via citossólica atua como precursora de farnesil difosfato (FPP, C_{15}), sesquiterpenos e triterpenos e a via plastídica de IPP atua como precursora de geranyl difosfato (GPP, C_{10}), geranylgeranyl difosfato (GGPP, C_{20}), monoterpênos, diterpenos e tetraterpenos (LANGE ; GHASSEMIAN, 2003).

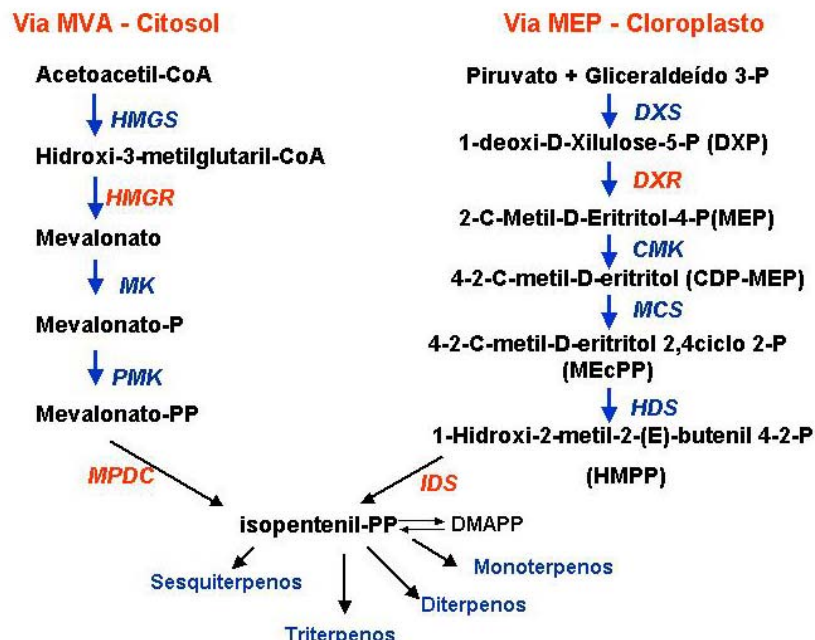


Figura 1 – Via plastídica (MEP) e citossólica (MVA) de síntese de isoprenóides.

Fonte: modificado de Laule et al. (2003).

A enzima chave para via MVA ou citosólica em plantas foi identificada como a 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (HMGR). Ela catalisa a formação do MVA por duas sucessivas reduções de HMG-CoA, usando duas entidades de NADPH como cofator. O mevalonato resultante da redução do HMG-CoA é seqüencialmente fosforilado por duas quinases, mevalonato quinase e fosfomevalonato quinase, para formar 5-pirofosfomevalonato. A formação de IPP é então catalisada por mevalonato difosfato decarboxilase (MPDC), a enzima requer ATP e um íon metal divalente.

Em contraste com o que ocorre em animais, *HMGR* em plantas é codificada por duas isoformas (BACH et al., 1991; WEISSCNBORN et al., 1995). Essas *HMGR* isoformas são diferentemente expressas, dependendo das condições fisiológicas (STERMER et al., 1994; WEISSCNBORN et al., 1995).

Segundo Croteau et al., (2000), *HMGR* é uma das enzimas mais altamente reguladas em animais, é responsável pelo controle da biossíntese de colesterol. Várias evidências indicam que a enzima em planta também é altamente regulada. Em muitos casos, uma pequena família de genes, cada uma contendo múltiplos membros, codificam para esta redutase. Esta família de genes é expressa em modelo complexo, com genes individuais exibindo expressão constitutiva, ou específica no desenvolvimento de tecidos, ou ainda induzida por fitorreguladores. A expressão do gene de *HMGR* pode também ser induzida por ferimentos ou infecção por patógenos. A atividade de *HMGR* pode ser matéria para regulação pós-tradução. Modulação alostérica provavelmente também apresenta um papel regulatório. A degradação proteolítica da proteína *HMGR* e a proporção do movimento total do correspondente mRNA transcrito pode também influenciar a atividade da enzima.

Plantas, que produzem diversos metabólitos provenientes da via do mevalonato em vários tecidos e organelas possuem múltiplos genes, diferencialmente regulados para *HMGR* (NARITA; GRUÍSSEM, 1989; YANG et al., 1991). Diferentes genes para redutases são expressos especificamente em diferentes partes da planta (CHYE et al., 1992), estágios do desenvolvimento (NARITA; GRUÍSSEM, 1989), e em resposta a vários estresses. Por exemplo, em batata, diferentes genes de redutases são induzidos especificamente em resposta ao ataque de patógenos e ferimentos (YANG et al., 1991). Em *Arabidopsis thaliana*, algumas *HMGR* são localizadas em sistema de membrana, mas a porção predominante é encontrada com estruturas vesiculares esféricas e com o vacúolo

central que são localizados no citoplasma. Segundo Jorgensen et al., (2005) as diferentes isoformas de *HMGR* podem ter localizações específicas.

A reação inicial da via MEP envolve a formação de 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) proveniente de piruvato e D-gliceraldeído 3-fosfato, sendo catalisada por DXP sintase (DXS) (LANGE et al., 1998; LOIS et al., 1998) (Figura 1).

O segundo passo da via MEP é a conversão de DXP em MEP pela enzima DXP reductoisomerase (DXR) (LANGE; CROTEAU, 1999; SCHWENDER et al., 1999; TAKAHASHI et al., 1998). A conversão de DXP para MEP catalisada por 1-deoxi-D-xilulose reductase (DXR) é atualmente considerada como o primeiro passo específico para biossíntese de isoprenóides em plastídeos. DXP é um intermediário não somente da biossíntese de IPP, mas, também de tiamina e piridoxol na via plastídica de biossíntese (JULLIARD; DOUCE, 1991; JULLIARD, 1992). Portanto, o bloqueio da atividade de *DXR* inibe a biossíntese de isoprenóides na via plastídica. Fosmidomicina tem sido mostrada como inibidora da atividade de *DXR* em plantas (MUELLER et al., 2000; SCHWENDER et al., 1999), levando para o bloqueio específico na síntese plastídica de isoprenóides (ZEIDLER et al., 1998).

Carretero-Paulet et al., (2002), verificaram que em *Arabidopsis thaliana*, *DXR* é codificado por uma isoforma. Rodriguez-Concepcion et al. (2001) observaram por hibridização de membranas de Southern Blot, a presença de uma única isoforma do gene codificando para *DXR* em tomate.

Hans et al. (2004), clonaram e caracterizaram *DXR* em milho (*Zea mays*). Verificaram através de seqüências genômicas e seqüências expressas (ESTs) que há apenas uma única cópia de *DXR*, com seqüência peptídica de direcionamento para plastídeo. A identificação funcional foi acompanhada por expressão das seqüências codificando para a proteína madura em *E. coli*. O gene *DXR* é regulado à montante em raiz de milho durante associação com micorrizas, como mostrou o nível do transcrito e produção de proteína, mas, também é abundante em folhas e sementes jovens.

A expressão de alguns genes da via MEP tem sido mostrada preceder ou ser paralela a ativação de vias específicas de produção de monoterpenos, em hortelã-pimenta, nas células das glândulas secretoras de óleo (LANGE et al., 1998) e carotenóides no fruto de pimenta e tomate (BOUVIER et al., 1998; LOIS et al., 2000). A super expressão de *DXR* em plantas transgênicas de hortelã-pimenta leva ao aumento da síntese de isoprenóides (MAHMOUD;

CROTEAU, 2001). Uma correlação positiva foi encontrada entre a biossíntese de isoprenóides e acúmulo de transcrito codificando ambos *DXS* e *DXR* em raízes de monocotiledôneas (WALTER et al., 2000) e cultura de células de pervinca (*Catharanthus roseus*) (VEAU et al., 2000). Por outro lado, segundo Rodriguez-Concepción et al. (2001) o grande acúmulo de carotenóides que ocorre durante o amadurecimento do fruto de tomate, não requer aumento no nível da transcrição de *DXR* ou qualquer proteína codificada.

As vias MEP e MVA operam independentemente em plantas, mas há evidência que elas cooperam na biossíntese de certos metabólitos, podendo haver cruzamento e/ou cooperação entre as vias de biossíntese de IPP (PIEL et al., 1998; SCHUHR et al., 2003) Laule et al. (2003), verificaram que em *Arabidopsis thaliana* a comunicação entre as duas vias ocorre principalmente da via MEP para a MVA. Segundo Rodriguez-Concepcion et al. (2004) o cruzamento que ocorre entre as vias MVA e MEP pode liberar o bloqueio quando inibidores das vias são utilizados

Rodriguez-Concepcion et al. (2004) propuseram um modelo para a regulação da biossíntese e mudança dos precursores de isoprenóides durante o desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis thaliana*. Quando sementes foram germinadas no escuro, houve uma indução precoce dos genes que codificam HMGR, ativando a via MVA em sementes estioladas (ENJUTO et al., 1994; LEARNED; CONNOLLY, 1997). Devido ao crescimento estiolado envolver alta taxa de alongação das células, pode-se esperar que isoprenóides derivados da MVA, como esteróis e brassinosteróis, sejam requeridos em alto nível. No entanto, quando expostas à luz houve expressão dos genes da via MEP (MANDEL et al., 1996) resultando na ativação da síntese de isoprenóides pela via plastídica.

A biossíntese de terpenóides pode ser freqüentemente restrita a tecidos específicos e ao local de utilização. Por exemplo, o monoterpeneo linalool, que está envolvido na atração de polinizadores para *Clarkia breweri*, é produzido primeiramente nas pétalas da flor (PICHERSKY et al., 1994). Carotenóides são produzidos nos frutos de pimenta vermelha (*Capsicum annum*) durante o amadurecimento (CAMARA; BRANGEON, 1981). A biossíntese de terpenos, resina ácida em coníferas, é localizada na proximidade do ferimento (LEWINSOHN et al., 1991). Engprasert et al. (2004), verificaram que *DXR* é fortemente expresso em folhas, pouco em caule e apenas quantidades mínimas em raiz de *Coleus forskolin*. No entanto, concluíram que a presença de *DXR* está, envolvido na biossíntese de

forscolina, sendo, primeiramente sintetizado em folhas, e subseqüentemente transportado para ser acumulado em caule e raiz.

3.7 DITERPENOS DE CAFÉ

Os diterpenos são moléculas C_{20} que utilizam as vias MVA no citossol ou MEP no plastídeo para biossíntese. Os principais diterpenos em café são cafestol ($C_{20}H_{28}O_3$), caveol ($C_{20}H_{26}O_3$) e 16-O-metil cafestol ($C_{21}H_{29}O_3$) (Figura 2), que são álcoois de diterpenos pentacíclicos baseados na fusão de unidades de isopreno (C_5) para formar o esqueleto de caurano de vinte carbonos (SPEER; KOLLING-SPEER, 2001).

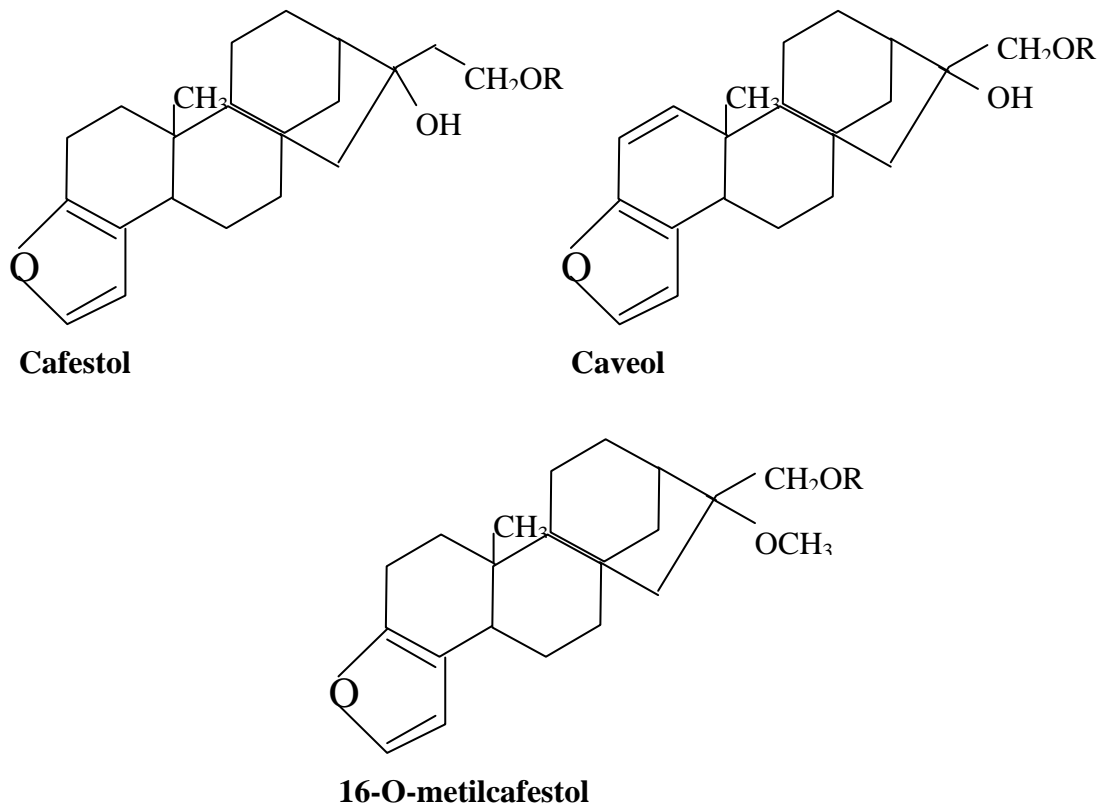


Figura 2 – Fórmula estrutural cafestol, caveol, 16-O-metilcafestol e 16-O-metilcafestol.
Fonte: Ross et al. (1997, p. 3065).

Existe grande variabilidade interespecífica na quantidade de diterpenos no gênero *Coffea* (ROOS et al., 1997). Em *C. arabica*, a relação caveol/cafestol também varia dependendo da origem do café (SPEER; KOLLING-SPEER, 2001). Estudos sugerem uma importante variabilidade da expressão, estabilidade, atividade e localização das enzimas envolvidas na síntese de cafestol (ROSS et al., 1997). O conhecimento das enzimas e dos seus genes correspondentes, envolvidas na via metabólica de diterpenos em outras espécies (TRAPP; CROTEAU, 2001) sugerem que a presença exclusiva de cafestol e caveol no gênero *Coffea* é ligada à ação de enzimas específicas capazes de reconhecer e modificar o grupo caurano produzindo cafestol e compostos relacionados (caveol, 16-O-metilcafestol e 16-O-metilcaveol) (KOLLING-SPEER; SPEER, 1997).

O cafestol é encontrado tanto em grãos de *C. arabica* (3-6 g/kg massa seca) como de *C. canephora* (1-2 g/kg massa seca), onde este diterpeno é predominante. Cafestol também está presente em folhas de *C. arabica*. O caveol é específico de grãos de *C. arabica* (2 g/kg massa seca) mas, apresenta níveis não detectáveis nas folhas. Estas observações são opostas aquelas realizadas em *C. canephora*, onde o caveol está presente em folhas, mas não no café verde. O 16-O-metilcafestol é específico de grãos de *C. canephora* (0.5-1 g/kg massa seca) e presente somente em pequenas quantidades nas folhas, no entanto, está presente em folhas de *C. arabica* (SPEER; KOLLING-SPEER, 2001). Estas observações sugerem a ação de diferentes “enzimas modificadoras de cafestol” existentes em *C. arabica* e *C. canephora* e/ou a ação das mesmas enzimas, mas diferindo em sua expressão ou localização de expressão nestas duas espécies de café.

Em grão de café verde, há somente uma pequena quantidade diterpenos na forma livre, enquanto que a maior parte é encontrada na forma esterificada de ácidos graxos, principalmente de palmitato (C16:0) e linoleato (C 18:2) (SPEER et al., 1993a). Essa situação contrasta com a composição de ácidos graxos em grão verdes onde linoléico (18:2) é o principal ácido graxo encontrado (SPERR et al., 1993; DUSSERT et al., 2001).

O método de preparação de café não afeta as proporções de ésteres de diterpenos, mas influencia grandemente a concentração final de diterpenos na bebida. Por exemplo, o café fervido (modo escandinavo de preparo) contém 2,2% de lipídeos totais (mg/g de café moído), contra 0,4% no café expresso e 0,2% em café filtrado (SEHAT et al., 1993).

Foram realizados vários estudos para analisar a influência dos diterpenos do café na saúde humana. Diterpenos tanto na forma livre como na forma de éster de palmitato, podem agir como substância com capacidade de elevar o nível de colesterol em humanos, provavelmente inibindo a síntese de ácido biliar que está implicado na degradação de colesterol no fígado (POST et al., 2000; BOEKSCHOTEN et al., 2003). Estudos mais detalhados sugerem que entre os diterpenos de café, o cafestol pode ser responsável pelo aumento do nível de colesterol no sangue, enquanto que o caveol mostrou somente um pequeno efeito (POST et al., 2000; ROOS et al., 2001). Scott (1999) verificou que houve um aumento de 71% no nível do colesterol em indivíduos do grupo que receberam óleo de *C. arabica* e 61% no grupo que recebeu óleo de *C. canephora*.

Segundo Cavin et al., (2002) o aumento significativo do colesterol foi observado apenas com o consumo de altas doses de café, já importantes efeitos de quimioproteção foram observados mesmo com doses baixas. Tem sido mostrado em modelos animais que os efeitos anti-carcinogênicos do café tem ação no fígado, rim, pulmão e tecidos intestinais.

Outros estudos demonstraram que cafestol e caveol foram responsáveis pela redução da ligação covalente da toxina hepatocarcinogênica aflatoxina B1 ao DNA (CAVIN et al., 1998), isto também sugere a ação anticarcinogênica desses diterpenos. Schilter et al. (1996) verificaram que ratos alimentados com doses de cafestol e caveol aumentaram no fígado a expressão do gene da glutathione-S-transferase (GST) que detoxifica os metabólitos da aflatoxina B1. Cavin et al. (1998) verificaram que em fígados de ratos tratados com cafestol e caveol houve grande expressão de GST enquanto que os animais controle apresentaram baixos níveis da enzima.

Diversos estudos tem demonstrado, que café verde e também torrado, inibe o desenvolvimento de 7, 12-dimetilbenz [a]anthracene (DMBA) que induz o desenvolvimento do câncer em vários tecidos (MILLER et al., 1993).

Além das propriedades anticarcinogênicas o óleo de café, devido à presença de cafestol e caveol tem sido usado em experimentos para a produção de filtro solar e antiinflamatórios.

Até o momento não há nenhum relato na literatura sobre a expressão gênica e o controle regulatório de formação de isoprenóides do café, assim como da biossíntese de diterpenos, seja nas fases de desenvolvimento dos

grãos, como em folhas, onde eles também são encontrados. Visando um entendimento maior da síntese de diterpenos de café, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão *in silico* e *in vivo* dos genes DXR, IDS, HMGR e MPDC das vias MEP e MVA de biossíntese de isoprenóides.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE *IN SILICO* DOS GENES *DXR*, *IDS* (VIA MEP), *HMGR* E *MPDC* (VIA MVA)

4.1.1 Busca dos Genes *DXR*, *IDS*, *HMGR* e *MPDC*

A partir do banco de dados do Projeto Genoma Café (www.lge.ibi.unicamp.br/caf%C3%A9/) foram realizadas buscas referentes aos genes das vias biossintéticas de isoprenóides, *DXR* e *IDS* (via MEP), *HMGR* e *MPDC* (via MVA) por palavras-chave (*DXR*, *IDS*, *HMGR* e *MPDC*). O banco de dados do Projeto Genoma Café possui seqüências genômicas expressas (ESTs) de *C. arabica* (130.792), *C. canephora* (12.381) e *C. racemosa* (10.566) distribuídas em 37 bibliotecas de cDNA. As seqüências obtidas foram clusterizadas para formação de seqüências contíguas ou contigs. Cada contig foi analisado e/ou comparado individualmente com seqüências de proteínas depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os contigs e singletons (seqüências únicas) obtidos foram re-clusterizados utilizando o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, 1998) e BioEdit Sequence Alignment Editor. Para clusterização no Sequencher a percentagem mínima de alinhamento foi de 85% e sobreposição de 20%. A qualidade da seqüência dos singletons foi analisada individualmente no banco de dados do Projeto Genoma Café. Foram efetuadas análises no programa ChloroP (EMANUELSSON et al., 1999) para identificação de peptídeo de direcionamento para os plastídeos. O programa Mega 3.1 (teste: Bootstraps; método de comparação: Neighbor-joining) (KUMAR et al., 2004) foi usado para gerar dendogramas, mostrando o grau de divergência entre as seqüências de um gene em diferentes organismos.

Também foram realizadas buscas utilizando palavras-chave para as seqüências de *DXR*, *IDS*, *HMGR* e *MPDC* na plataforma HarvEST: *Coffea* 0.10 (LIN et al., 2005). O banco HarvEST: *Coffea* possui seqüências de *C. canephora* (45.641), *C. arabica* (1017) e *C. arabica* híbrido (23) distribuídas em 12 bibliotecas. As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências de *DXR*, *IDS*, *HMGR*

e *MPDC* do banco de dados do Projeto Genoma Café, em sua maioria *C. arabica*, e analisados e/ou comparados individualmente com seqüências de proteínas depositadas no banco de dados do NCBI. Foi utilizado o programa Sequencher 4.1.4. para verificar a possível clusterização das seqüências do banco HarvESt e do projeto Genoma Café.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR DE *DXR* E *HMGR*

4.2.1 Material Vegetal

O material vegetal foi coletado de plantas de café no campo experimental do Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina, Paraná. Para análise molecular, foram coletados botão floral, raiz, ramo, folhas e frutos de *C. arabica* c.v. IAPAR59. Os frutos foram coletados a cada 28-30 dias entre os meses de novembro a maio dos anos de 2005 e 2006. Também foram coletadas folhas de *C. canephora* var. Apoatã e de *C. eugenioides*.

4.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* foi feita através do método de Chang et al. (1993) com modificações. Para 5 g de folhas maceradas em nitrogênio líquido foram adicionados 20 mL de tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM de TRIS-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, 0,5 g/L⁻¹, 2% de β -mercaptoetanol e 2% metabissulfito de sódio). Após 20' a 65°C a solução foi centrifugada por 5' a 4500 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifugação onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, seguido de homogenização e centrifugação a 4500 g por 5' a temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo frasco, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. Após nova centrifugação, a

fase aquosa foi transferida para novo tubo e foi adicionado 0,6 X o volume de isopropanol. Depois de precipitar durante a noite, a -20°C , as amostras foram centrifugadas durante 30' a 4°C , o sobrenadante descartado. Depois de seco, o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de H_2O ultrapura autoclavada e 200 μL de RNase. Depois de incubação por 1 hora a 37°C , foi adicionado o mesmo volume de fenol-clorofórmio (1:1). As amostras foram centrifugadas por 5' 10.000 g a temperatura ambiente, Ao sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, e após nova centrifugação adicionado 3 X o volume de etanol 98% , 0,1 X o volume de acetato de sódio 3 M. Após precipitação durante a noite, as amostras foram centrifugas durante 30' 10.000 g a 4°C e o precipitado foi ressuspensão em H_2O ultrapura autoclavada.

Para verificar a qualidade da extração do DNA, as amostras foram submetidas a eletrofose com tampão SB 1X (BRODY; KERNY, 2004) em gel de agarose 1% (p/v) e visualizados após coloração com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sob luz UV. A quantificação do DNA foi feita em Fluorímetro QubitTM.

4.2.3 Extração de RNA

Para análise da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de isoprenóides, foi extraído RNA total de polpa, perisperma, endosperma de *C. arabica* c.v. IAPAR 59, em diferentes estágios de maturação, também foi isolado RNA de botão floral jovem, botão floral maduro, ramo, fruto inteiro, raiz, folha jovem e expandida exposta à luz.

Para evitar contaminação com RNase, o material utilizado para isolamento de RNA foi esterilizado a 180°C , por 18 horas ou tratado com solução RNase Away (Invitrogen).

Para a extração de RNA foi utilizado o protocolo de Chang *et al.* (1993), com modificações. Foram usados cerca de 5 mL do material macerado em nitrogênio líquido, adicionados 20 mL de tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100mM de TRIS-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, 0,5 g/L^{-1} , 2% de β -mercaptoetanol e 2% metabissulfito de sódio). Após 20' a 65°C a solução foi

centrifugada por 5' a 4500 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifugação onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, seguido de homogeneização e centrifugação a 4500 g por 5' a temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo frasco, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novo tubo e foi adicionado LiCl_2 para uma concentração final de 2,5 M para precipitação durante a noite a 5°C. Após a precipitação o material foi centrifugado a 4°C por 30' a 4500 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com LiCl_2 2,5 M, seguido de nova centrifugação a 4°C por 5' a 4500 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi incubado durante 1 hora com 1 mL de tampão para a DNase e 1 μL de DNase. Foi adicionado 1 mL de fenol-clorofórmio (1:1) e centrifugado durante 5' a 4500 g. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo frasco, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novo tubo e foi adicionado 0,3 X o volume de acetato de sódio 3M e 3 X o volume de etanol 98% para precipitação durante a noite a 5°C. Após a precipitação o material foi centrifugado a 4°C por 30' a 4500 g o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em H_2O tratada com DEPC.

A quantificação do RNA foi feita através de leitura em espectrofotômetro e a concentração verificada pela fórmula $[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/mL} \times \text{Fdil.} \times A_{260}$, onde Fdil é o fator de diluição do RNA.

Para verificar a qualidade da extração do RNA, as amostras foram submetidas a eletroforese com tampão TAE (Tris, ácido acético, EDTA 0,5 M) em gel de agarose 1% (p/v) e visualizados após coloração com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) sob luz UV.

4.2.4 Obtenção de cDNA

O cDNA usado para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi sintetizado utilizando o “ThermoScript™ oligo (dT) System” a partir da mistura de

RNA de polpa, perisperma e endosperma de diferentes fases de desenvolvimento do fruto de *C. arabica* c.v. IAPAR 59.

4.2.5 Amplificação dos Genes *DXR* e *HMGR*

Baseados nos contigs obtidos, oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *DXR* e *HMGR* foram desenhados visando à amplificação e caracterização dos mesmos seja por PCR ou para produção de sondas visando experimentos de análise de expressão via Northern Blot e Southern Blot. As construções foram feitas utilizando o programa PRIMER DESIGNER versão 2.0. Os oligonucleotídeos receberam os nomes, baseados nos nomes dos contigs dado pelo banco de dados do projeto Genoma Café.

Para amplificação de *DXR* e *HMGR* foi feita reação da polimerase em cadeia (PCR), usando as possíveis combinações entre os oligonucleotídeos senso e anti-senso (C) desenhados (Tabela 2).

Tabela 2 – Combinação de oligos utilizados em PCR e tamanho esperado para os fragmentos.

Gene	Oligo senso	Oligo anti-senso	Tamanho esperado para os fragmentos amplificados na PCR
DXR	DXR	DXRC	633 pb
<i>HMGR</i>	6749	6749C	450 pb
<i>HMGR</i>	0	0C	186 pb
<i>HMGR</i>	6175	6175C	483 pb
<i>HMGR</i>	6749	0C	1556 pb
<i>HMGR</i>	6749	6175C	1694 pb

Cada reação (20 µL) foi realizada com 1 µL de cDNA, 2 µL de tampão Mg 10X, 0,5 µL de dNTP a 10 µM, 0,6 µL MgCl₂, 1,0 U de *Taq* polimerase (Invitrogen) e 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador específico a 10µM. Para a

PCR foi utilizado o termociclador PT-100TM (MJ Research, Waltham, MA, USA), com o seguinte programa: 2' a 94°C, seguido de 40 ciclos de amplificação (30" à 94°C, 1' 57°C, 2' 72°C) e extensão final de 4' a 72°C. Os produtos da amplificação da PCR foram submetidos a eletroforese com tampão SB 1X em gel de agarose 1% (p/v) e visualizados após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/ml) sob luz UV.

Para a produção de sondas o produto de cada PCR foi eluído do gel, isto é, foi cortado o fragmento de acordo com o tamanho esperado para cada par de primer senso/antisenso, seguido de estocagem por 1 hora a -80°C, centrifugação a 10.000g durante 30'. O sobrenadante foi retirado e estocado a -20°C.

4.2.6 Seqüenciamento das Sondas

Foi feito o seqüenciamento das sondas obtidas por produto de PCR, para comprovar a amplificação dos genes de interesse. Foram seqüenciadas as possíveis combinações dos primers de *HMGR* e *DXR*.

A reação de seqüenciamento foi realizada usando-se os procedimentos descritos no manual do Kit "DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing Kit" (Amersham Biosciences). Foi usado 1,0 µL de DNA (sonda), 1µL (10 µM) do oligonucleotídeo específico para cada sonda, senso ou anti-senso, 4 µL de "DYEnamic ET reagent premix" (contêm dNTP, terminadores ddNTPs associados às substâncias fluorescentes e Thermo SequenaseTM II DNA polimerase) e água ultrapura autoclavada para um volume final de 10 uL. A reação de seqüenciamento foi feita em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) com duração de 30 ciclos usando os parâmetros: 95°C por 20", 50° C por 15", 60°C por 60".

Após a reação, adicionou-se as amostras 1 uL de acetato de amônio 7,5 M, 27,5 uL de etanol 100%, a placa foi invertida e centrifugada 2500 g por 45'. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado lavado com 145 uL de etanol 70% (recém preparado). Centrifugou-se por mais 10' a 2500 g e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram colocadas em estufa a 37°C durante 5' para a completa evaporação do álcool. Para o seqüenciamento as

amostras foram ressuspensas em 10 uL de água ultrapura autoclavada. O sequenciamento foi realizado em equipamento MegaBace 1000.

4.2.7 Caracterização dos Genes por Southern Blot

A técnica Southern Blot permite detectar fragmentos específicos do DNA em amostras de composição complexa, como DNA genômicos. Análise de Southern Blot foi feita para caracterização genômica e verificar o número de isoformas dos genes *DXR* e *HMGR* em *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*.

As amostras de DNA (10 µg/µL) foram digeridas com as enzimas *DraI* e *HindIII* e incubadas a 37°C por 16 horas. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% (p/v) e tampão SB 1X a 2 V/cm por 16 horas. Após a eletroforese, o gel foi lavado com solução de depurinação (0,25 mol/L HCl) por 15' solução de denaturação (NaOH 0,5 mol/L; NaCl 1,5 mol/L) 2 x por 30' e solução de neutralização (Tris 0,5 mol/L; NaCl 3 mol/L) 2 x durante 30'. Foi feita a transferência do DNA à membrana de náilon XL Hybond (Amersham Biosciences) por capilaridade em solução SSC 10X (Cloreto de sódio, Citrato de sódio, H₂O) e fixado mediante incubação a 80°C por 2 horas.

As membranas foram pré-hibridizadas por 2 horas com solução UltraHyb (Ambion) e hibridizadas com sonda marcada com dCTP ^αP³² usando a técnica de oligonucleotídeos aleatórios (*random primer*), por 12 horas a 37°C. Após hibridização por 24 horas membranas foram lavadas 2X durante 20 min com o tampão 1 (SSC 1%; SDS 0,1%) e com tampão 2 (SSC 1%; SDS 0,1%) e expostas em placa de imagem BAS-IP MS 2340. As imagens foram capturadas utilizando aparelho fluorescent image analyzer FLA 3000 – series (Fuji Photo Film CO, Lts. Tokyo – Japan).

Foi utilizado o programa Nebcutter V2.0 (<http://tools.neb.com>) para verificar os sítios de restrição das enzimas *DraI* e *HindIII* nos contigs dos genes *DXR* e *HMGR* de *Coffea*. O programa Intron Finder Results (www.sgn.cornell.edu) também foi utilizado com as seqüências dos contigs de *DXR* e *HMGR* de *Coffea*.

4.2.8 Análise da Expressão dos Genes por Northern Blot

Para determinar a expressão dos genes *HMGR* e *DXR* em diferentes tecidos de *Coffea* foram realizados Northern Blots utilizando 10 µg de RNA total. Após extração do RNA, foram adicionados 0,5 X o volume da amostra de tampão de corrida (SIGMA) e a seguir desnaturadas a 65°C por 10' seguindo de 10' em gelo antes de serem aplicadas no gel. As amostras foram separadas eletroforéticamente em gel desnaturante 1,4% de agarose, contendo 22,5% de formaldeído e 12,5% de tampão MOPS 10X (MOPS, Acetato de sódio triidratado, Na₂EDTA.2H₂O). Após a corrida o gel foi lavado 2X em solução de SSC 10X. Os RNAs contidos no gel foram transferidos para membranas de náilon XL Hybond (Amersham Biosciences) por capilaridade em solução SSC 10X. Em seguida, a membrana foi exposta a 80°C por duas horas para fixação do RNA.

A marcação das sondas e hibridização das membranas foram as mesmas descritas para Southern Blot. Após captura da imagem as membranas foram dehibridizadas com solução de SDS 0,5% para reutilização.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE *IN SILICO* DE *DXR*, *IDS*, *HMGR* E *MPDC*

5.1.1 Análise *in silico* de *IDS*

A partir da busca através de palavras chaves do gene *IDS* (isopentenil difosfato sintase) no banco de dados do Projeto Genoma Café, foram obtidas 47 seqüências as quais geraram um contig. A clusterização demonstrou maior expressão em bibliotecas de cDNA de cultura de células e tecidos (Tabela 3).

A análise da seqüência de nucleotídeos do contig 13239 indicou que o gene *IDS* em *Coffea* possui apenas uma isoforma. O contig 13239 representa a seqüência completa do gene *IDS*, sua tradução assemelha-se a proteína de muitos organismos, com cerca de 464 aminoácidos. O alinhamento foi completo tanto nas extremidades N-terminal e C-terminal com a proteína *IDS* de *Solanum tuberosum* (batata) (ABB553951), com e-value: 0.0 e alinhamento de 83%. O contig possui similaridade ao domínio isopentenil difosfato sintase (pfam02401). Foram selecionadas seqüências de *IDS* de diferentes organismos para montagem de dendograma pelo Programa Mega 3.1 (Figura 3).

O programa ChloroP acusou a identificação de peptídeo de direcionamento para cloroplasto para a seqüência traduzida do gene *IDS* de *Coffea*.

Tabela 3 – Seqüências genômicas expressas do gene *IDS*. Bibliotecas do Genoma Café foram agrupadas de acordo com tecidos ou condições fisiológicas.

Contig	Total de ESTs	Bibliotecas					
		Frutos e Flores	Folhas	estresse hídrico	Hipocotilo	Sementes germinando	Cultura de células e tecidos
13239	47	9	9	4	10	1	14

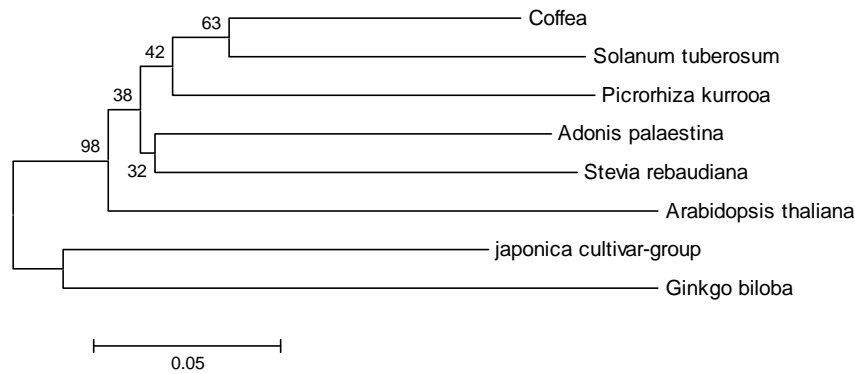


Figura 3 – Dendrograma filogenético de *IDS* de *Coffea*. Sequências de aminoácidos foram alinhadas usando Programa mega 3.1. As seqüências foram obtidas através do NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *Solanum tuberosum* ABB55395.1; *Adonis palaestina* AAG21984.1|AF270978_1; *Stevia rebaudiana* ABB88836.2; *Arabidopsis thaliana* AAN87171.1; *Oryza sativa* AAT77894.1; *Ginkgo biloba* ABC84344.1.

Na busca de ESTs de *IDS* de *C. canephora* no banco de dados HarvEST, foram obtidas sete seqüências relacionadas a esse gene, que geraram dois contigs incompletos, com maior expressão em folhas. O BlastX mostrou alinhamento parcial com as seqüências de *IDS* depositadas no NCBI (Tabela 4). O Blast realizado com as seqüências do banco de dados do Projeto Genoma Café, mostrou que as seqüências do banco HarvEST apresentam similaridade ao contig 13239 (Tabela 5). O programa Sequencher confirmou esses resultados clusterizando o contig 13239 do Genoma Café aos contigs 3173 e 2777 do banco de dados HarvEST (Figura 4).

Tabela 4 – Clusterização das seqüências de *IDS* na plataforma HarvEST.

Gene	Contig ou Singlet	Total de ESTs	Bibliotecas		tamanho da seqüência traduzida	Seqüência similar ¹
			perisperma e endosperma	folha jovem		
<i>IDS</i>	2777	5	0	5	805	<i>Adonis palaestina</i> ; e-value: 4e-102; identidade 77%
<i>IDS</i>	3173	2	1	1	697	<i>Solanum tuberosum</i> ; e-value: 2e-120; identidade 89%

¹similaridade no BlastX do NCBI. Números de acesso: *Adonis palaestina* (AF2709781); *Solanum tuberosum* (ABB553951).

Tabela 5 – Comparação entre contigs de *IDS*

contigs do banco HarvEST	contigs ou singletons do banco do Projeto Genoma Café	e-value – identidade
3173	13239	0.0 - 97%
2777	13239	0.0 - 99%

Nota : Resultado do Blast de seqüências do Harvest no Banco de dados do Genoma Café

**Figura 4** – Clusterização pelo programa Sequencher do contig 13239 (Projeto Genoma Café) e contig 2777 e contig 3173 (plataforma HarvEST).

5.1.2 Análise *in silico* de *MPDC*

Através da busca por palavra chave para o gene *MPDC* (mevalonato difosfato decarboxilase) no banco de dados do Projeto Genoma Café foram obtidos sete seqüências, a clusterização originou dois contigs e um singlet. As seqüências de *MPDC* tiveram expressão em bibliotecas de cDNA de cultura de células e tecidos e flores e frutos (Tabela 6). O BlastX mostrou que o contig 11695 e contig 7547 apresentam similaridade com a região C-terminal de proteínas de genes de *MPDC*, enquanto o singlet EA1-009-C09 apresenta similaridade com a região N-terminal.

Tabela 6 – Seqüências genômicas expressas de *MPDC*. Bibliotecas do Genoma Café foram agrupadas de acordo com tecidos ou condições fisiológicas.

Contig ou singlet	Bibliotecas			
	Total de ESTs	Frutos e flores	Hipocotilo	Cultura de células e tecidos
contig 11695	4	2	0	2
contig 7547	2	0	1	1
singlet EA1-009-C09	1	0	0	1

Sem alterar os parâmetros de qualidade do programa Sequencher, foi feito o alinhamento dos contigs 11695 e 7547 (Figura 5). O alinhamento pelo BioEdit das seqüências de nucleotídeos e de sua tradução em aminoácidos mostrou grande similaridade entre os contigs, apenas 9 nucleotídeos ou 2 aminoácidos diferentes. A maioria dos nucleotídeos diferentes entre os contigs está na região do contig 7547 formada por apenas uma seqüência de baixa qualidade.

O programa BlastX do NCBI mostrou que o contig 001, formado a partir da união do contig 11695 e contig 7547, começa o alinhamento em torno do aminoácido 194 de proteínas homólogas de *MPDC* de 415 aminoácidos, estando completo na região C-terminal. O contig 001 apresenta similaridade ao gene *MPDC* de vários organismos. O melhor alinhamento observado foi com *Hevea brasiliensis* (AAL18927.1|AF429386_1) com e-value: $2e-104$ e identidade de 80%. Foram selecionadas seqüências de *MPDC* de diferentes organismos e as duas possíveis isoformas de *MPDC* de *A. thaliana* para montagem de dendograma pelo Programa Mega 3.1 (Figura 6 e 7).

A comparação no BlastX do NCBI da seqüência traduzida do singlet EA1-009-C09 demonstra que ele está completo na região N-terminal. O alinhamento ocorre do primeiro até o aminoácido 104 de proteínas homólogas de 604 aminoácidos. O melhor alinhamento observado foi com *Hevea brasiliensis* com e-value: $7e-37$ e identidade de 74%. O BlastP mostrou que o contig 001 e o singlet possuem domínio para mevalonato difosfato decarboxilase (COG3407).

O programa CloroP não indicou que as seqüências apresentam peptídeo de direcionamento para cloroplasto.

Nas análises de ESTs de *MPDC* de *C. canephora* no banco de dados HarvEST, foram obtidas 13 seqüências relacionadas a esse gene, que geraram 1 contig incompleto. A clusterização demonstrou expressão em bibliotecas de endosperma e perisperma. O BlastX mostrou alinhamento parcial com as seqüências de *MPDC* depositadas no NCBI (Tabela 7). O Blast local realizado dentro do banco de dados do Projeto Genoma Café, mostrou que as seqüências do banco HarvEST apresentam similaridade ao contig 11695, contig 7547 e ao singlet EA1-009-C09 (Tabela 8). O programa Sequencher agrupou o contig 1357 do banco de dados HarvEst com os contigs 11695 e 7547 e singlet EA1-009-C09 do banco do Genoma Café (Figura 8), o alinhamento forneceu uma possível seqüência completa para o gene *MPDC* de *Coffea*.

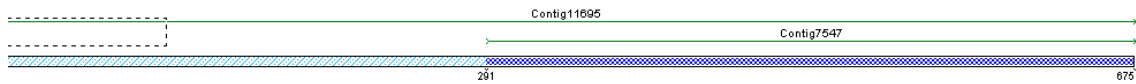


Figura 5 – Clusterização dos contigs 11695 e 7547 através do software Sequencher.

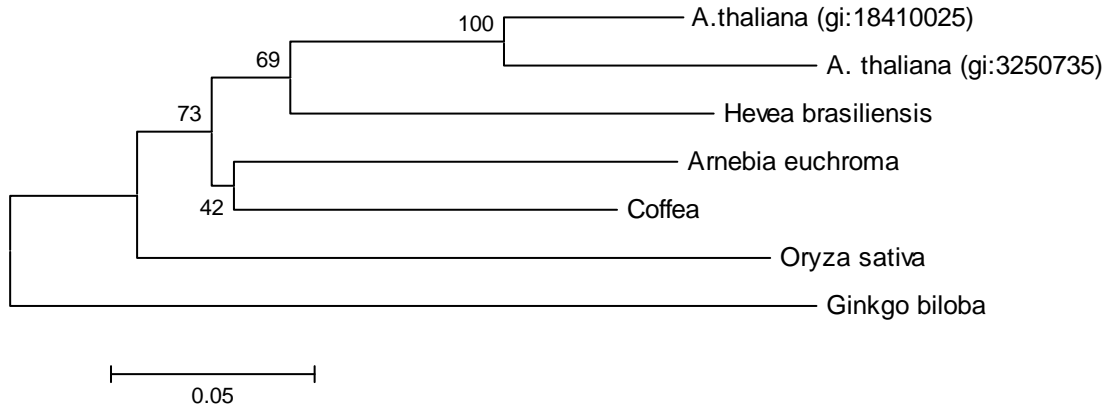


Figura 6 – Dendrograma filogenético de *MPDC* de *Coffea*. Sequências de aminoácidos foram alinhadas usando Clustal W Multiple Sequences Alignments. As seqüências foram obtidas através do NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *Hevea brasiliensis* AAL18927.1|AF429386_1; *Arnebia euchroma* ABG24207.2; *Arabidopsis thaliana* NP_566995.1; *Oryza sativa* BAD27942.1; *Ginkgo biloba* AAV32433.1.

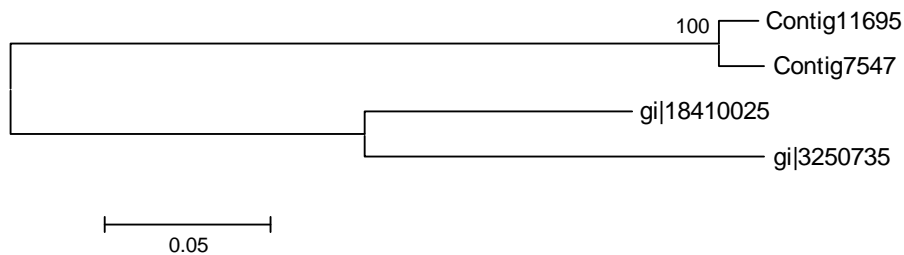


Figura 7 – Dendrograma filogenético de *MPDC* de *Coffea* e as duas possíveis isoformas de *A. thaliana*. A) Contig 11695, contig 7547 de *Coffea* e as duas possíveis isoformas de *MPDC* de *A. thaliana*. B) Contig 11695 de *Coffea* as duas possíveis isoformas de *MPDC* de *A. thaliana*. C) Contig 7547 de *Coffea* e as duas possíveis isoformas de *MPDC* de *A. thaliana*. As seqüências de *A. thaliana* foram obtidas através do NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): GI:18410025 e GI: 3250735.

Tabela 7 – Clusterização das seqüências de *MPDC* na plataforma HarvEST.

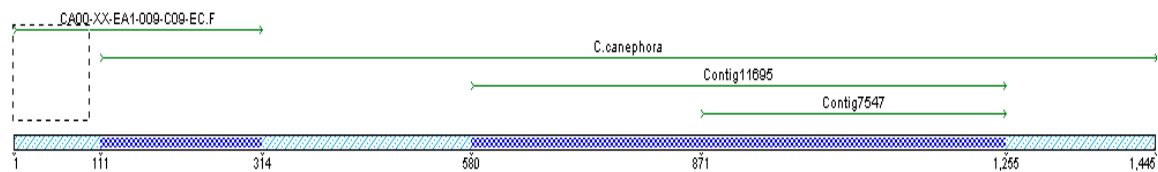
Gene	Contig	Total de ESTs	Bibliotecas Perisperma e endosperma	Tamanho das seqüência	Seqüência similar ¹
<i>MPDC</i>	1357	13	13	1328pb	<i>Hevea brasilienses</i> e-value:3e-177; identidade:82%

¹similaridade no BlastX do NCBI. Números de acesso: *Hevea brasilienses* (AF4293861).

Tabela 8 – Comparação entre contigs de *MPDC*.

contig do banco HarvEST	contig ou singlet do Projeto Genoma Café	e-value – identidade
1357	11695	0.0 - 97%;
	7547	0.0 - 99%;
	EA1-009-C09	0.0 - 100%

Nota : Resultado do Blast de seqüências do HarvEST no Banco de dados do Genoma Café.

**Figura 8** – Clusterização pelo programa Sequencher do contig 1357 (plataforma HarvEST) e contig 11695, 7547 e singlet EA1-009-C09 (plataforma Genoma Café).

5.1.3 Análise *in silico* de *DXR*

A partir da busca através de palavras chaves do gene *DXR* (1-deoxi D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase) no banco de dados do Projeto Genoma Café, foram obtidas 22 seqüências as quais geraram dois contigs. A clusterização demonstrou maior expressão em bibliotecas de cDNA de cultura de células e tecidos (Tabela 9).

Tabela 9 – Seqüências genômicas expressas do gene *DXR*. Bibliotecas do Genoma Café foram agrupadas de acordo com tecidos ou condições fisiológicas.

Contig	Total de ESTs	Bibliotecas					
		Frutos e Flores	Folhas	Estresse hídrico	Hipocotilo	Sementes germinando	Cultura de células e tecidos
1503	20	4	2	2	1	5	6
10351	2	0	1	1	0	0	0

O alinhamento entre os contigs 1503 e 10351 através do programa Blast, na página do Projeto Genoma Café, mostrou identidade de 97%, e-value: 0.0. Utilizando o programa Sequencher 4.1.4. foi possível a clusterização dos contigs 10351 e 1503 sem alterar os parâmetros do programa (Figura 9). O alinhamento pelo BioEdit das seqüências de nucleotídeos e de sua tradução em aminoácidos mostrou grande similaridade na região N-terminal de alinhamento, no entanto, na região C-terminal o programa BioEdit mostra a existência de “gaps” no contig 10351. Provavelmente ocorreu erro de leitura no final do seqüenciamento do contig 10351, pois, apenas uma seqüência forma o final desse contig (com baixa qualidade) e três seqüências formam o contig 1503 (qualidade alta) na região final do alinhamento entre os contigs. O BlastP do contig 10351 mostrou que não ocorre alinhamento com proteínas de outros organismos depositados no NCBI. Portanto, os contigs representam a mesma seqüência, isto é, apenas uma isoforma do gene *DXR*.

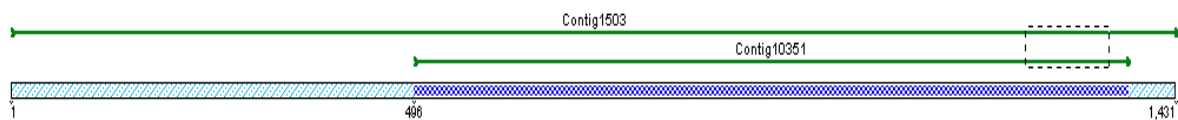


Figura 9 – Representação do alinhamento dos contigs 1503 e 10351 usando o software Sequencher.

O contig 1503 representa o gene completo de *DXR*, pois sua tradução assemelha-se a proteína de *DXR* de outros organismos, com cerca de 475 aminoácidos. O alinhamento foi conservado tanto nas extremidades N-terminal e C-

terminal com a proteína de *Lycopersicon esculentum* (AF3317051), *Nicotiana tabacum* (ABH089641), *Hevea brasiliensis* (ABD927021).

Através da comparação realizada pelo BlastP da seqüência deduzida de aminoácido verifica-se que o contig 1503 alinha-se a proteína DXR de *Lycopersicon esculentum*, com e-value: 0.0, identidade de 87%. Apresenta similaridade ao domínio para 1-deoxi D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase (pfam02670), com e-value: 9e-136 e alinhamento de 100%. Foram selecionadas seqüências de DXR de diferentes organismos para montagem de dendograma pelo Programa Mega 3.1 (Figura 10).

Não foi possível localizar seqüências de direcionamento para cloroplasto e mitocôndrias através do programa chloroP.

A busca de seqüências de ESTs de DXR no banco HarvEST de *C. canephora* resultou em 4 seqüências, três formaram um contig. A clusterização demonstrou maior expressão em endosperma e perisperma. O BlastX mostrou alinhamento parcial com as seqüências de DXR depositadas no NCBI (Tabela 10).

Usando as seqüências de *C. canephora* obtidas no banco de dados HarvEST foi realizado o alinhamento através do programa Blast dentro do banco de dados do Projeto Genoma Café. As seqüências do contig 1017 e singlet 11167 mostraram e-value: 0.0, e-179 e identidade 97%, 91% respectivamente com DXR. Com o programa Sequencher foi feita a clusterização do contig 1503 (plataforma Genoma Café) e 1017 (plataforma HarvEST) (Figura 11). O singlet 11167 (plataforma HarvEST) não se agrupou aos contigs. Portanto, assim como o banco do Genoma Café o banco HarvEST indica a presença de apenas uma isoforma de DXR.

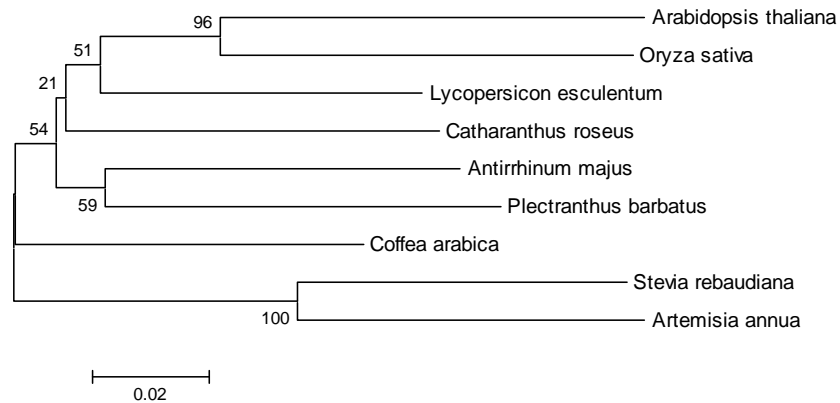


Figura 10 – Dendrograma filogenético de *DXR* de *Coffea*. Sequências de aminoácidos foram alinhadas usando Mega 3.1. As seqüências foram obtidas através do NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *Lycopersicon esculentum* AAK96063.2; *Catharanthus roseus* AAF65154.1; *Antirrhinum majus* AAW28998.1; *Plectranthus barbatus* AAR99081.1; *Stevia rebaudiana* CAD22156.1; *Arabidopsis thaliana* AAM61343.1; *Artemisia annua* AAD56391.2; *Oryza sativa* NP_908379.1.

Tabela 10 – Análise das seqüências de *DXR* na plataforma HarvEST.

Gene	Contig ou Singlet	Total de ESTs	Bibliotecas		tamanho da seqüência traduzida	Seqüência similar ¹
			perisperma e endosperma	folha jovem		
<i>DXR</i>	1017	3	3	0	579	<i>Lycopersicon esculentum</i> ; e-value: e-101; identidade 91%
<i>DXR</i>	11167	1	0	1	790	<i>Picrorhiza kurrooa</i> ; e-value: 3e-18; identidade 76%

¹similaridade no BlastX do NCBI. Números de acesso: *Lycopersicon esculentum* (AF3317051); *Picrorhiza Kurrooa* (ABC745661).

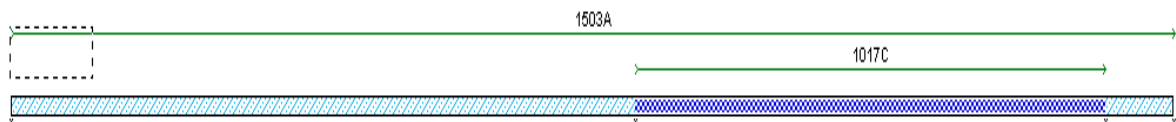


Figura 11 – Representação do alinhamento dos contig 1503 (Genoma Café) e contig 1017 (plataforma HarvEST) usando o software Sequencher.

5.1.4 Análise *in silico* de *HMGR*

Através da busca por palavra chave para o gene *HMGR* (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductase) no banco de dados do Projeto Genoma Café, foram obtidas 13 seqüências, que originaram dois contigs incompletos e três singlets (Tabela 11). O contig *HMGR* 6749 e o singlet CA-IC1-011 apresentaram similaridade com a região N-terminal de proteínas de genes de *HMGR* de diversos organismos, enquanto o contig *HMGR* 6175 e singlets CA-FB2-069 e CA-FB2-011 apresentam similaridade com a região C-terminal. As seqüências apresentaram maior expressão em bibliotecas de cDNA de flores e frutos (Tabela 11).

O Contig 6749 é formado por oito ESTs. A comparação da seqüência traduzida demonstra que ele está completo na região N-terminal. O alinhamento ocorre do primeiro até o aminoácido 267 de proteínas homólogas. Entretanto, o tamanho das seqüências homólogas é em torno de 604 aminoácidos, indicando que o contig está incompleto na região C-terminal. O contig apresenta similaridade ao gene *HMGR* de vários organismos. O melhor alinhamento observado foi com *Nicotiana tabacum* (AAB877271) com e-value: $2e-102$ e identidade de 73%.

Tabela 11 – Seqüências genômicas expressas do gene *HMGR*. Bibliotecas do Genoma Café foram agrupadas de acordo com tecidos ou condições fisiológicas.

Contig ou singlet	Total de ESTs	Bibliotecas		
		folhas	Flores e frutos	Cultura de células e tecidos
6749	8	2	6	0
6175	2	0	0	2
CA-IC1-011	1	0	0	1
CA-FB2-069	1	0	1	0
CA-FB2-011	1	0	1	0

O alinhamento entre o contig 6749 com o singlet CA-IC1-011 através do programa Blast na página do Projeto Genoma Café, mostrou e-value: $1e-21$ e identidade de 74%. As seqüências de aminoácidos foram comparadas no programa BioEdit, sendo observada diferenças nos resíduos da tradução do contig 6749 e do singlet CA-IC1-011. Usando o programa Sequencher não foi possível a união do

singlet ao contig. No entanto, o contig 6749 é formado por várias seqüências de alta qualidade, provavelmente o singlet não se agrupou ao contig 6749 devido à baixa qualidade no seu sequenciamento. O BlastP mostrou que o singlet CA-IC1-011 possui melhor alinhamento com seqüências de *HMGR* de *Eucommia ulmoides* (AAV540511), tendo e-value: $7e-46$, identidade de 79%. O BlastP não mostrou semelhança do singlet a qualquer domínio.

O contig 6175 é formado por dois ESTs. Análise no BlastX mostrou que o contig possui e-value: $4e-93$, identidade 93% com o gene *HMGR* de *Morus alba*, alinhando o primeiro aminoácido do contig ao aminoácido 400 da proteína, no entanto, o alinhamento está completo na região C-terminal.

Sem alterar os parâmetros de qualidade estabelecidos pelo programa Sequencher foi possível a clusterização dos singlets CA-FB2-069 e CA-FB2-011, para formação do contig 000 (Figura 12). Há apenas 12 bases distintas entre os contigs na região em que ocorre o alinhamento. O programa BlastX do NCBI mostrou que o contig 000 começa o alinhamento em torno do aminoácido 299 de proteínas homólogos de *HMGR*, estando completo na região C-terminal.

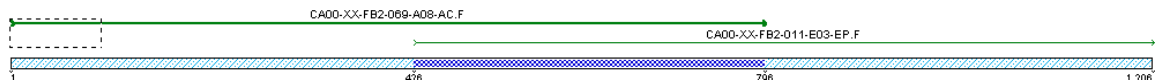


Figura 12 – Representação do alinhamento dos singletons CA-FB2-069 e CA-FB2-011 formando o contig 000 usando o software Sequencher.

O alinhamento entre o contig 6175 e os singletons CA-FB2-011 e CA-FB2-069 através do programa Blast, na página do Projeto Genoma Café, mostrou e-value: $7e-70$, identidade 76% e e-value: $8e-55$, identidade 75% respectivamente. No entanto, o contig 6175 não se une aos singletons CA-FB2-069 e CA-FB2-011 mesmo abaixando os parâmetros de qualidade estabelecidos pelo programa Sequencher. O programa BioEdit mostrou diferenças entre os nucleotídeos do contig 6175 e o contig 000. Portanto, o contig 6175 e o contig 000 provavelmente representam duas isoformas do gene *HMGR*. O programa BlastP mostrou que os contigs 6749, 6175 e 000 apresentam domínio para 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductase (cd00643, cd00365, pfam00368 e COG1257). Foram

selecionadas seqüências de *HMGR* de diferentes organismos para montagem de dendograma pelo Programa Mega 3.1 (Figura 13).

As regiões N-terminal e C-terminal da tradução de *HMGR* de *Coffea* são conhecidas, no entanto, no meio da seqüência nota-se a falta de aminoácidos. Com os dados *in silico* não foi possível determinar a seqüência completa do gene *HMGR* de *Coffea*. Foi realizado uma série de reações de PCR (Seção 5.2.3.1 Figura 19) para verificar a complementariedade dos contigs e o possível número de isoformas de *HMGR* em *Coffea*.

O programa Clorop não indicou que as seqüências apresentam peptídeo de direcionamento para cloroplasto.

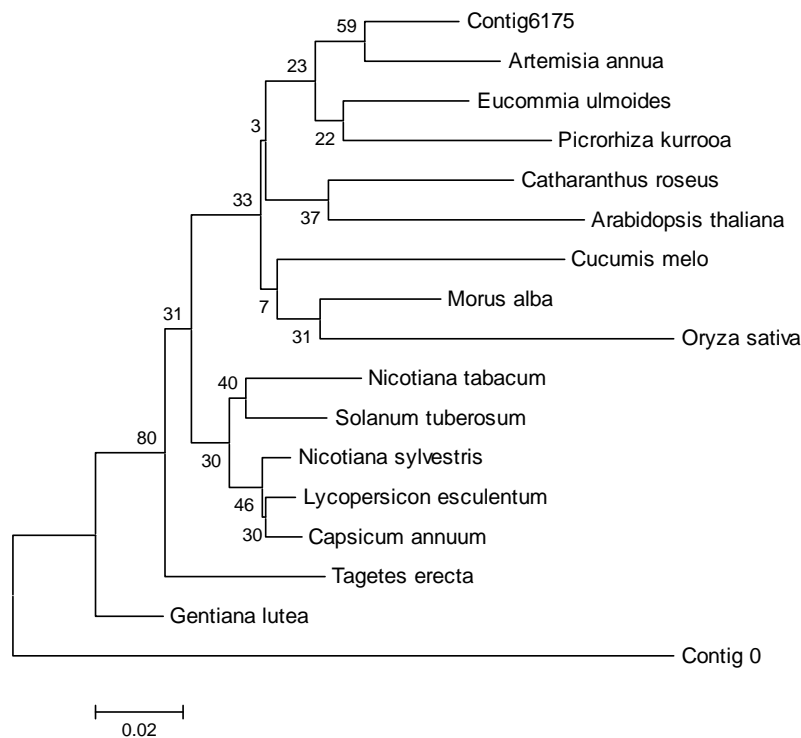


Figura 13 – Dendograma filogenético de *HMGR* de *Coffea*. Sequências de aminoácidos foram alinhadas usando programa Mega 3.1. As seqüências foram obtidas através do NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *Nicotiana tabacum* AAB87727.1; *Gentiana lutea* BAE92730.1; *Solanum tuberosum* (potato) Q41438; *Morus alba* AAD03789.1; *Lycopersicon esculentum* AAB62581; *Capsicum annuum* AAD28179.1|AF110383_1; *Catharanthus roseus* Q03163; *Arabidopsis thaliana* NP_177775.2]; *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) NP_001062221.1, *Eucommia ulmoides* AAV54051.1; *Tagetes erecta* AAC15475.1; *Artemisia annua* AAA68965.1; *Picrorhiza kurrooa* ABC74565.1; *Cucumis melo* BAA36291.1.

Nas análises de ESTs de *HMGR* de *C. canephora* no banco de dados HarvEST, foram obtidas nove seqüências, as quais geraram um contig e dois singletons. As seqüências tiveram maior expressão em endosperma, perisperma e fruto inteiro. O BlastX mostrou alinhamento parcial com as seqüências de *HMGR* depositadas no NCBI (Tabela 12).

O Blast local realizado dentro do banco de dados do Projeto Genoma Café, mostrou que as seqüências do banco HarvEST apresentam similaridade ao contig 6175 e aos singletons CA-FB2-069, CA-FB2-011 (Tabela 6), mas não ao contig 6749. O programa Sequencher confirmou esses resultados, com a clusterização do contig 000 (Genoma Café) ao contig 5087 (HarvEST) e ao singlet 13713 (HarvEST). O contig 6175 (Genoma Café) foi clusterizado ao singlet 11805 (HarvEST) (Figura 14 e 15), indicando a presença de 2 isoformas do gene.

Tabela 12 – Análise das seqüências de *HMGR* na plataforma HarvEST.

Gene	Contig ou Singletons	Total de ESTs	Perisperma e endosperma	Cereja inteira	Tamanho das seqüências traduzidas	Seqüência similar ¹
<i>HMGR</i>	5087	7		7	1062 pb	<i>Nicotiana slyvestris</i> ; e-value: 2e-101; identidade 91%
<i>HMGR</i>	11805	1	1		573 pb	<i>Eucommia ulmoides</i> ; e-value: 8e-84; identidade 90%
<i>HMGR</i>	13713	1		1	131pb	<i>Nicotiana attenuata</i> ; 2e-7; identidade 92%

¹similaridade no BlastX do NCBI. Números de acesso: *Nicotiana slyvestris* (CAA451811); *Eucommia ulmoides* (AVV540511); *Nicotiana attenuata* (AAO855541).

Tabela 13 – Comparação dos contigs de *HMGR*.

contig ou singletons do banco HarvEST	contig ou singletons do banco do Projeto Genoma Café	e-value – identidade
5087	6175	8e-25 - 92%;
	CA -FB2-069	1e-19 - 75%;
	CA -FB2-011	3e-31 - 100%
11805	6175	e-122 – 97%
	CA -FB2-069	1e-78 – 75%
	CA -FB2-011	4e-16 – 78%
13713	6175	5e-51 – 95%
	CA-FB2-069	1e-48 – 94%
	CA-FB2-011	3e-02 – 78%

Nota : Resultado do Blast de sequências do Harvest no Banco de dados do Genoma Café.

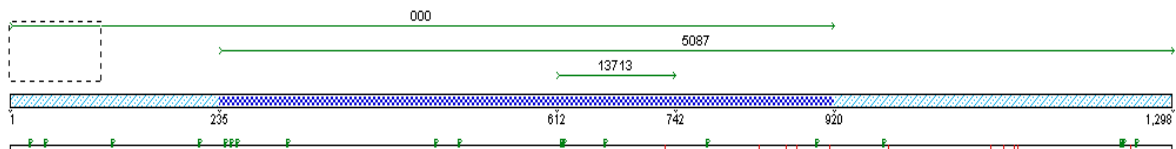


Figura 14 – Representação do alinhamento do contig 000 (Genoma Café) contig 5087 e singlet 13713 (HarvEST) usando o software Sequencher.

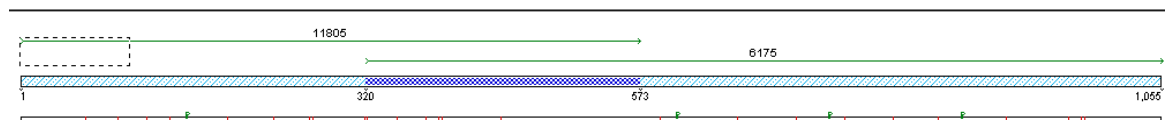


Figura 15 – Representação do alinhamento do contig 6175 (Genoma Café) e singlet 11805 (HarvEST) usando o software Sequencher.

5.2 ANÁLISE MOLECULAR DE *DXR* E *HMGR*

5.2.1 Sequenciamento das Sondas

Foi feito o sequenciamento das sondas obtidas através do produto da PCR dos genes *DXR* e *HMGR* em aparelho Mega Bace 1000. Foram sequenciadas as sondas *DXR/DXRC*, *HMGR6749/6749C*, *HMGR0/0C*, *HMGR6175/6175C*; *HMGR6749/0C* (dados não mostrados). As seqüências obtidas

foram analisadas através do programa BlastX no NCBI o qual confirmou a identidade dos fragmentos amplificados aos genes *DXR* e *HMGR*.

5.2.2 Análise Molecular de *DXR*

5.2.2.1 Análise de *DXR* por Southern Blot

Foi feito Southern Blot para caracterização genômica de *DXR* em *C.arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*. A hibridização com *DXR* quando o DNA foi digerido com *DraI* apresentou bandas intensas com peso molecular em torno de 0,9 Kb e 2Kb e uma terceira pouco perceptível com cerca de 1,85 Kb para *C. arabica* e *C. eugenioides*, já para *C. canephora* obteve-se além das bandas de 0,9Kb, 2,0Kb e 1,85Kb uma quarta banda com peso molecular maior que 2,0Kb. A membrana com o DNA digerido com *HindIII* obteve-se duas bandas intensas com peso molecular em torno de 1,8Kb e 1,3Kb e uma terceira de 1,7Kb para *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* (Figura 16). Utilizando o programa Neb cutter e a seqüência de nucleotídeos do contig1503 verificou-se que a enzima *DraI* possui um sítio de restrição e a enzima *HindIII* possui 2 sítios de restrição em *DXR* (Figura 17B). Com o programa Intron Finder Results foram obtidas 11 seqüências para íntrons em *DXR*. As diversas bandas existentes na membrana hibridizada com *DXR* não excluem a possibilidade do gene em *Coffea* possuir apenas uma isoforma, como ocorre em outras plantas.

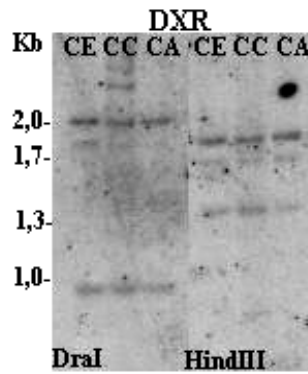


Figura 16 – Análise por Southern Blot do DNA genômico de *C. eugenioides* (CE), *C. canephora* (CC) *C. arabica* (CA), digerido com *DraI* e *HindIII*. Membrana hibridizada com a sonda de *DXR*.

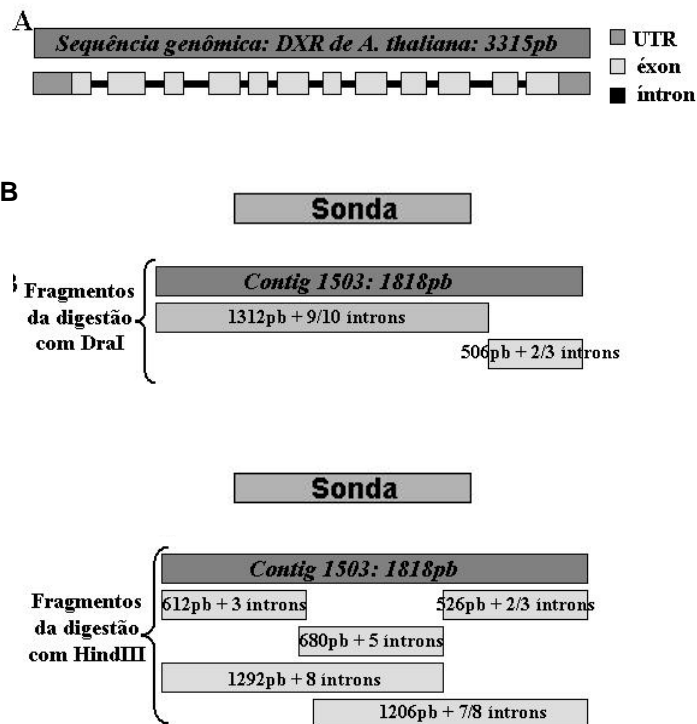


Figura 17 – Seqüência de *A. thalina* e de *Coffea* para análise do Southern Blot. A) Éxons, íntrons e UTR de *Arabidopsis thaliana*. B) Fragmentos da digestão do contig 1503 de *Coffea* com *DraI* e *HindIII*.

5.2.2.2 Análise da expressão de *DXR* por Northern Blot

Membranas de Northern Blot contendo, RNA de polpa, perisperma, endosperma em diferentes estágios de desenvolvimento do grão e diferentes tecidos

de *C. arabica* safra 2003/2004 e 2005/2006 foram hibridizadas com a sonda de *DXR* (Figura 18).

Transcritos do gene *DXR* foram detectados na fase inicial do desenvolvimento de perisperma. Com menor intensidade também foram observados transcritos na fase final do desenvolvimento da polpa e na fase inicial do desenvolvimento de endosperma (Figura 18). Quando comparado à transcrição em diferentes tecidos de *Coffea* observa-se maior expressão em folha jovem exposta a luz e botão floral jovem e maduro. Não foram detectados transcritos de *DXR* em ramo, fruto inteiro e raiz e houve pouca transcrição em folha expandida exposta a luz (Figura 19).

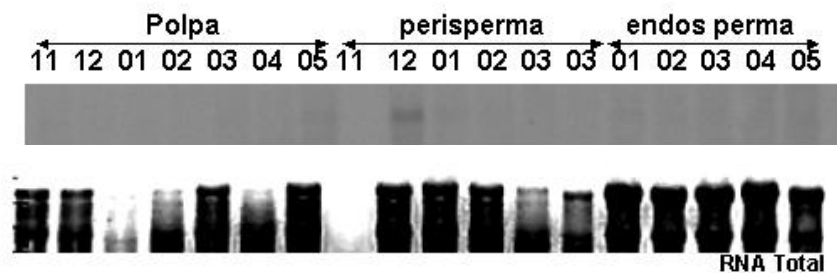


Figura 18 – Análise por Northern blot do RNA de polpa, perisperma e endosperma de *C. arabica*. Membranas hibridizadas com sondas de *DXR* com dCTP^αP³². Números de 11 a 06 representam respectivamente os meses de coleta de material (novembro a junho). RNA Total: gel das amostras para comparação da concentração utilizada.

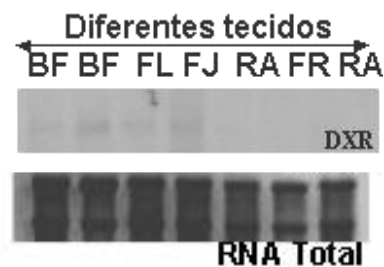


Figura 19 – Análise por Northern blot do RNA de BF (botão floral jovem), BF (botão floral maduro), FL (folha expandida luz), FJ (folha jovem luz), RA (ramo), FR (fruto), RA (raiz). Membranas hibridizadas com sondas de *DXR*. RNA Total: gel das amostras para comparação da concentração utilizada.

5.2.3 Análise Molecular de *HMGR*

5.2.3.1 Seqüências amplificadas de *HMGR*

Como era esperada a presença de duas isoformas para *HMGR*, dados obtidos na análise *in silico*, oligonucleotídeos foram desenhados para verificar se os contigs seriam complementares. Os produtos de amplificação da PCR feito com as possíveis combinações dos oligonucleotídeos, para *DXR* e *HMGR*, foram submetidos à eletroforese (gel 1% de agarose) (Figura 20). Os fragmentos amplificados para *HMGR* 6749/6749C, *HMGR* 0/0C, *HMGR* 6175/6175C, 6749/0C foram correspondentes ao tamanho esperado. Para 6749/6175C não houve amplificação de fragmento algum.

Os produtos amplificados indicam que o contig *HMGR* 000 é provavelmente a região 3' do contig *HMGR* 6749, e foi chamado de *CaHMGR1*. O contig 6175 foi denominado *CaHMGR2*. Pois, quando usado, na reação de PCR, os oligonucleotídeos 6749, 0C e 6175C o tamanho do fragmento amplificado foi correspondente ao tamanho esperado para os oligonucleotídeos 6749/0C.

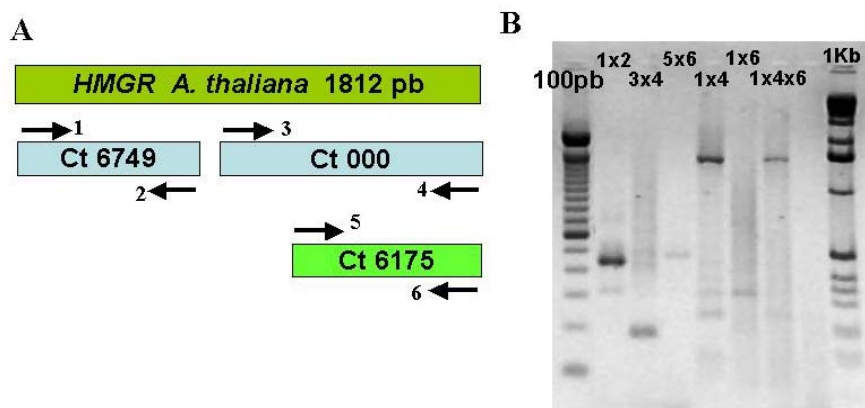


Figura 20 – Amplificação das isoformas de *HMGR* de café. A) Representação das isoformas encontradas e sua posição com relação a seqüência de *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*. Numeração nas setas indicam oligos utilizados para amplificação dos fragmentos. B) Amplificação de *HMGR* de café. Números representam combinação dos oligos utilizados. Fragmentos amplificados de acordo com o tamanho esperado: 1x2: *HMGR*6749/6749C= 450 pb; 3x4: *HMGR* 0/0C=186 pb; 5x6: *HMGR* 6175/6175C=483 pb; 1x4: 6749/0C=1556pb; 1x6: 6749/6175C=1694pb; 1x4x6: 6749/0C/6175C=1556pb.

5.2.3.2 Análise de *HMGR* por Southern Blot

Foi feito Southern Blot para caracterização genômica de *HMGR* em *C.arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*. As membranas hibridizadas com *CaHMGR1* e com o DNA digerido com *DraI* verificou-se um padrão similar de bandas, de mesma intensidade, mas com tamanho diferente para as três espécies de *Coffea*. Também foram observadas um maior número de bandas hibridizadas em *C. arabica*. Quando o DNA foi digerido com *HindIII* apresentou bandas com fragmentos entre 3,0Kb e 3,5Kb para *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* (Figura 21).

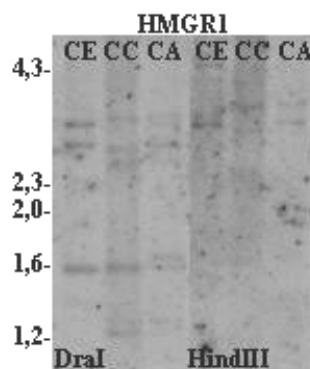


Figura 21 – Análise por Southern Blot do DNA genômico de *C. eugenioides* (CE), *C. canephora* (CC) *C. arabica* (CA), digerido com *DraI* e *HindIII*. Membranas hibridizadas com a sonda de *CaHMGR1*.

5.2.3.3 Análise da expressão de *HMGR* por Northern Blot

Membranas de Northern Blot contendo, RNA de polpa, perisperma, endosperma em diferentes estágios de desenvolvimento do grão e diferentes tecidos de *C. arabica* safra 2005/2006 foram hibridizadas com a sonda de *DXR* e as duas isoformas de *HMGR*. Transcritos da isoforma *CaHMGR1* foram detectados em toda fase de desenvolvimento da polpa, fase inicial do perisperma e endosperma (Figura 22). Transcritos da isoforma *CaHMGR2* foram detectados em polpa, perisperma e endosperma, em todas as fases de desenvolvimento do fruto (Figura 22). Os resultados sugerem uma expressão constitutiva da isoforma *CaHMGR2*, enquanto a isoforma *CaHMGR1* teria indução específica. Quando comparado à transcrição em

diferentes tecidos de *Coffea* observa-se maior expressão em folha jovem exposta a luz e botão floral jovem e maduro para *CaHMGR1*. Não foram detectados transcritos de *CaHMGR1* em ramo, fruto inteiro e raiz e houve pouca transcrição em folha expandida exposta a luz. Transcritos da isoforma *CaHMGR2* forma detectados em todos os tecidos analisados, botão floral jovem, botão floral maduro, folha jovem luz, folha expandida luz, ramo, fruto, raiz, fruto inteiro (Figura 23).

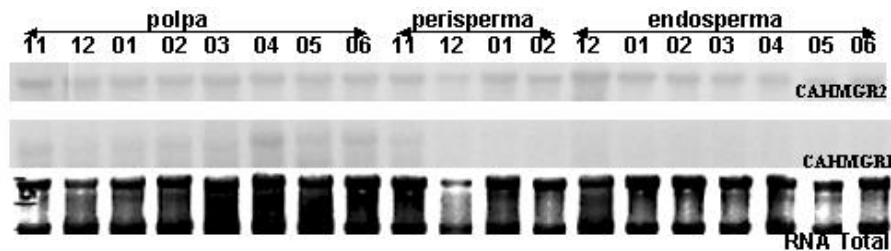


Figura 22 – Análise por Northern blot do RNA de polpa, perisperma e endosperma de *C. arabica*. Membranas hibridizadas com sondas de *CAHMGR1* e de *CAHMGR2* marcadas com dCTP α^{32} P. Números de 11 a 06 representam respectivamente os meses de coleta de material (novembro a junho). RNA Total: gel das amostras para comparação da concentração utilizada.

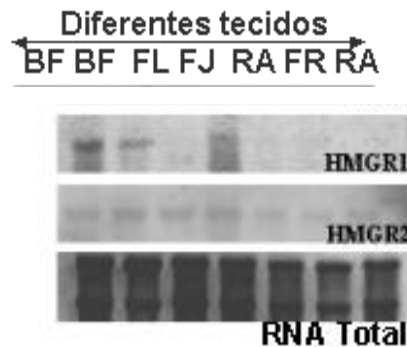


Figura 23 – Análise por Northern blot do RNA de BF (botão floral jovem), BF (botão floral maduro), FL (folha expandida luz), FJ (folha jovem luz), RA (ramo), FR (fruto), RA (raiz). Membranas hibridizadas com sondas de *CAHMGR1* e *CAHMGR2*. RNA Total: gel das amostras para comparação da concentração utilizada.

6 DISCUSSÃO

As principais enzimas da via plastídica e citosólica de síntese de isoprenóides são respectivamente DXR e HMGR (HERMMERLIN et al., 2003; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN et al., 2001). No entanto, *IDS* (MEP) e *MPDC* (MVA) também são importantes, por catalisar a formação de IPP (isopentenil difosfato), a molécula que dará origem a todos os compostos isoprenóides. O presente trabalho foi iniciado visando um maior entendimento dos genes que caracterizam estas enzimas, através da análise *in silico* das seqüências a partir de dois bancos de dados de ESTs disponíveis e complementação com análise *in vivo*. A clusterização das seqüências do banco de dados do Genoma Café formaram a seqüência completa que representa *IDS* em *Coffea*. A seqüência completa de *MPDC* só foi possível após clusterização das seqüências de *MPDC* do banco do Projeto Genoma Café com as seqüências do banco HarvEST (Seção 5.1.2 Figura 18). Através de análises *in silico* verificou-se que *IDS* e *MPDC* de *Coffea* possuem apenas uma isoforma. Em *A. thaliana* *IDS* possui uma isoforma, já, *MPDC* possui duas isoformas (LANGE; GHASSEMIAN, 2003). Os dendogramas (Seção 5.1.2 Figura 6 e 7) demonstram o agrupamento do contig de *MPDC* de *Coffea* a apenas uma das isoformas de *A. thaliana*. O grande número de ESTs dos dois bancos de dados avaliados (aproximadamente 200 mil) e o resultados de clusterização indicam a presença de somente uma isoforma *MPDC* para *Coffea* spp.

Buscas realizadas no banco de dados do projeto Genoma Café mostraram que cDNA de *DXR* em *Coffea* possui cerca de 1431 pb ou 476 aminoácidos, com alta homologia com diversos organismos depositados no NCBI. As análises *in silico* mostraram que *DXR* em *Coffea* possui apenas uma isoforma, no entanto, a membrana de Southern blot hibridizada com *DXR* apresentou maior número de bandas que o esperado quando digerida com *DraI*. A partir do banco de dados do NCBI verificou-se que a seqüência genômica de *A. thaliana* (AAM61343.1) possui 3315 pb com 11 íntrons (Figura 17A), com cerca de 100pb cada íntron e seqüência de cDNA com 1814pb e 604 aminoácidos. A presença dos íntrons com possíveis sítios de restrição para enzima *DraI* pode explicar o padrão de banda encontrado, similar ao padrão de bandas verificado para *HindIII*. Neste último observa-se um padrão esperado devido aos sítios de clivagem da enzima. A

presença do padrão de banda similar de hibridização de *DXR* em três espécies de *Coffea*, com o DNA sendo clivado com duas enzimas diferentes indica que o gene foi pouco modificado durante a evolução da espécie. Hans *et al.* (2004), Carretero-Paulet *et al.* (2002) e Rodriguez-Concepción *et al.* (2001), verificaram através de seqüências genômicas e seqüências expressas (ESTs) que há apenas uma única cópia de *DXR* em milho (*Zea mays*) assim como encontrado para *Coffea* neste trabalho.

Transcritos do gene *DXR* foram detectados na fase inicial do desenvolvimento de perisperma, com menor intensidade também foram observados na fase final do desenvolvimento da polpa e na fase inicial do desenvolvimento de endosperma. Quando comparado à transcrição em diferentes tecidos de *Coffea* observa-se maior expressão de *DXR* em folha jovem exposta a luz e botão floral jovem e maduro. Não foram detectados transcritos de *DXR* em ramo, fruto inteiro e raiz e houve pouca transcrição em folha expandida exposta a luz. Estes resultados corroboram com os obtidos através da análise *in silico* do banco do Genoma Café, que apresentou seqüências de ESTs em frutos, flores e folhas, assim como os dados obtidos no banco HarVEST forneceu seqüências de ESTs provenientes de perisperma e endosperma. Engprasert *et al.* (2004), verificaram que *DXR* é fortemente expresso em folhas, pouco em caule e apenas quantidades mínimas em raiz de *Coleus forskohlii*. Carretero-Paulet *et al.*, (2002), observaram baixo nível de transcritos em folha expandida, raiz e ramo.

Através de análise *in silico*, Engprasert *et al.* (2004), verificaram que *DXR* de *Coleus forskohlii* apresenta 1407 nucleotídeos, codificando um peptídeo de 469 aminoácidos, o programa ChloroP identificou um peptídeo sinal, também presente em outras seqüências de plantas comparadas. Utilizando as seqüências de aminoácidos de diversas plantas obtidas no NCBI (dados não mostrados) o programa ChloroP mostrou que alguns organismos, assim como *Coffea* não possuem seqüência de predição para plastídeo. No entanto, a não predição de peptídeo sinal para plastídeo em *DXR* de *Coffea* não exclui a possibilidade do gene estar envolvido na via plastídica de síntese de isoprenóides, uma vez que o programa ChloroP mostra o sinal de predição baseando-se em seqüências já identificadas. Para os organismos que possuem seqüência com predição para cloroplasto o score dado pelo programa ChloroP é superior a 0,5. A análise com gene *DXR* de *Coffea* teve score de 0.49, similar ao gene de *Hevea*, que através da

análise pelo ChloroP também não foi possível a identificação do peptídeo sinal. Estes resultados indicam que pode haver modificações no peptídeo sinal de *DXR* de *Coffea*, não detectado pelos programas de análise *in silico*.

O dendograma gerado para o gene *DXR* mostrou similaridade das seqüências de café com seqüências de *Solanaceas*. Segundo Hoeven *et al.*, (2002), família *Rubiaceae* (café) e *Solanaceae* (tomate, pimenta) divergiram a aproximadamente 50 milhões de anos, diversos fatores genéticos e botânicos demonstram a similaridade entre essas duas espécies.

Para *HMGR* a análise dos dados *in silico* não permitiu verificar o número de isoformas. A amplificação de fragmentos de *HMGR* através de PCR com diferentes combinações de oligonucleotídeos demonstrou a existência de duas isoformas, *CaHMGR1* e *CaHMGR2*. A seqüência genômica de *A. thaliana* obtida através do NCBI possui 3034pb com 3 íntrons e a de *Oryza sativa* possui 5986pb com 3 íntrons. Os dados *in silico* indicaram que em *Coffea* o contig000 que corresponde a região C-terminal da isoforma *CaHMGR1* possui 3 íntrons e o contig 6749 que corresponde a região N-terminal não possui íntrons. Os contigs de *HMGR* de *Coffea* não apresentaram sítios de restrição para as enzimas *DraI* e *HindIII*, no entanto, isso não exclui a possibilidade de possuírem sítios de restrição na seqüência dos íntrons ou na região UTR. Portanto, de acordo com o padrão de bandas observado pelo Southern blot e o dendograma filogenético, *HMGR* em *Coffea* possui duas ou mais isoformas. Segundo Bach *et al.* (1991); Weisscnborn *et al.*, (1995), o gene *HMGR* em plantas é codificada por pelo menos duas isoformas.

A isoforma *CaHMGR1* apresentou transcritos em toda fase de desenvolvimento da polpa, fase inicial do perisperma e endosperma. Transcritos da isoforma *CaHMGR2* foram detectados em polpa, perisperma e endosperma, em todas as fases de desenvolvimento do fruto. Os resultados sugerem uma expressão constitutiva da isoforma *CaHMGR2*, enquanto a isoforma *CaHMGR1* teria indução específica. Quando comparado à transcrição em diferentes tecidos de *Coffea* observa-se maior expressão em folha jovem exposta a luz e botão floral jovem e maduro para a isoforma *CaHMGR1*. Não foram detectados transcritos de *CaHMGR1* em ramo, fruto inteiro e raiz e houve pouca transcrição em folha expandida exposta a luz. Transcritos da isoforma *CaHMGR2* foram detectados em todos os tecidos analisados, botão floral jovem, botão floral maduro, folha jovem luz, folha expandida luz, ramo, fruto, raiz, fruto inteiro. Os resultados *in vivo* de *CaHMGR1* corroboram

com os obtidos *in silico* através do banco do Genoma Café, que apresentou seqüências de ESTs em flores e frutos. Entretanto para *CaHMGR2* foi observado expressão *in silico* principalmente em bibliotecas provenientes de cultura de células e tecidos. Segundo Stermer et al. (1994); Weisscnborn (1995) isoformas de *HMGR* são diferentemente expressas, dependendo das condições fisiológicas. Hemmerlin et al., (2003), obtiveram duas isoformas para *HMGR* em tabaco, sendo a isoforma 1 (64 kDa) mais expressa em relação a isoforma 2 (63 kDa).

Segundo, Croteau, et al., (2000) *HMGR* em plantas é altamente regulada. Em muitos casos, uma pequena família de genes, cada uma contendo múltiplos membros, codificam para esta redutase. Esta família de genes é expressa em modelo complexo, com genes individuais exibindo expressão constitutiva, ou específica no desenvolvimento de tecidos, ou ainda induzida por fitorreguladores. Transcritos de *HMGR* podem também ser induzidos por ferimentos ou infecção por patógenos. Segundo, Narita; Gruíssem (1989); Yang et al. (1991) a regulação diferenciada do gene *HMGR*, tanto espacial como temporal na via do mevalonato pode estar associada a diversidade dos metabólitos produzidos. Segundo Liao et al., (2004) *HMGR* em *A. thaliana* possui duas isoformas, no entanto, tomate pode possuir mais de duas isoformas. O padrão de bandas obtidas no Southern blot de *CaHMGR1*, também pode representar a presença de um número maior de isoformas identificados neste trabalho.

As seqüências do banco Genoma Café mostraram maior número de ESTs codificando os genes da via MEP e poucas ESTs para os genes da via MVA dos genes selecionados. Estes resultados corroboram com os obtidos *in vivo*, onde foi observado grande expressão de *DXR* (via MEP), na fase inicial do desenvolvimento de perisperma. Assim como observado neste estudo, Dudareva et al., (2005) estudaram a expressão de genes da via de síntese de isoprenóides em diferentes tecidos de flores de boca-de-leão. Verificaram que ocorre grande expressão de *DXR* em flores de boca-de-leão durante a biossíntese de monoterpenos e sesquiterpenos, já *HMGR* foi pouco expresso. Segundo Chye et al., (1992); Narita; Gruíssem (1989) diferentes genes são expressos em diferentes partes da planta em diferentes estágios do desenvolvimento em resposta a vários estresses.

Apesar dos resultados de expressão *in vivo* serem consistentes com dados bioquímicos obtidos na análise da concentração de diterpenos em tecidos de

café (dados não mostrados), os genes estudados apresentaram um sinal de hibridização fraco, o que dificulta a análise do padrão de expressão destes genes via Northern blot. Técnicas mais sensíveis para detecção da expressão, como RT PCR poderão auxiliar para elucidar melhor a ação destes genes na biossíntese de isoprenoides e de diterpenos. No entanto, a expressão diferencial observada neste estudo, reforça a importância das duas vias de formação de isoprenóides, e os resultados *in silico* corroboram com as análises *in vivo* e ambos estão de acordo com a literatura.

7 CONCLUSÕES

- Foi caracterizado *in silico* o gene de *MPDC* através da clusterização das seqüências dos dois bancos de dados analisados.
- O número de isoformas dos genes analisados, *DXR*, *IDS* e *HMGR* de *Coffea* são os mesmos relatados para *Arabidopsis thaliana*, com exceção de *MPDC*.
- Através da análise *in silico* e *in vivo* foi possível identificar duas isoformas (75% de identidade) de *HMGR*.
- A isoforma *CaHMGR2* apresenta expressão constitutiva, enquanto a isoforma *CaHMGR1* teria indução específica.
- O gene *DXR* (via MEP) apresenta maior transcrição que o gene *HMGR* (via MVA) tanto através da análise dos dados obtidos *in silico* como *in vivo*.
- A análise *in silico* permitiu uma adequada predição do número de isoformas e da atividade do gene, no entanto é necessário a confirmação desses resultados *in vivo*, como demonstrado para os genes de *HMGR*.

8 PERPECTIVAS

Sequenciamento das duas isoformas de *HMGR*

Estudo *in vivo* de *IDS* e *MPDC*

Correlacionar a produção de cafestol e caveol com a inibição dos genes *DXR* e *HMGR*

Utilizar técnicas mais sensíveis para detecção da expressão, como RT PCR que poderão auxiliar no melhor entendimento da ação destes genes na biossíntese de isoprenóides e de diterpenos

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res**, v. 25, p. 3389-3402, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>.
- ANTONY, F.; COMBES, M. C.; ASTORGA, C.; BERTRAND B.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theor Appl Genet**, v. 104, p. 894-900, 2002.
- BACH, T. J.; WETTSTOLN, A.; BORONAT, A.; FORRO, A.; ENJUTO, M.; GRULSSOM, W.; NARITA, J. O. In Physiology and Biochemistry of Sterols. (PATTERSON, G. W.; and NOS, D. W., ed) **American Oil Chemists Society**, p. 29 – 49, 1991.
- BOEKSCHOTEN, M.V.; ENGEBERINK, M. F.; KATAN, M.B.; SCHOUTEN, E. G. Reproducibility of the serum lipid response to coffee oil in healthy volunteers, **Nutrition journal**, v. 2, p. 1-8, 2003.
- BOUVIER, F.; D'HARLINGUE, A.; SUIRE, C.; BACKHAUS, R.A.; CAMARA, B. Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. **Plant Physiol**, v. 117, p. 1423-1431, 1998.
- BRODY, J.R.; KERNY, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**. v. 36, p. 214-216, 2004.
- CAFÉ DO PARANA – Disponível em: <<http://www.pr.gov.br>>. Acesso em: 03 maio 2005.
- CAMARA, B.; BRANGEON, J. Carotenoid metabolism during chloroplast to chromoplast transformation in *Capsicum annum* fruit. **Planta**, v. 151, p. 359-364, 1981.
- CAMPOS, P. S.; QUARTIN, V.; RAMALHO, J. C.; NUMES, M.A. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold se, sensitivity in leaves of *Coffea* sp. **Plants. Plant Physiol**, v. 160, p. 283–292, 2003.
- CARRETERO-PAULET, L.; AHUMADA, I.; CUNILLERA, N.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; FERRER, A.; BORONAT, A.; CAMPOS, N. Expression and Molecular Analysis of the Arabidopsis DXR gene Encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C- methyl-D-Erythritol 4-phosphate pathway. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1581 – 1591, 2002.
- CARVALHO, L. M.; SILVA, E.M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conillon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p.411-416, 2001.

CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; CONSTABLE, A.; HUGGET, AC.; SCHILTER, B. The coffee-specific diterpenes cafestol and caveol against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1369-1375, 1998.

CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; CONSTABLE, A.; HUBET, AC.; SCHILTER, B. Cafestol and Kahwoel, two specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1155-1163, 2002.

CHANG, S.; PURYEAR J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol Biol**, v. 11, p. 113-116, 1993.

CHAPPELL, J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 46, p. 521 – 547, 1995.

CHAPPELL, J. The genetics and molecular genetics of terpene of sterol origami. **Curr Opin Plant Biol**, v. 5. p. 151-157, 2002.

CHYE, M.L.; TAN, C.T.; CHUA, N.H. Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: hmgr1 and hmgr3 are differentially expressed. **Plant Mol. Biol.** v. 19, p. 473-481, 1992.

CLARKE, R. J.; Green coffee processing. In: COFFEE: botany, biochemistry and production of beans and beverage, 1985. p. 230-250.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W .; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2000. p. 1250 –1268.

DECAZY, F.; AVELINO, J.; GUYOT, B.; PERRIOT, J. J.; PINED, C.; CILAS, C. Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. **Journal Food Science**, v. 68, p. 2356 – 2361, 2003.

DUDAREVA, N.; ANDERSSON, S.; ORLOVA, I.; GATTO, N.; REICHEL, M.; RHODES, D.; BOLAND, W.; GERSHENZON, J. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Plant Biology**, v. 102, n. 3, p. 933 – 938, 2005.

DUSSERT, S.; CHABRILLANCHE, N.; ROCQUELIN, G.; ENGELMANN, F.; LOPEZ, M.; HAMON, S. Tolerance of coffee (*Coffea spp.*) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition and cooling procedure. **Physiol. Plant**, v. 112, p. 495 – 504, p. 2001.

EISENREICH, W.; SCHWARZ, M.; CARTAYRADE, A.; ARIGONI, D.; ZENK, M. H.; BACKER, A. **Chemistry Biology**, v. 5, 221 – 233, 1998.

EMANUELSSON, O; NIELSEN, H; GUNNAR V. H. **ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites** **Protein Science**, v.8, p. 978-984, 1999.

EMBRAPA CAFÉ – Disponível em:

<http://www22.sede.embrapa.br/cafe/consorcio/home_4.htm>. Acesso em: 12 nov. 2005.

ENGPASERT, S.; TAURA, F.; SHOYAMA, Y. Molecular cloning, expression and characterization of recombinant 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Coleus forskohlii* Brig. **Plant Science**, 2004.

ENJUTO, M.; BACCELLS, L.; CAMPOS, N.; CAELLES, C.; ARRÓ, M.; BORONAT, A. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p. 927-931, 1994.

FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; NERY, F.; PINTO, N. A. V. D. **Caracterização da composição química de arábica e conillon**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal>>. Acesso em: 12 nov. 2005.

GUYOT, B.; GUEULE, D.; MANEZ, J. C.; PERRIOT, J. J.; GIRON, J.; VILLAIN, L. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica. **Plantat Recher Dév**, v. 3, p. 272 – 280, 1996.

HANS, J.; HAUSE, B.; STRACK, D.; WALTER, M.H. Cloning Characterization and Immunolocalization of Mycorrhiza-Inducible 1-Deoxy-D Xylulose 5-phosphate reductoisomerase in Arbuscule – containing cells of maize. **Plant Physiology**. v. 134, p. 614-624, 2004.

HERMMERLIN, A.; HOEFFLER, J. F.; MEYER, O.; TRITSCH, D.; KAGAN, I. A.; BILLIARDS, C. G.; ROHMER, M.; BACH, T. Cross-talk between the Cytosolic Mevalonate and the Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathways in Tobacco Bright yellow-2 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26666 – 26678, 2003.

ÍNTRON finder results. Disponível em: <www.sgn.cornell.edu>. Acesso em: 15 nov. 2006.

JORGENSEN, K.; RASMUSSEN A.V.; MORANT, M.; NIELSEN, A.H.; BJARNHOLT, N.; ZAGROBELNY, M.; BARK, S.; MOLLER, B.L.. Metabolite formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. **Plant Biology**. v. 8, p. 280-291, 2005.

JULLIARD, J. H. Biosynthesis of the pyridoxal ring (vitamin B₆) in higher plant chloroplasts and its relationship with the biosynthesis of the thiazole ring (vitamin B₁). **C. R. Acad. Sci. Series III**, v. 314, p. 285 – 290, 1992.

JULLIARD, J. H.; DOUCE, R. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B₁) in higher plant chloroplasts. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 2042 – 2045, 1991.

KEMSLEY, E. K.; RUAULT S.; WILSON R. H. Discrimination between *Coffea arabica* and *canephora* variant robusta beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 54, p. 321-326, 1995.

KHAN, N. A.; BROWN, J. B. The composition of coffee oils and its component fatty acids. **J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign**, v. 30, n. 12, p. 606-609, 1953.

KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. Diterpenes in coffee leaves. **Proceedings of the 17th ASIC Colloquium (Nairobi)**, p. 150-154, 1997.

KY, C. L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acid and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. acanephora* P. accessions. **Food Chemistry, Oxford**, v.75, n.2, p.223 – 230, 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. Mega 3.1 Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos. **Boletim do CEPA**, Curitiba, v.19, n.2, p. 319 - 340, 2001.

LANGE, B. M.; WILDUNG, M. R.; MCCASKILL, D; CROTEAU, R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 2100 – 2104, 1998.

LANGE, B. M.; CROTEAU, R. Isoprenoid Biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from peppermint. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 365, p. 170 – 174, 1999.

LANGE, B. M.; GHASSEMIAN, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 925 – 948, 2003.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; TROUSLOT, P.; CHARRIER, A. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Theor Appl Genets**, v. 94, p. 947 – 955, 1997.

LAULE, O.; FURHOLZ, A.; CHANG, H. S.; ZHU, T.; WANG, X.; HEIFETZ, P. B.; GRUISSEM, W.; LANGE, M. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Institute of Plant Sciences**, v. 100, n. 11, p. 6866 – 6871, 2003.

LEARNED, R.M.; CONNOLLY, E.L. Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**. v. 11, p. 499-511, 1997.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M.; CROTEAU, R. Defense mechanisms of conifers: Differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. **Plant Physiol.**, v. 96, p. 44-49, 1991.

LIN, C.; MUELLER, L.A.; CARTHY, M.C.; CROUZ ILHAT, D.; PETIARD, V.; TANKSLEY, S.D. Coffea and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed cherry transcripts. **Theor Appl genet.** p. 114-130, 2005.

LOIS, L. M.; CAMPO, N.; ROSA PUTRA, S.; DANIELSEN, K.; ROHMER, M.; BORONAT, A. Cloning and characterization of a gene from Escherichia coli encoding a transketolase-like enzyme that catalyses the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 2105 – 2110, 1998.

LOIS, L.M.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; GALLEG, F.C.N.; BORONAT, A. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xilulose 5-fosfato sintase. **Plant journal.**v. 22, p.503-513, 2000.

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (Coffea arabica L.)**. 2000. 95 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

LYONS, J. M; WHEATON, T. A.; PRATT, H. K. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. **Plant Physiol**, v. 39, p. 262 – 269, 1964.

MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and methofuran synthase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 8915-8920, 2001.

MANDEL, M.A.; FELDMANN, K.A.;HERRERA-ESTRELLA, L.; ROCHA-SOSA, M.; LÉON, P. CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. **Plant Journal**. v.9, p. 649-658, 1996.

MAZZAFERA, P.; SOAVE, D.; ZULLO, MAT.; GUERREIRO, F. O.Oil content of green beans from some coffee species. **Bragantina**, v. 57, 1998.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid Metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1015 – 1026, 1995.

MENDES, L. C. **Otimização do processo de torrefação do café robusta (Coffea canephora conillon) para formulação de blends com café arábica (Coffea arabica)**. 1999. 101 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – FEA-UNICAMP, Campinas, 1999.

MILLER, E.G.; GONZALES-SANDERS, A.P.; COUVILLON, A.M., BINNIE, W.H.; SUNAHARA, G.I.; BERTHOLET, R. Inhibition of oral carcinogenesis by roast beans and roast coffee beans fractions. In: **Association Scientific ternational du café, 15 th ASIC International Colloquium on Coffee, ASIC**, Paris, France, pp. 420-425.

MUELLER, C.; SCHWENDER, J.; ZEIDLER, J.; LICHTENTHALER, H. Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Biochem. Soc. Trans**, v. 28, p. 792 – 793, 2000.

NARITA, J.O.; GRUISSEM, W. Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. **Plant Cell**. v. 1, p. 181-190, 1989.

NEB CUTTER. Disponível em: <<http://tools.neb.com>>. Acesso em 15 nov. 2006.

NEWMAN, J. D.; CHAPPELL, J. Crit. Rev. **Biochemistry Molecular Biology**, v. 34, p. 95 – 106, 1999.

PENUELAS, J.; MUNNÉ-B. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. **Plant Science**, v.10, n. 4, p. 166-169, 2005.

PICARD, H.; GUYOT, B.; VICENT, J.C. Etude des composés stéroliques de l'huile de café (*Coffea canephora*). **Café Caçãõ thé**, v. 28, p. 47 – 62, 1984.

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R.A.; LEWINSOHN, E., CROTEAU, R. Floral scent production in *Clarkia* (Onagraceae). I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity. **Plant Physiol**. v. 103, p. 1533-1540, 1994.

PIEL, J.; DONATH, J.; BANDEMER, K.; BOLAND, W. **Angew. Chem. Int. Ed**, v. 37, p. 2478 – 2481, 1998.

POST, S. M.; ROOS, B.; VERMEULEN, M.; AFMAN, L.; JONG, M. C.; DAHLMANS, V. E. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. 155-156, 2000.

PROJETO genoma café – Disponível em : <www.lge.ibi.unicamp.br/caf%C3%A9/>. Acesso em: 13 nov. 2005.

QURESHI, N.; PORTER, W. In *Biosynthesis of Isoprenoids Compounds*. New York: Wiley, 1981. p. 47 – 94.

RATNAYAKE, W. M.N.; HOLLYWOOD, R.; O'GRAD, E.; STAVRIC, B. Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. **Food Chem, Toxicol**, v. 31, p. 263-263, 1993.

RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; AHUMADA, I.; DIEZ-JUEZ, E.; SAURET-GUETO, S.; LOIST, L.M.; GALLEGO, F.; CARRETERO-PAULET, L.; CAMPOS, N.; BORONAT, A. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. **The Plant Journal**, v. 27, p. 213-222, 2001.

RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M; BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiol**, v. 130, p. 1079-1089, 2002.

RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; FORÉS, O.; MARTINEZ-GARCIA, J. F.; GONZÁLEZ, V.; PHILLIPS, M.A.; FERRER, A.; BORONAT, A. Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis development, **The Plant Cell**, v. 16, p. 144-156, 2004.

ROHMER, M. In *Comprehensive Natural Product Chemistry*. Oxford: Pergamon, 1999. p. 45 – 68.

ROSS, B.; VAN DER WEG, G.; URGET, R.; VAN DEN BONVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Level of cafestol, caveol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant. **J Agric Food Chem**, v. 45, p. 3065 – 3069, 1997.

SCHILTER, B.; PERRIN, I.; CAVIN, C.; HUGGETT, A.C. Placental glutathione S-transferase (GST-P) induction as a potential mechanism for the anticarcinogenic effect of the coffee-specific components cafestol and kahweol. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 2377-2384, 1996.

SCHUHR, C. A.; RADYKEWICZ, T.; SAGNER, S.; LATZEL, C.; ZENK, M. H.; ARIGONI, D; BACHER, A.; ROHDICH, F.; EISENRCICH, W. **Phytochen. Rev**, v. 2, p. 3 – 16, 2003

SCHWENDER, J.; MULLER, C.; ZEIDLER, J.; LICHTENTHALER, H. K. Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Lett**, v. 455, p. 140 – 144, 1999.

SEHAT, N.; MONTAG, A.; SPEER K. Lipids and coffee Brew. **Proceedings of the 15th ASIC Colloquium (Montpellier)**, 1993. p. 869-872.

SPEER, K.; KOLLING–SPEER, I. Lipids , In: CLARKE, R.J.; VITZTHUM, O.G. (Ed.). **Coffee: recent developments**. Blackwell Science, 2001. p. 33-49.

SPEER, K.; SEHAT, N.; MONTAG, A. Fatty acids in coffee. **Proceedings of the 15th ASIC Colloquium (Montpellier)**, 1993a. p. 583-592.

SPEER, K; TEWIS, R; MONTAG, A. 16-O-Methylcafestol – a quality indicator for coffee. **Proceedings of the 14th ASIC Colloquium** (San Francisco), , paris, France, 1993b. p. 237-244.

SOUZA, V. F.; MODESTA, R. C. D.; GONÇALVES, E. B.; FERREIRA, J. C. S.; MATOS, P. B. Influência dos fatores demográficos e geográfico na preferência da bebida de café no estado do RIO de Janeiro. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n.1, p. 1 – 7, 2004.

STERMER, B. A.; BIANEHINI, G. M.; KORTH, K. J. **Lipid Res**, v. 35, p. 1133 – 1140, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiol.** 3. ed. Sunderland, MA: Sinauer Ass Inc Publishers, 2002.

TAKAHASHI, S.; KUZUYAMA, T.; WATANABE, H.; SETO, H. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 9879 – 9884, 1998.

THOMAZIELLO, R. A.; OLIVEIRA, E. G.; TOLEDO, J. A.; COSTA, T. E. Cultura do Café (*Coffea arabica* L. Var. arabica). **Boletim Técnico , CATI**, v. 193, p. 1, 1996.

TRAPP, S.C.; CROTEAU, R.B. Genomic Organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v. 1458, p. 811-832, 2001.

TURATTI, J. M. Extração e caracterização de óleo de café. II SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2001, Vitória. **Anais ...** Vitória, 2001. p. 1533 – 1539.

VEAU, B.; COURTOIS, M.; OUDIN, A.; CHENIEUX, J.C.; RIDEAU, M.; CLASTRE, M. Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*, *Biochim. Biophys. Act*, v. 1517, p. 159-163, 2000.

VELIKOVA, V.; EDREVA, A.; LORETO, F. Endogenous isoprene protects *Phragmites australis* leaves against singlet oxygen. **Physiologia Plantarum**. v. 122, p. 219-225, 2004.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A; et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **J. Braz. Plant Physiol.** v. 18, p. 95-108, 2006.

ZLEIDLER, J.; SCHWENDER, J.; MULLER, C., WIESNER, J.; WEIDEMEYER, C., BECK, E.; JOMAA, J.; LICHTENTHALER, H. K. Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. **Z. Naturforsch**, v. 53c, p. 980 – 986, 1998.

WALTER, M. H.; FESTER, T.; STRACK, D. Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the “yellow pigment” and other apocarotenoids. **Journal Plant**. v. 21, p. 571-578, 2000.

WEISSCORN, D. L.; DENBOY, C. J.; LAINE, M.; LÂNG, S. S.; YANG, Z.; YU, X.; CRAMER, C. L. **Plant Physiol**, v. 98, p. 393 – 400, 1995.

YANG, Z.; PARK, H.; LACY, G.L.; CRAMER, C.L.; Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzima A reductase genes by wounding and pathogen challenge. **Plant Cell**. v.3, p. 397-405, 1991.

ANEXOS

ANEXO A

IN SILICO AND IN VITRO ANALYSIS OF THE ISOPRENOID PATHWAY IN COFFEE

TISKI, Iris^{1,2} et al

¹Biotechnology Graduation Program – UEL, Londrina, PR, Brazil, ²IAPAR, CP 481, 86001-970, Londrina, PR, Brazil,

Abstract

The most important lipids in coffee, the diterpenes khaweoil and cafestol, are originated from the isoprenoid pathway. Despite their diversity in functions and structures, all isoprenoids derive from the common-five carbon building unit isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In higher plants, there are two independent pathways located in the cytosol (mevalonic acid or MVA pathway) and in the plastids (methylerythritol phosphate – MEP – or non mevalonic pathway). Throughout the data mining of the Brazilian Coffee Genome Project we studied the genes that code for the enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) and mevalonate diphosphate decarboxylase (MPDC) for the MVA pathway and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) and isopentenyl diphosphate/dimethylallyl diphosphate synthase (IDS) for the MEP pathway.

Introduction

Coffee is one of the most important world agricultural commodities. Although the cup quality is one of the main aspects for consumption, very little is known about several components, which can contribute for quality, including lipids. The most important lipids in coffee, the diterpenes khaweoil (C₂₀H₂₆O₃), and cafestol (C₂₀H₂₈O₃), are originated from the isoprenoid pathway. Despite their diversity in functions and structures, all isoprenoids derive from the common-five carbon building unit isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP) [1]. In higher plants, two independent pathways located in separate intracellular compartments are involved in the biosynthesis of IPP and DMAPP (Figure 1). In the cytosol, IPP is derived from the mevalonic acid (MVA) pathway [2;3], that starts from the

condensation of acetyl-CoA, whereas in plastids, IPP is formed from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate through the methylerythritol phosphate (MEP or non-mevalonate) pathway [4;5]. The key enzyme of the cytoplasmic MVA pathway is 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR) (EC 1.1.1.34). *HMGR* in plants is reported to be encoded by two genes [6;7]. These *HMGR* isoforms are differentially expressed, depending on physiological conditions [7;8]. The enzyme mevalonate diphosphate decarboxylase (MPDC) is responsible for the formation of IPP.

For the MEP pathway, the enzyme 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) is currently considered as the first specific step for biosynthesis of isoprenoid in plastids. The last enzyme on the MEP pathway is

the isopentenyl diphosphate/dimethylallyl diphosphate synthase (IDS), which can form either IPP or DMAPP. With the aim to understand the process of formation of

the isoprenoids in *Coffea* we have started the characterization of the genes involved on the MVA and MEP pathway.

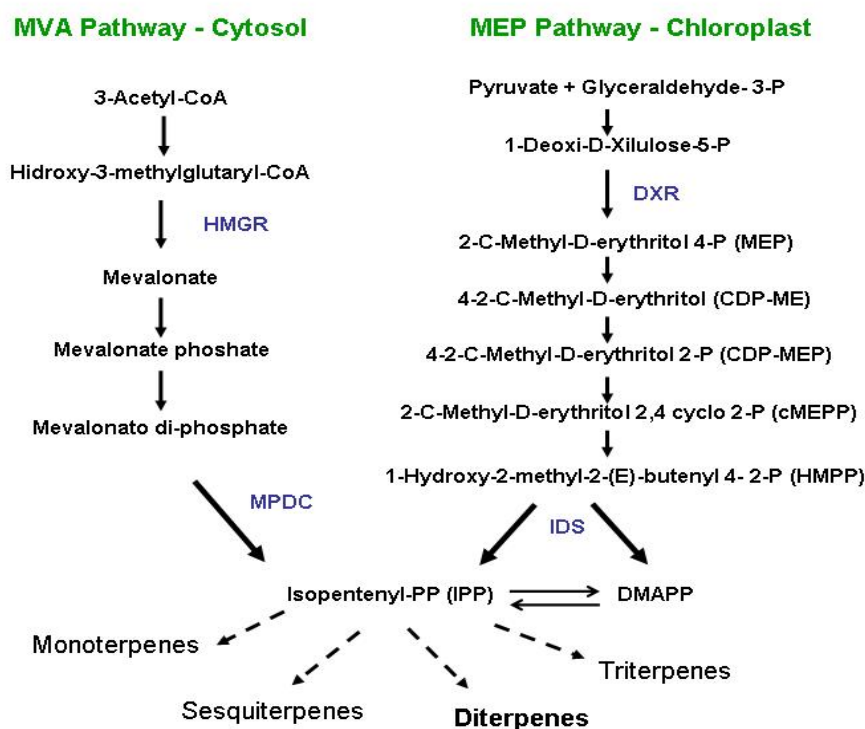


Figure 1. Diagram of the isoprenoid pathway in the cytosol and in the plastids in plants.

Material and methods

A key word search for ESTs from genes of the MAV and MEP pathway was conducted on the database of the Brazilian Coffee Genome Project [9] (<http://www.lge.lbi.unicamp.br/cafe/>).

The sequences were clustered for contig formation using the Sequencher 4.5 software. Singlets and contigs were analyzed using the basic local alignment search tool (BLAST) in the tblastx mode at NCBI database. The consensus contig were translated using the Open Reading Frame Finder available at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). The proteins sequences were aligned with homologous sequences from other organisms using ClustalW at <http://clustalw.genome.ad.jp/>.

Total RNA was isolated from pulp, perisperm and endosperm from fruits of *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 at different stages of maturation [10]. One µg of total RNA was used to produce cDNA with Thermoscript™ oligo DT System (Invitrogen). To check the complementation of the HMGR contigs, different primer combinations were used on PCR reaction of the cDNA. For Northern Blot analysis 10 µg of total RNA was transferred to nylon membranes and hybridized using UltraHyb solution as previously described [11].

Results and Discussion

The keyword search for the *DXR* (MEP pathway) resulted in twenty two ESTs and formed only one full length contig.

Electronic Northern showed higher expression in libraries of germinating seeds (Table 1). Search for *IDS* ESTs retrieve 47 sequences, which also formed only one full length contig. The sequences were originated mainly from hypocotyls induced with acylbenzolar-S-methyl, a SAR inducer. It is interesting to observe that several of ESTs coming for the MEP pathway were obtained from cell tissue culture libraries or stress induced libraries. On

the other hand, the number of ESTs from the two genes from the MVA pathway (HMGR and MPDC) on those libraries was very low (Table 1).

For the MVA pathway, 13 ESTs were found for HMGR that originated three incomplete contigs named: 6479, 6175 and 0003. For MPDC only 7 ESTs were found forming one full length contig.

Gene	ESTs	Fruit and Flower Buds	Leaf	Tissue Culture Cells	Water Stress	Hypocotyl + acylbenzolar	Germinating Seeds
<i>CAHMGR1</i>	11	8	2	1			
<i>CAHMGR2</i>	2			2			
<i>MPDC</i>	7	2		4		1	
<i>DXR</i>	22	4	3	6	3	1	5
<i>IDS</i>	47	9	9	14	4	10	1

Table 1. Electronic Northern of genes from the MVA and MEP pathway.

For HMGR, the translated sequence of the contig 6749 presented high similarity with the N-terminal region of a consensus *Arabidopsis thaliana* HMGR protein. Contigs 6175 and 0003 presented high similarity with the C-terminal region of the same protein (Figure 2A) As the presence of two isoforms were expected, primers based on those contigs were used to check whether they could belong to the same contig 6749 or represent another *HMGR* isoform. When we used primers from sequences of contig 6749 and 0003, it was possible to amplify a fragment corresponding to the expected size of the full-length cDNA, indicating that they are the same isoform (Figure

2B, primers 1 and 6), and was called *CaHMGR1*. The combination of primer 6749 and 6175 did not amplify the expected fragment size, suggesting that 6175 is a different isoform, called *CaHMGR2*.

The number of isoforms of the four genes datamined was the same reported for *Arabidopsis thaliana*, with the exception for the *MPDC* that has two isoforms in *A. thaliana* and only one in the Brazilian Coffee Genome Project *C. arabica* ESTs database. A keyword search from *MPDC* in *C. canephora* ESTs [12] using the Harvest platform (<http://harvest.ucr.edu/>) also retrieved only one contig, which was mainly

expressed during the late stages of fruit maturation.

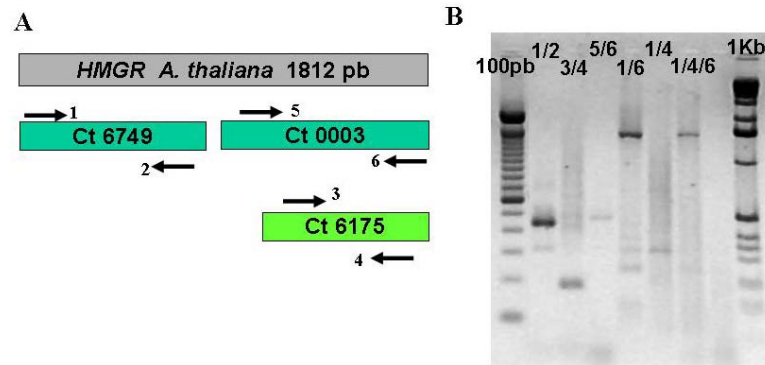


Figure 2. Characterization of *HMGR* isoforms by PCR. A) Contigs obtained and their position related to a consensus *A. thaliana* sequence. Number on the arrows indicated the primer position for fragment amplification. B) Partial PCR amplification of coffee *HMGR*. Numbers in the columns indicated the used primer combination. Expected sized for the fragments: 1/2: 6749/6749C= 450 pb; 3/4: HMGR 0/0C= 186 pb; 5/6: HMGR 6175/6175C = 483 pb; 1/4: 6749/0C= 1556pb; 1/6: 6749/6175C=1694pb; 1/4/6: 6749/0C/6175C=1556pb.

References

- [1] RODRIGUEZ M.; BORONAT, A. Elucidation of the Methylerythritol Phosphate pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Physiology*, vol. 130:1079 – 1089, 2002.
- [2] QURESHI, N.; PORTER, W. In *Biosynthesis of Isoprenoids Compounds*, eds. PORTER, J. W. & SPURGCN, S. L. (WILEY, New York), p. 47 – 94, 1981.
- [3] NEWMAN, J. D.; CHAPPELL, Isoprenoid Biosynthesis in Plants: Carbon Partitioning Within the Cytoplasmic Pathway. *Crit. Rev. Biochemistry Mol Biol* 34: 95 – 106, 1999.
- [4] ESENREICH, W.; SCHWARZ, M.; CARTAYRADE, A.; ARIGONI, D.; ZENK, M. H.; BACKER, A. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry Biology* 5: 221 – 233, 1998.
- [5] ROHMER, M. In *Comprehensive Natural Product Chemistry*, ed. Cane, D. E. (Pergamon, Oxford), 45 – 68, 1999.
- [6] BACH, T. J.; WETTSTOLN, A.; BORONAT, A.; FORRO, A.; ENJUTO, M.; GRULSSOM, W.; NARITA, J. O. In *Physiology and Biochemistry of Sterols*. (PATTERSON, G. W.; and NOS, D. W., ed) American Oil Chemists Society, p. 29 – 49, 1991.
- [7] WEISSENBORN D. L. ; DENBOW C. J. ; LAINE M. ; LANG S. S. ; ZHENBIAO YANG ; XUESHU YU ; CRAMER C. L. ; HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins : molecular specialization within a complex pathway *Physiol. Plantarum*: 1995, vol. 93, n°2, pp. 393-400
- [8] STERMER, B. A.; BIANCEHINI, G. M.; KORTH, K. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants *J. Lipid Res*, 35:1133 – 1140, 1994.
- [9] VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; *et al.* Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1):95-108, 2006
- [10] CHANG, S.; PURYEAR J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol*,11:113-116, 1993.
- [11] PEREIRA, L. F. P.; GALVÃO, R. M.; KOBAYASHI, A. K.; CAÇÃO, S. M. B.; VIEIRA, L. G. E. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(3): 283-289, 2005.
- [12] LIN, C.; MUELLER, L.A.; Mc CARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PÉTIARD, V.; TANKSLEY, S.D. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor Appl Genet.* 112(1):114-30, 2005

Project supported by “Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café” and CNPq

ANEXO B

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submission of papers

Brazilian Archives of Biology and Technology publishes original research papers, Short notes and Review articles in English in the interdisciplinary areas of biological sciences and engineering/technology. Submission of paper implies that it has not been published or being considered for publication elsewhere. Care should be taken to prepare a compact manuscript with precision in presentation, which will help authors in its acceptance. All the papers are subjected to review by referees.

Manuscript

Three copies of the single-spaced typed manuscript (maximum 12 pages) on a high grade A-4 size paper (210x297 mm), with margins (left 25, right 20, superior and inferior 30 mm) should be prepared. This should be divided under the following headings: ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS, RESUMO, REFERENCES. These headings should be typed in bold upper case (12 font).

Title

The title (18 font, bold) of the paper should clearly reflect its contents. It should be followed by the name(s) of author(s) with expanded initials (12 font, bold) and the address(s) (*italic*, 10 font) of the institution(s) where the work has been carried out.

ABSTRACT

Each paper should be provided with an abstract (*italic*) of 100-150 words, describing briefly on the purpose and results of the study. It should be prepared as concisely as possible.

Key words

Authors should provide three to six key words that will be used in indexing their paper.

INTRODUCTION

This should describe the background and relevant information about the work. It should also state the objective of the work.

In journals:

Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, **27**, 109-117

Thesis:

Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India

In books:

Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In-*Advances in Biotechno-logy*, ed. A. Pandey. Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16

Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi

In conferences:

Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6th International Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah

Tables and Figures

Tables and figures, numbered consecutively with arabic numerals must be inserted at appropriate place in the text. These should be used to present only those data, which can not be described in the text

Units and Abbreviations

The SI system should be used for all experimental data. In case other units are used, these should be added in parentheses. Only standard abbreviations for the units should be used. Full stop should not be included in the abbreviation (e.g. m, not m. or rpm, not r.p.m.). Authors should use '%' and '/' in place of 'per cent' and 'per'.

Manuscript lay-out

It is suggested that authors consult a recent issue of the journal for the style and layout. Except the title, abstract and key words, entire

MATERIALS AND METHODS

Authors must take care in providing sufficient details so that others can repeat the work. Standard procedures need not be described in detail.

RESULTS AND DISCUSSION

Results and Discussion may be presented separately or in combined form (authors may decide easier way for them). Preliminary work or less relevant results are not to be described. The reproducibility of the results, including the number of times the experiment was conducted and the number of replicate samples should be stated clearly.

RESUMO

An abstract of the paper should also be prepared in Portuguese and placed before the list of References. Authors from other than Latin American countries can seek the help of Editor's office to prepare Portuguese resumo of their papers.

REFERENCES

References in the text should be cited at the appropriate point by the name(s) of the author(s) and year (e.g. Raimbault & Roussos, 1996; Raimbault *et al.*, 1997). A list of references, in the alphabetic order (10 font), should appear at the end of the manuscript. All references in the list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished results should not be included in the list. Examples of references are given below.

text should be placed in two columns on each page. Footnotes, except on first page indicating the corresponding author (8 font) should not be included. The entire manuscript should be prepared in Times New Roman, 11 font (except reference list, which should be in 10 font).

Spacing

Leave one space between the title of the paper and the name(s) of the author(s), and between the headings and the text. No space should be left between the paragraphs in the text. Leave 0.6-cm space between the two columns.

Electronic submission

Manuscript should be accompanied by a diskette indicating the name and version of the word processing programme used (use only MS Word 6/7 or compatible).

Referees

When submitting the manuscript authors may suggest up to three referees, preferably from other than their own countries, providing full name and address with email. However, the final choice of referees will remain entirely with the Editor.

Page charges and reprints

There will be no page charges. Reprints can be ordered up on acceptance of the paper. Manuscripts and all correspondence should be sent to the Editor, Prof. Dr. Carlos R. Soccol ***Brazilian Archives of Biology and Technology*** Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775 - CIC 81350-010 Curitiba - PR, Brazil Fax +55-41-3245 08 44 Email: niet@tecpar.br