



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ILARA GABRIELA FRASSON BUDZINSKI

**“CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRÊS GENES DE
A-EXPANSINAS EM *COFFEA ARABICA* E *COFFEA
RACEMOSA* DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO
FRUTO”**

Londrina
2008

ILARA GABRIELA FRASSON BUDZINSKI

**“CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRÊS GENES DE
A-EXPANSINAS EM *COFFEA ARABICA* E *COFFEA
RACEMOSA* DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO
FRUTO”**

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

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

Londrina
2008

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B297c Budzinski, Ilara Gabriela Frasson.
Caracterização da expressão de três genes de α -expansinas de Coffea arábica e Coffea racemosa durante o desenvolvimento do fruto / Ilara Gabriela Frasson Budzinski. – Londrina, 2018.
85 f. : il.

Orientador: Luiz Gonzaga Esteves Vieira.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética Biologia Molecular, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Genética vegetal – Teses. 2. Café – Biologia molecular – Teses. 3. α -expansinas – Teses. I. Vieira, Luiz Gonzaga Esteves. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. ENBRAPA. V. Título.

CDU 581.169

ILARA GABRIELA FRASSON BUDZINSKI

**“CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRÊS GENES DE A-
EXPANSINAS EM *COFFEA ARABICA* E *COFFEA RACEMOSA*
DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO FRUTO”**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
IAPAR – UEL - PR

Prof. Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
EMBRAPA Soja – UEL - PR

Dr. David Pot
CIRAD/ França – IAPAR

Londrina, 27 de junho de 2008

DEDICO

**Aos meus pais, Sidneia e
Zigomar Budzinski e, A minha
avó Mafalda Prandini**

OFEREÇO

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal -IAPAR

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre.

Ao Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), em especial ao laboratório de Biotecnologia Vegetal.

Ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina e a todos os docentes do curso.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, pela concessão da bolsa.

Ao Dr. Tumoru Sera, por permitir as coletas de frutos do genótipo Graúdo.

Aos Doutores David Pot e Alexandre Lima Nepomuceno, por aceitarem prontamente o convite para participarem das bancas de qualificação e defesa e pelas contribuições e sugestões dadas na correção deste trabalho.

Aos Doutores Luiz Gonzaga Esteves Vieira (orientador) e Luiz Filipe Protasio Pereira, pela oportunidade, confiança, orientação e atenção, boa vontade, ensinamentos, paciência, apoio, incentivo, “descontração”... Por toda a contribuição para o meu crescimento pessoal e “crescimento” deste trabalho.

A Sandra Maria Bellodi Cação, por simplesmente ter me ensinado todas as “coisas” de laboratório, sempre com muita atenção, boa vontade e paciência. Pela amizade, conversas, entusiasmo fica aqui “registrado” o meu muito obrigada.

Ao Tiago Augusto Benedito dos Santos, por estar sempre ao meu lado ao longo destes anos, compartilhando as alegrias e preocupações, profissionais e pessoais. Por ser um grande amigo que faz e sempre fará parte da minha vida.

A Lúcia Pires Ferreira, pela amizade, conversas, caronas, por “pensar” comigo.

A Marília K. F. de Campos, pela amizade, conversas e serenidade.

A Dra. Luciana Grange, Gislaine Vasquez e Suzana Tiemi, pelas conversas, risadas, amizade.

Ao Dr. Sérgio Dias Lannes, por todas as conversas, companheirismo e até mesmo pelas “faíscas”. E por ter aceito o “difícil” trabalho de ser suplente na qualificação e defesa.

Ao Sr. João, pela disposição de sempre ir comigo coletar os frutos “grandes” e pela atenção.

A Fátima Borges (Fafá) e Suely Ario pelos “cuidados” com a sala do radioativo.

A todos os “amigos iaparianos” (Diogo Maciel, Iris Tíski, Julia Tufino, Kênia Carvalho, Leonardo Rippel, Lucinéia M. da Silva, Nathalia Belintani, Nathalia Volpi), pelas risadas e companheirismo.

A toda a minha família, por sempre me incentivarem e torcerem por mim. Em especial aos meus pais por me apoiarem, acalmarem e permitirem que eu pudesse “correr atrás” das minhas coisas.

A Sí, que esteve presente em todos os momentos, ouvindo sobre estatística e expansinas sem reclamar. Por ser uma pessoinha bem especial, com a qual compartilhei ao longo destes anos alegrias e receios.

Aos amigos da famosa “Turma Esquecida” (Éverson, Marcela e Selma), pelo companheirismo, incentivo, ajuda, troca. Foi muito bom ter a companhia de vocês durante as disciplinas. Sucesso sempre !!!

A Sueli Trindade Miranda, super secretária do Mestrado em Genética e Biologia Molecular, pela ajuda com os “passos” burocráticos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com o meu trabalho, possibilitando o meu crescimento profissional. Aos que sempre me quiseram bem e torceram pelo meu sucesso e felicidade.

BUDZINSKI, Ilara Gabriela Frasson. “**Caracterização da expressão de três genes de α -expansinas em *coffea arabica* e *coffea racemosa* durante o desenvolvimento do fruto**”. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

O desenvolvimento dos frutos de café é caracterizado por intensa divisão celular, alongamento e relaxamento da parede celular, processos relacionados à ação de proteínas, incluindo as expansinas, e diferentes enzimas. As expansinas são codificadas por uma família multigênica e, com base na similaridade entre as seqüências, podem ser classificadas em quatro famílias: α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), expansina-like A (EXLA) e expansina-like B (EXLB). As α -expansinas e β -expansinas têm a capacidade de promover extensão da parede celular; no entanto, as funções biológicas de expansina-like A e expansina-like B ainda não foram identificadas. As α -expansinas representam a maior subfamília e atuam no alongamento celular, maciez dos frutos, abscisão, germinação e polinização. Deste modo, este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar a expressão de α -expansinas transcritas durante o desenvolvimento e maturação dos frutos de café. Através de buscas no banco de dados do Projeto Genoma Café foram selecionadas três α -expansinas com seqüências presentes em bibliotecas de frutos. As três isoformas (*CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*) têm região codante variando entre 254 e 258 aminoácidos, tamanho similar ao descrito para ORFs (*open reading frames*) de outros organismos. Possuem também peptídeo sinal e domínios específicos de expansinas, um domínio N-terminal com homologia ao domínio catalítico de hidrolases glicosídicas (GH-45) e um domínio C-terminal com homologia ao grupo 2 de alergênicos de grão de pólen. Foram feitas análises do padrão transcricional dos genes, em diferentes tecidos de *C. arabica* cv. IAPAR-59 (raiz, ramo, folha, botão floral e flor) e frutos de *C. racemosa*, *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo (cultivar caracterizado por possuir frutos grandes). Foi observado para *CaEXPA1* e *CaEXPA3* maior transcrição em botão floral, tecido onde ocorre intensa divisão celular. Já a *CaEXPA2* apresentou sinais de hibridização em raízes e em ramos plagiotrópicos jovens e maduros. Visando estudar mais detalhadamente as diferenças espaciais e temporais na transcrição das três isoformas selecionadas, frutos coletados mensalmente da antese até a maturação tiveram seus tecidos (pericarpo, perisperma e endosperma) separados. Deste modo foram realizadas análises de Northern blot com amostras dos diferentes tecidos do cafeeiro, do fruto inteiro, pericarpo, perisperma e endosperma. Quando hibridizados com membranas contendo RNA de *C. racemosa* as três isoformas apresentaram padrão transcricional semelhante com sinais de hibridização detectados somente em pericarpo. Em *C. arabica*, a isoforma *CaEXPA1* mostrou alta transcrição no perisperma (tecido responsável pela definição do tamanho do grão do café). As diferenças observadas entre os padrões de transcrição no perisperma de IAPAR-59 e de IAPAR-59 Graúdo sugerem a participação de *CaEXPA1* na regulação do tamanho do grão de café. Por outro lado, a isoforma *CaEXPA2* mostrou transcrição específica em pericarpo nos estádios finais de maturação do fruto, o que sugere que esta isoforma pode estar envolvida na despolimerização da parede celular e, conseqüentemente, no controle da maturação do pericarpo. Para *CaEXPA3*, o padrão de transcrição foi similar ao encontrado para *CaEXPA1*; no entanto, baseado no padrão de transcritos observados, esta isoforma parece estar mais envolvida nos processos fisiológicos de relaxamento da parede relacionados com a maturação dos frutos.

Palavras-Chave: Coffea. α -expansinas. Desenvolvimento do fruto. Maturação. Brasil Projeto genoma café.

BUDZINSKI, Ilara Gabriela Frasson. “**Characterization of the expression of tree genes for α -expansinas in *Coffea Arabica* and *Coffea racemosa* during fruit development**”. 2008. 85 f. Dissertation (Master’s degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The development of the coffee fruit is characterized by intense cell division, elongation and softening of cell walls in different tissues. These processes are related to the activity of different proteins, including the expansins. Expansins are encoded by multigene families that are divided into four groups based on sequence similarity: α -expansins (EXPA), β -expansins (EXPB), expansin-like A (EXLA) and expansin-like B (EXLB). α -expansins and β -expansins are recognized to promote cell walls elongation, whereas the actual biological function of expansin-like A and expansin-like B is still unknown. α -expansins compose the major subfamily and are involved on cell wall elongation, fruit softening, abscission, germination and pollination. The objective of this work was to identify and characterize the expression of α -expansins transcribed during coffee fruit development and maturation. Searches on Brazilian Coffee Genome Project database allowed the identification of three α -expansins present in fruit cDNA libraries. The open reading frames of the three isoforms (*CaEXPA1*, *CaEXPA2* and *CaEXPA3*) varied from 254 to 258 amino acids, size similar to ORFs (open reading frames) described in others organisms. In addition, the three expansins described here contain a signal peptide and two specific domains for expansins proteins, a N-terminal domain with distant homology to the catalytic domain of glycoside hydrolases (GH-45) and a C-terminal domain related to group-2 grass pollen allergens. Transcriptional activity of these genes was assessed in different tissues from *C. arabica* cv. IAPAR-59 (root, leaf, flower bud and flower) and in fruits from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59, *C. arabica* cv. IAPAR-59 Graúdo (a cultivar characterized by its large fruit size) and *C. racemosa*. *CaEXPA1* and *CaEXPA3* showed high transcription in flower buds, tissue that presents intense cell division. On the other hand, the isoform *CaEXPA2* was detected also in roots and in young and mature plagiotropic branches. Spatial and temporal differences in transcription accumulation of these three α -expansins in specific fruit tissues (pericarp, perisperm and endosperm) were analyzed by Northern blot. For this total RNA were extracted from fruits of *Coffea arabica* cv. IAPAR-59, *C. arabica* cv. IAPAR-59 Graúdo (a cultivar characterized by its large fruit size) and *C. racemosa* collected monthly from anthesis up to maturation. The α -expansins genes selected presented similar transcription pattern in *C. racemosa* as hybridization signal was observed only in pericarp. In *C. arabica*, the *CaEXPA1* isoform showed increased transcription in the perisperm (tissue responsible for defining the final coffee grain size). The differences in mRNA expression observed in the perisperm of cv. IAPAR59 and cv. IAPAR-59 Graúdo strongly suggest the participation of *CaEXPA1* in the regulation of coffee grain size. On the other hand, the isoform *CaEXPA2* showed specific expression in the pericarp during the later stages of fruit maturation (ripening), suggesting the involvement of this isoform in the pericarp cell wall disassembly. *CaEXPA3* transcription pattern was similar to that of *CaEXPA1*; however, this isoform probably is implicated mainly on the physiological processes related to fruit maturation.

Keywords: *Coffea*. α -expansins. Fruit development. Maturation, Brazilian Coffee Genome Project.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelo de separação dos frutos coletados para análises Moleculares	41
Tabela 2 – Isoformas de α -expansinas de <i>C. arabica</i> selecionadas por possuírem ESTs provenientes de bibliotecas de frutos. Tamanho dos <i>contigs</i> , bibliotecas que compõem cada <i>contig</i> e o número de ESTs nas bibliotecas	52
Tabela 3 – Análise do grau de similaridade entre três α -expansinas Selecionadas	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Tecidos do fruto de café em diferentes fases de desenvolvimento. A. corte transversal do fruto imaturo (90 -120 DAF), mostrando o perisperma (ope) como uma película que envolve o endosperma (en), ainda na fase líquida. B. corte longitudinal do fruto maduro (230 -240 DAF), evidenciando as duas sementes desenvolvidas e o embrião maduro (em), localizado no endosperma já solidificado. As porções internas (in) e externas (ex) do exocarpo também são mostradas23
- Figura 2** – Desenvolvimento e maturação do fruto de *C. arábica*.....24
- Figura 3** – Modelo simplificado da parede celular vegetal e de seu afrouxamento, causado pela atuação das exps. A parede é composta por microfibrilas de celulose (área rosa), as quais estão ligadas a diferentes glicanas, como xiloglucanas e xilanas (barras azuis e laranja). Juntos estes polissacarídeos formam uma matriz rígida e flexível unida por pontes de hidrogênio (pequenas linhas horizontais). A expansão da parede envolve a movimentação e separação das microfibrilas de celulose de forma irreversível. 1- domínio catalítico e 2- domínio para ligação de celulose33
- Figura 4** – Fases de maturação dos frutos dos frutos de café coletados para análises moleculares. A – *C. arabica* e B – *C. racemosa*42
- Figura 5** – Análise filogenética das isoformas de expansinas presentes no Genoma Café (triângulo vermelho) e de *Arabidopsis thaliana* (At), *Medicago trunculata* (medi), *Gossypium hirsutum* (cot), *Lycopersicon esculentum* (toma) e *Lactuca sativa* (let) disponíveis em <http://www.bio.psu.edu/EXPansins/>. As seqüências protéicas completas foram alinhadas através do CLUSTAL-W e a árvore filogenética foi construída usando o programa Mega 3.1. Foram utilizadas seqüências das quatro famílias de expansinas (α -EXP, β -EXP, EXLA e EXLB)50

Figura 6 – Análise filogenética de 11 isoformas de expansinas selecionadas no banco de dados do projeto Genoma Café. As sequências foram alinhadas no CLUSTAL-W e a árvore filogenética foi construída usando o programa Mega versão 3.1	51
Figura 7 – Estrutura esquemática dos contigs selecionados, indicando a presença de resíduos conservados, cisteína (G), His-Phe-Asp e triptofano (W). Em verde a região do peptídeo sinal, em amarelo a região do domínio catalítico e em laranja o domínio de ligação para polissacarídeo.....	53
Figura 8 – Estádios do desenvolvimento do fruto de café com provável expressão <i>in silico</i> de genes EXPA.....	54
Figura 9 – Dot blot realizado para confirmar a especificidade das sondas. A – sonda com hibridização específica para <i>CaEXPA1</i> , B – sonda hibridização específica para <i>CaEXPA2</i> e C – sonda com hibridização específica para <i>CaEXPA3</i>	55
Figura 10 – Análise por Southern Blot de DNA genômico de <i>C. arabica</i> cv. IAPAR-59 (CA), <i>C. arabica</i> cv. IAPAR-59 Graúdo (CAG) e <i>C. racemosa</i> (CR) digerido com <i>DraI</i> e <i>HindIII</i> . Membrana hibridizada com a sonda de <i>CaEXPA1</i>	56
Figura 11 – Análise por Southern Blot do DNA genômico de <i>C. arabica</i> cv. IAPAR-59 (CA), <i>C. racemosa</i> (CR) e <i>C. arabica</i> cv. IAPAR-59 Graúdo (CAG) digerido com <i>DraI</i> e <i>HindIII</i> . Membrana hibridizada com a sonda de <i>CaEXPA2</i>	57
Figura 12 – Análise por Southern Blot do DNA genômico de <i>C. arabica</i> cv. IAPAR-59 (CA), <i>C. racemosa</i> (CR) e <i>C. arabica</i> cv. IAPAR-59 Graúdo (CAG) digerido com <i>DraI</i> e <i>HindIII</i> . Membrana hibridizada com a sonda de <i>CaEXPA3</i>	58
Figura 13 – Membrana de Northern blot contendo RNA total de raiz, ramo jovem, ramo maduro, botão floral, flor e folha de <i>C. arabica</i> cv. IAPAR-59. A) Hibridização com sonda de <i>CaEXPA1</i> . B) Hibridização com sonda de <i>CaEXPA2</i> e C) Hibridização com sonda de <i>CaEXPA3</i> . RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras	59

- Figura 14** – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do fruto inteiro de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda de *CaEXPA1*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde - avermelhado - vermelho, todos 180 DAF) e Abril (avermelhado - vermelho e cereja, 210 DAF). RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras.....60
- Figura 15** – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído da pericarpo de frutos de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda de *CaEXPA1*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde - cana – avermelhado – vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (cereja – 210). RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras61
- Figura 16** – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do perisperma de *C. arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento, hibridizada com sonda de *CaEXPA1*. Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF) e Março (180 DAF). RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras62
- Figura 17** – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do fruto inteiro de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda *CaEXPA2*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde - avermelhado -

vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (avermelhado - vermelho e cereja, 210 DAF). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot63

Figura 18 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído da pericarpo de *C. arabica* IAPAR 59 e *C. arabica* IAPAR 59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda *CaEXPA2*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde - cana – avermelhado – vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (cereja – 210). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot63

Figura 19 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do fruto inteiro de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda *CaEXPA3*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde – avermelhado – vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (avermelhado – vermelho e cereja, 210 DAF). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot64

Figura 20 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído da pericarpo de *C. arabica* IAPAR-59 e do *C. arabica* IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda *CaEXPA3*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde - cana – avermelhado – vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (cereja – 210). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot65

Figura 21 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do perisperma de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo, em diferentes fases de desenvolvimento. Membrana hibridizada

com sonda de *CaEXPA3*. Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF) e Fevereiro (150 DAF). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot.....65

Figura 22 – Membrana de Northern blot com RNA total de *C. racemosa*, hibridizada com sonda de *CaEXPA1*. Em (A): fruto inteiro e (B): diferentes tecidos do fruto. Coluna 1 - fruto 15 DAF, 2 - fruto 30 DAF, 3 - fruto 45 DAF, 4 - fruto 60 DAF, 5 - perisperma 45 DAF, 6 - perisperma 60 DAF, 7 - endosperma 15 DAF, 8 - endosperma 30 DAF, 9 - endosperma 45 DAF e 10 - endosperma 60 DAF. RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras66

Figura 23 – Membrana de Northern blot com RNA total de *C. racemosa* hibridizada com sonda de *CaEXPA2*. Em (A): fruto inteiro e (B): diferentes tecidos do fruto. Coluna 1 - fruto 15 DAF, 2 - fruto 30 DAF, 3 - fruto 45 DAF, 4 - fruto 60 DAF, 5 - perisperma 45 DAF, 6 - perisperma 60 DAF, 7 - endosperma 15 DAF, 8 - endosperma 30 DAF, 9 - endosperma 45 DAF e 10 - endosperma 60 DAF. RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostra67

Figura 24 – Membrana de northern blot com RNA total de *C. racemosa* hibridizada com sonda de *CaEXAP3*. Em (A) fruto inteiro e (B) diferentes tecidos do fruto. Coluna 1 - fruto 15 DAF, 2 - fruto 30 DAF, 3 - fruto 45 DAF, 4 - fruto 60 DAF, 5 - perisperma 45 DAF, 6 - perisperma 60 DAF, 7 - endosperma 15 DAF, 8 - endosperma 30 DAF, 9 - endosperma 45 DAF e 10 - endosperma 60 DAF. RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	CAFÉ.....	20
3.1.1	Aspectos Econômicos	20
3.1.2	Características Botânicas do Cafeeiro Arábica	21
3.1.3	<i>Coffea Racemosa</i>	22
3.1.4	Frutificação do Cafeeiro.....	23
3.2	COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL PRIMÁRIA	25
3.3	GENES EXPRESSOS DURANTE DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DOS FRUTOS DE CAFÉ	27
3.4	EXPANSINAS	30
3.4.1	Mecanismo de Ação e Regulação das Expansinas	32
3.5	PROJETO GENOMA CAFÉ	34
4	ARTIGO	36
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRÊS GENES DE A-EXPANSINAS EM <i>COFFEA ARABICA</i> E <i>COFFEA RACEMOSA</i> DURANTE O DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DO FRUTO	36
	REFÊRENCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

O café (*Coffea* spp.) é um dos principais produtos agrícolas, sendo considerado o segundo item em importância no comércio internacional de “commodities” (VIEIRA *et al.*, 2006). Seu cultivo, processamento e comercialização têm um importante papel na economia e no mercado de trabalho de países em desenvolvimento. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, com produção da safra 2007/2008 estimada em cerca de 32 milhões de sacas de café. O gênero *Coffea* L. contém aproximadamente 100 espécies, cujo centro de origem é o continente africano. No entanto somente as espécies *Coffea arabica* (café Arábica) e *Coffea canephora* (café Robusta ou Conilon) têm maior importância comercial, representando 70% e 30%, respectivamente, do mercado mundial de café, sendo o

C. arabica o café mais apreciado pelos consumidores. As demais espécies são utilizadas em programas de melhoramento genético, pois são fontes de variabilidade genética principalmente para tolerância/resistência a estresses abióticos e bióticos.

Um dos pontos fundamentais para a viabilização da cafeicultura moderna é a qualidade da bebida, que é bastante influenciada pela condição de maturação dos frutos. A presença de frutos verdes e maduros no mesmo lote de grãos do cafeeiro altera teores de acidez, amargor e conseqüentemente a qualidade da bebida (RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006). Uma das formas de minimizar este problema é a utilização de plantas de café com desenvolvimento e maturação uniforme dos frutos. No gênero *Coffea*, o desenvolvimento do fruto se dá entre a antese e o seu amadurecimento total. Nas fases iniciais de desenvolvimento o fruto do cafeeiro é composto por pericarpo e perisperma, sendo este substituído pelo endosperma com o decorrer da maturação, quando ocorre também mudança na coloração do pericarpo. A maturação é um processo bioquímico e fisiológico que altera cor, sabor aroma e textura dos frutos, e envolve a expressão de diferentes enzimas e proteínas relacionadas com o alongamento, relaxamento e expansão da parede celular e despolimerização das pectinas. Através da clonagem e manipulação dos genes envolvidos nas fases de desenvolvimento e maturação, torna-se possível retardar ou até mesmo inibir esses processos fisiológicos, principalmente em frutos climatéricos. Neste contexto, as expansinas destacam-se

como proteínas responsáveis por promoverem o relaxamento da parede celular, estão envolvidas na expansão celular e em outros processos de desenvolvimento como: organogênese, germinação de sementes, solubilização da parede, desenvolvimento e maturação dos frutos.

O desenvolvimento de tecnologias aplicadas à genética molecular propicia uma enorme produção de informações em genômica, principalmente pela identificação e caracterização de genes e pelo seqüenciamento de diferentes organismos. O projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>), finalizado em agosto de 2005, disponibilizou um banco de dados com cerca de 200 mil *ESTs* (seqüências de DNA expressas) de café, que vem permitindo estudos visando entender melhor o funcionamento genético da planta. A partir das seqüências (*reads*) obtidas em larga escala dos genes expressos é possível a obtenção de informações sobre os mesmos, e a comparação com genes de outros organismos. Os dados gerados são fundamentais para identificação de mecanismos genéticos que controlam características importantes no cafeeiro seja pela caracterização via database ou por experimentos mais detalhados de sua expressão.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância dos processos de desenvolvimento e maturação dos frutos de café este trabalho teve como objetivo realizar:

- A mineração de genes que codificam para α -expansinas pela análise *in silico* no banco de dados do Projeto Genoma Café.
- A análise da estrutura dos genes selecionados através de Southern blot.
- O estudo do padrão transcricional de três isoformas de α -expansinas em diferentes tecidos durante o desenvolvimento e maturação dos frutos de *C. arabica* e de *C. racemosa* através de Northern blot.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CAFÉ

3.1.1 Aspectos Econômicos

O café é um dos principais produtos do agronegócio mundial, sendo cultivado em mais de 60 países (VIEIRA *et al.*, 2006). A cafeicultura engloba recursos anuais de cerca de 91 bilhões de dólares e emprega meio bilhão de pessoas (EMBRAPA CAFÉ, 2007). Seu cultivo, processamento e comercialização têm importante papel na economia e no mercado de trabalho de países em desenvolvimento. A cafeicultura é responsável por 2,5% das exportações nacionais e envolve dois milhões de empregos diretos. Além de ser o maior produtor e exportador mundial de café, o Brasil também é o segundo maior consumidor deste produto, estando atrás somente dos Estados Unidos.

Dados da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) estimaram para a safra 2007/2008 uma produção entre 31 e 32 milhões de sacas de café beneficiado. Minas Gerais, o principal estado produtor de café, contribui com 43,4% desta produção seguido por Espírito Santo (28,4%), São Paulo (7,5%), Bahia (7,1%), Paraná (5,6%) e Rondônia (4,6%) (CONAB, 2007). Portanto, a cafeicultura brasileira tem importância econômica por sua participação na receita cambial, transferência de renda aos outros setores da economia, contribuição à formação de capital no setor agrícola do país, além da expressiva capacidade de absorção da mão-de-obra. No Paraná, apesar das transformações ocorridas na cafeicultura estadual a partir dos anos 70, o café ainda constitui uma importante atividade agrícola para geração de renda e emprego, sendo cultivado nas regiões Norte, Noroeste e Oeste.

3.1.2 Características Botânicas do Cafeeiro Arábica

O café é uma planta perene pertencente à família Rubiaceae, gênero *Coffea* (CHARRIER; BERTHAUD, 1985). Embora mais de 100 espécies desse gênero já tenham sido identificadas (BRIDSON; VERDCOURT, 1988), do ponto de vista comercial, somente as espécies *C. arabica* L. (Arábica) e *C. canephora* Pierre ex Froehner (Robusta ou Conilon) são extensivamente cultivadas (KUMAR; NAIDU; RAVISHANKAR, 2006) sendo *C. arabica* L. a de maior significância econômica por produzir o café mais apreciado por todos os países consumidores (MIRANDA; PEREIRA; BERGO, 1999). Cerca de 70% do café negociado mundialmente é Arábica e 30% Robusta (EIRA *et al.*, 2006). Espécies como *C. liberica*, *C. dewevrei* e *C. racemosa* são cultivadas somente para satisfazer a demanda de consumo local (KUMAR; NAIDU; RAVISHANKAR, 2006) e para a realização de pesquisas relacionadas a características genéticas como resistência a patógenos e doenças (EIRA *et al.*, 2006). *C. arabica* é preferido às demais espécies de café devido à melhor qualidade da bebida (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006), sendo favorecido por compostos acumulados nos frutos maduros.

C. arabica L. é um arbusto polimorfo, introduzido no norte do Brasil em 1727. Evidências indicam que a espécie é oriunda do sudeste da Etiópia, de regiões montanhosas, entre 1.000 a 2.500 m de altitude (MIRANDA; PEREIRA; BERGO, 1999). *C. arabica* L. é um alotetraplóide ($2n=4x=44$), que se reproduz em 90% dos casos por autofecundação (CHARRIER; BERTHAUD, 1985), originado a partir da hibridação natural entre *C. eugenioides* ($2n=2x=22$) e *C. canephora* ($2n=2x=22$) (LASHERMES *et al.*, 1997). O café Arábica é caracterizado por apresentar pequena variabilidade genética (LASHERMES *et al.*, 1996), o que é atribuído a sua biologia reprodutiva (planta autógama) (PRAKASH *et al.*, 2002), ao seu centro de origem limitado e ao fato de terem sido utilizadas pequenas quantidades de sementes durante o processo de dispersão do café (PINTO, 2006).

No gênero *Coffea*, o desenvolvimento do fruto se dá entre a antese e o seu amadurecimento total. Em *C. racemosa* este processo leva de 2 a 3 meses, enquanto para *C. arabica* e *C. canephora* são necessários de 6 a 8 meses e 9 a 11 meses, respectivamente (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). O crescimento dos frutos de café não é uniforme, o que acarreta a presença de frutos em diferentes

estádios de maturação na mesma planta. Em *C. arabica* é observada maior tendência à uniformidade nos frutos durante o estágio final de maturação, quando proporções significativas do fruto se encontram no estágio cereja (DE CASTRO *et al.*, 2005).

Enquanto a maioria das plantas floresce na primavera e frutificam no mesmo ano fenológico, o cafeeiro Arábica apresenta uma sucessão de fases vegetativas e reprodutivas aproximadamente a cada dois anos (CAMARGO, 1985). O ciclo fenológico do cafeeiro referente a dois anos foi subdividido, de acordo com as condições edafoclimáticas, em seis fases distintas: 1º-vegetação e formação das gemas foliares (de setembro a março), 2º-indução e maturação das gemas foliares (de abril a agosto), 3º-floração (1º fase do segundo ano fenológico ocorrendo de setembro a dezembro) , 4º-granação dos frutos (de janeiro a março), 5º maturação dos frutos (de abril a junho) e 6º repouso e senescência dos ramos terciários e quaternários (de julho a agosto) (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

O fruto do cafeeiro Arábica pode ser definido como uma drupa de formato ovóide, inicialmente verde, passando a vermelho (ou amarelo) com a maturação do fruto. Contém normalmente duas sementes elípticas, que são plano-convexas e possuem um sulco longitudinal sobre a superfície plana (CAVALARI, 2004).

3.1.3 *Coffea Racemosa*

C. racemosa é uma planta originária do leste africano. Embora seus frutos sejam consumidos localmente a espécie não é comercialmente explorada devido a baixa produtividade (GEROMEL, 2008). *C. racemosa* é bastante utilizado em cruzamentos com *C. arabica*, pois além de possuir resistência a várias doenças, possui também diversas características agronômicas favoráveis, tais como resistência à seca, maturação precoce dos frutos e baixo teor de cafeína nos grãos (GUERREIRO FILHO, 1992). O período de desenvolvimento completo dos frutos de

C. racemosa ocorre aproximadamente entre 60 e 110 dias após a florada (DAF), sendo bastante antecipado em relação a espécies como *C. arabica*,

C. canephora. O tamanho dos frutos dessa espécie é bastante reduzido quando comparado com o de *C. arabica* (GEROMEL, 2008).

3.1.4 Frutificação do Cafeeiro

A frutificação do cafeeiro pode ser considerada sob três processos seqüenciais: pegamento da flor, desenvolvimento do fruto e maturação. Inicialmente há um pequeno crescimento do fruto, segue-se então um período de crescimento rápido, até o fruto verde atingir seu tamanho final (metade do tamanho do fruto maduro) (RENA *et al.*, 1986). A partir da fecundação até o estágio intermediário de desenvolvimento o fruto de café é constituído por pericarpo e perisperma (Figura 1-A e 2), sendo o perisperma gradualmente substituído pelo endosperma (semente verdadeira) (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Inicialmente, o endosperma encontra-se na fase aquosa tornando-se rígido (Figura 1-B e 2) à medida que este se desenvolve durante os estádios de maturação como resultado do acúmulo de proteínas de reserva, sacarose e polissacarídeos. No ultimo estágio da maturação ocorre a desidratação do endosperma e mudança na coloração do pericarpo (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

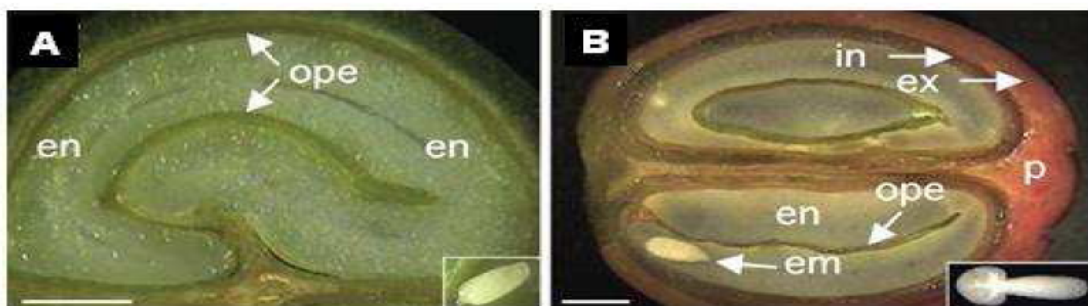


Figura 1 – Tecidos do fruto de café em diferentes fases de desenvolvimento. A. corte transversal do fruto imaturo (90 -120 DAF), mostrando o perisperma (ope) como uma película que envolve o endosperma (en), ainda na fase líquida. B. corte longitudinal do fruto maduro (230 -240 DAF), evidenciando as duas sementes desenvolvidas e o embrião maduro (em), localizado no endosperma já solidificado. As porções internas (in) e externas (ex) do exocarpo também são mostradas. De Castro, R. D. e Marraccini, P. (2006).

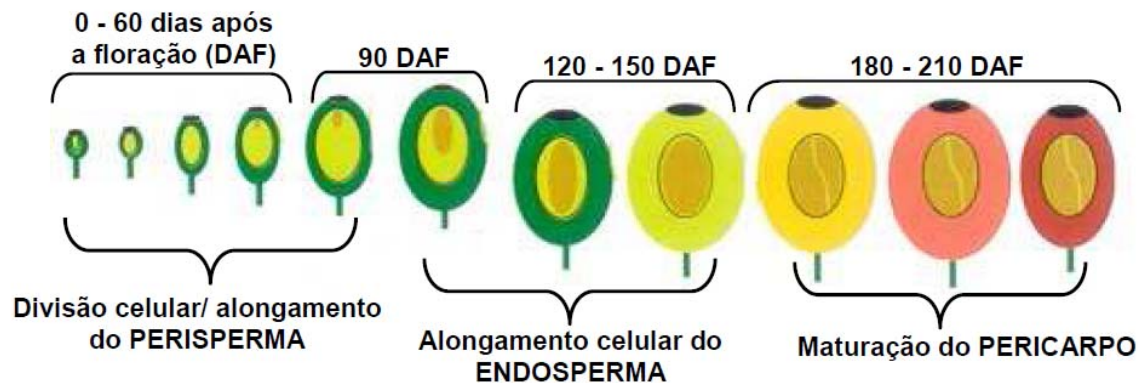


Figura 2 – Desenvolvimento e maturação do fruto de *C. arabica*. De Castro, R. D. e Marraccini, P. (2006).

O pericarpo é composto por três tecidos principais: exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo permanece como um tecido de coloração verde durante a maior parte do desenvolvimento do fruto. Em frutos de café não maduros, o exocarpo é um tecido fotossinteticamente ativo que pode contribuir para suprir a demanda necessária de carboidratos, especialmente durante o estágio de preenchimento do grão (VAAST *et al.*, 2006). O mesocarpo (polpa verdadeira) é rico em açúcares (açúcares redutores e sacarose) e água. A porção exterior é formada de células parenquimáticas que possuem parede celular densa e compacta no fruto verde, tornando-se mais relaxada durante a maturação, provavelmente devido a modificações nos compostos pécnicos (OUGUERRAM, 1999 apud DE CASTRO; MARRACCINI, 2006, p. 178). O endocarpo (também chamado de pergaminho ou parênquima tardio), localizado mais internamente, é um tecido lignificado que provavelmente atua protegendo a semente de café contra a ação de enzimas digestivas presente na saliva de animais frutívoros (URBANEJA *et al.*, 1996 apud De CASTRO; MARRACCINI, 2006, p. 178). O perisperma do café desenvolve-se a partir do nucelo do óvulo logo após a fecundação (MENDES, 1942).

De Castro e Marraccini (2006) indicam a ocorrência de intensa divisão e expansão celular durante os estádios iniciais do desenvolvimento do perisperma, 0-90 DAF (Figura 2). Resultados apresentados por Geromel (2006), relacionando a porcentagem da massa fresca de cada tecido do fruto com dias após o florescimento (DAF), mostram o desenvolvimento (aumento de massa) do perisperma a partir de 50 DAF, atingindo pico máximo em torno de 100 DAF, com

posterior decréscimo até 200 DAF. Desta forma, o perisperma é o tecido responsável por determinar o tamanho final do grão de café, visto que o perisperma delimita o espaço que será preenchido pelo endosperma. Quando o fruto está maduro, o perisperma torna-se uma fina película, chamada de película prateada (DEDECCA, 1957).

Como tecido de armazenamento, o endosperma maduro acumula compostos que servirão como reserva nutricional, mobilizadas pelo embrião durante o processo germinativo da semente de café. O endosperma pode ser facilmente separado do perisperma após 90 DAF. De 90 até 150 DAF, os frutos de café crescem como resultado do aumento do perisperma, evento que ocorre simultaneamente com a histo-diferenciação e crescimento do endosperma e embrião, quando intensa atividade mitótica e de expansão podem ser observadas (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Até 90 dias as células do endosperma são caracterizadas por possuírem parede celular fina, que se torna espessa entre 130 e 190 DAF devido à deposição de um complexo de polissacarídeos contendo arabinogalactanas e galactomananas (DENTAN, 1985). O processo de maturação está completo por volta de 230 DAF.

3.2 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL PRIMÁRIA

Células vegetais crescem expandindo a parede celular por um processo de extensão irreversível (*creep*), onde as microfibrilas de celulose e a matriz de polissacarídeos deslizam entre a parede, aumentando a área de contato (COSGROVE, 2005). Visto que as células são firmemente ligadas, a migração celular não é possível e a morfogênese se dá devido à divisão e aumento celular.

Nos vegetais são encontrados dois tipos de parede: a parede celular primária e secundária. A parede celular primária é a primeira a se desenvolver em células jovens; é a única em células com alta taxa de divisão celular e em células maduras envolvidas em processos metabólicos. A parede secundária está localizada na superfície interna da parede primária, e é importante em células cuja função é estrutural, sendo que na maioria das vezes depois de sua deposição ocorre a morte celular. A parede celular vegetal determina a resistência mecânica de estruturas

vegetais, promove a junção celular, contribui com a forma e com as propriedades estruturais das plantas, atua na morfogênese vegetal, determina a relação entre pressão de turgor e volume celular, atua como barreira a difusão limitando o tamanho das macromoléculas que podem alcançar a membrana plasmática a partir do exterior e age como a principal barreira estrutural a invasão de patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A parede celular primária é de composição fibrosa, onde microfibrilas de celulose são encontradas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Através de pontes de hidrogênio, polissacarídeos altamente ramificados (hemicelulose) ligam-se a superfície das microfibrilas, formando uma rede fibrosa embebida numa malha gelificada de proteínas. Em termos gerais, pode ser dito que as microfibrilas de celulose encontram-se embebidas em uma matriz constituída de polissacarídeos, glicoproteínas, proteoglicanas, compostos de baixo peso molecular e íons (MOHNEN, 1999).

Células em crescimento possuem parede celular tipicamente fina e flexível (0,1-1 μ m) (COSGROVE, 2005), constituída por proteínas e principalmente polissacarídeos estruturais, sendo a celulose, hemicelulose e pectina os três polissacarídeos mais comuns (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). A parede celular pode conter também minerais e, nos últimos estágios de desenvolvimento, grandes quantidades de lignina.

A celulose, o polissacarídeo estrutural mais abundante em vegetais, é constituída por unidades repetidas de D-glicose, ligadas covalentemente por ligações do tipo β ,1-4 (ligação covalente entre o carbono número 1 de uma glicose e o carbono número 4 da próxima glicose), gerando um polímero linear não ramificado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Denomina-se microfibrilas de celulose a estrutura forte e organizada, resultante da união de 30 a 70 cadeias de celulose. A celulose é secretada por um complexo de membranas que liberam microfibrilas a partir da superfície celular (COSGROVE, 2005). Espaços entre moléculas desarranjadas nas microfibrilas são preenchidos com compostos altamente hidrofílicos da matriz extracelular (pectinas, proteínas e hemicelulose), formando uma rede hidrofílica tridimensional, responsável pela permeabilidade da parede, controlando a intensidade das trocas de nutrientes, catabólitos e sinais químicos entre as células e o meio extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A hemicelulose refere-se à classe heterogênea de polímeros de pentose, compostos por diferentes monômeros, e glicose. São ligadas as microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio, constituindo rede estrutural complexa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Os xiloglicanos representam a categoria mais abundante de hemicelulose, com esqueleto formado por moléculas de glicose (ligações β ,1-4), ramificadas com unidades de D-xilose. Outras categorias de hemicelulose são os xilanos, glicomananos, e arabnoxilanas (COSGROVE, 2005). Nas plantas são encontradas outras hemiceluloses não estruturais, genericamente denominadas de goma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

As pectinas, principalmente encontradas na lamela média, são polissacarídeos ácidos, complexos, altamente ramificados, hidrofílicos, sendo caracterizado por um grande número de resíduos de ácido D-galacturônico, unidos por ligações α ,1-4. Um dos grupos mais importantes de pectinas é o dos ácidos poligalacturônicos ou, poligalacturonanos; estes são homopolímeros helicoidais, onde alguns ou todos os seus grupos carboxilas podem estar metilados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

No cafeeiro, os polissacarídeos desempenham importante papel na formação dos componentes responsáveis pelo sabor da bebida durante a torrefação e também conferem estabilidade à espuma do café expresso (NUNES; COIMBRA, 1998). Representam mais de 50% do peso seco do fruto verde, sendo as mananas, arabigalactanas e celulose os principais polissacarídeos presentes neste fruto (REDGWELL; FISCHER, 2006).

A parede celular tem como característica importante crescer mais rapidamente em pH ácido que em pH neutro, sendo este fenômeno denominado crescimento ácido.

3.3 GENES EXPRESSOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DOS FRUTOS DE CAFÉ

O desenvolvimento e a maturação dos frutos são processos controlados direta ou indiretamente por mudanças na expressão gênica. No entanto, apesar da importância da compreensão dos mecanismos governados por estas

características, trabalhos em nível molecular sobre o desenvolvimento e maturação dos frutos do cafeeiro são escassos. De forma geral, os estudos existentes priorizam a composição bioquímica dos grãos (LEROY *et al.*, 2006; REDGWELL; FISCHER, 2006; OOSTERVELD *et al.*, 2003), a qualidade do grão (PIMENTA; VILELA, 2002; FARAH *et al.*, 2006), a diversidade genética (ANTHONY *et al.*, 2001; ANTHONY *et al.*, 2002; PRAKASH *et al.*, 2002; CHAPARRO; CRISTANCHO; GAITÁN, 2004), entre outros.

O processo de desenvolvimento dos frutos compreende as etapas de crescimento, maturação, amadurecimento e senescência (PEZZOPANE *et al.*, 2003). Durante a fase de crescimento ocorre aumento de atributos físicos dos frutos. No cafeeiro, o processo de maturação é iniciado com o aumento da atividade respiratória e com a síntese de etileno, acompanhado do metabolismo de açúcares e ácidos, degradação da clorofila e síntese de pigmentos responsáveis pela mudança de coloração do pericarpo, além do decréscimo da adstringência e síntese de compostos voláteis, como aldeídos, ésteres, cetonas e álcoois que caracterizam o aroma do fruto maduro (CARVALHO; CHALFOUN, 1985).

A maturação dos frutos pode ser modificada tanto pela manipulação de genes envolvidos no controle do florescimento quanto pelo controle da expressão de genes envolvidos com os estádios finais da maturação, processo desencadeado pela ação do etileno (RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006).

Pereira *et al.* (2005) estudaram a produção de etileno e a expressão do gene ACC oxidase (*Ca-ACO*) durante a maturação dos frutos de *C. arabica*. A respeito da produção de etileno foi verificado aumento da produção deste fitormônio em frutos verde cana, com decréscimo em frutos cereja, evidenciando então uma fase climatérica na maturação dos frutos de café. O gene *Ca-ACO* foi clonado e através da análise do seu padrão transcricional, via Northern blot, foi verificado menor número de transcritos em fruto verde, com aumento a partir do fruto verde cana, havendo pouca alteração nas etapas subseqüentes de maturação. Os resultados obtidos sugerem a atuação de mecanismos de controle pós-transcricionais (PEREIRA *et al.*, 2005).

Ribeiro (2007), através da técnica de display diferencial identificou cDNAs diferencialmente expressos durante a maturação de frutos de *C. arabica* cv. Mundo Novo. cDNAs isolados no estágio verde apresentaram similaridade com vicilina, nodulina, ATP sintase, ubiquitina e proteína de ligação a GTP (Rab 7).

Algumas dessas proteínas estão envolvidas em processos essenciais para a manutenção da célula e para diferenciação e divisão celular. Já para frutos no estágio amarelo foram encontrados cDNAs com similaridade para proteína do tipo bZIP que responde ao ácido abscísico e ubiquitina. No estágio vermelho foram isolados três cDNAs apresentando similaridade com proteína de ligação a GTP, oxidoreductase e transposase.

A atividade da pectina e enzimas pectinolíticas foi analisada em quatro estádios de maturação dos frutos de café (PIMENTA; CHAGAS; COSTA, 2000). Estes autores observaram no grão verde porcentagem média de solubilidade da pectina, alta atividade da enzima pectinametilesterase (E.C.3.2.2.22) e baixa atividade da enzima poligalacturonase (E.C.3.2.1.15), comparando-se com os outros estádios de maturação. O grão verde-cana apresentou baixa porcentagem de solubilidade da pectina e valores intermediários da pectinametilesterase e poligalacturonase. Maior solubilidade da pectina e pequena atividade da pectinametilesterase e poligalacturonase foram encontradas no estágio cereja, sugerindo menores danos a parede celular. O grão seco/passa apresentou alta porcentagem de solubilidade da pectina, alta atividade da poligalacturonase e baixa atividade da pectinametilesterase.

Mais recentemente vem sendo relatada a atuação das expansinas nos processos solubilização e dissociação da parede celular. Diferentes autores sugerem a relação desta proteína com o desenvolvimento, maturação e maciez dos frutos (ROSE; LEE; BENNETT, 1997; CIVELLO *et al.*, 1999, SAMPEDRO; COSGROVE, 2005, ISHIMARU *et al.*, 2006, VIDHU; ANIRUDDHA; PRAVENDRA, 2007).

A identificação e a caracterização de genes que atuam no desenvolvimento e na maturação dos frutos de café poderão fornecer subsídios importantes para elucidação dos processos bioquímicos e fisiológicos do fruto e, conseqüentemente, importantes informações para o melhoramento da qualidade da bebida, bem como para a solução de problemas que afetam a cafeicultura, como, por exemplo, a desuniformidade na maturação dos frutos.

3.4 EXPANSINAS

As expansinas (exps) foram inicialmente identificadas em sementes de pepino (*Cucumis sativus*) como proteínas capazes de induzir a extensão de células isoladas, atuando como mediadoras das respostas ao crescimento ácido, catalisando a expansão da parede celular vegetal (McQUEEN-MANSON; DURACHKO; COSGROVE, 1992). A atividade ótima dessas proteínas se dá em pH ácido, visto que é nesta condição que as células das plantas crescem mais rapidamente e a parede torna-se mais flexível (COSGROVE, 1998). O pH da parede celular é normalmente determinado pela atividade da H⁺ ATPase da membrana plasmática, que lança prótons para a parede celular; o pH da parede é tipicamente em torno de 5,5, mas pode ir abaixo de 4,5 em algumas circunstâncias (RAYLE; CLELAND, 1992; BIBIKOVA *et al.*, 1998). Acredita-se que estas proteínas interrompam ligações não covalentes, do tipo ponte de hidrogênio, na interface da celulose e hemicelulose, promovendo a expansão celular (McQUEEN-MANSON; COSGROVE, 1995).

São conhecidas quatro famílias de expansinas: α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), expansina-like A (EXLA) e expansina-like B (EXLB). As α -expansinas, que representam a maior família, pertencem a um grupo de proteínas altamente conservadas, que provavelmente controlam a extensão da parede celular e processos de desenvolvimento incluindo a dissociação e separação da célula. Todas as α -expansinas caracterizadas apresentaram pH ótimo em torno de 4 (McQUEEN-MANSON, DURACHKO; COSGROVE, 1992; CHO; KENDE, 1997); isto permite que a célula regule rapidamente a atividade das α -expansinas por meio de modulações no pH da parede celular. As β -expansinas, que compõem a segunda maior família, promovem intensa degradação da parede celular dos grãos de pólen; provavelmente não estão envolvidas no crescimento ácido, mas sim no afrouxamento da parede celular que é associada com a invasão de tecidos maternos pelo túbulo polínico (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). A presença de diversas β -expansinas no grão de pólen jovem assim como em outros tecidos mostra que esta classe de expansinas também tem uma variedade de funções relacionadas ao desenvolvimento e à degradação da parede celular. Para as β -expansinas foi caracterizado pH ótimo em torno de 5,5 (LI; JONES; McQUEEN-MANSON, 2003). Em

relação a EXLA e a EXLB são conhecidas somente as seqüências gênicas, sendo que nenhuma função foi ainda determinada para estas proteínas (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005).

A seqüência protéica das expansinas é tipicamente composta por 250 a 275 aminoácidos (aa) e compreende dois domínios precedidos por um peptídeo sinal (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). O peptídeo sinal em expansinas tem aproximadamente 20 aa e a sua clivagem origina a proteína madura. Nas plantas, a presença de peptídeo sinal é suficiente para direcionar a proteína para a parede celular, via retículo plasmático – Complexo de Golgi (SCHERBAN *et al.*, 1995). O primeiro domínio (domínio catalítico), encontrado na região N-terminal, apresenta baixa homologia com proteínas da família 45 de hidrolases glicosídicas (GH45). No entanto, apesar deste domínio conter muitos resíduos correspondentes ao sítio catalítico da GH45, nenhuma atividade hidrolítica foi detectada em α -expansinas e β -expansinas (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). O segundo domínio (domínio para ligação de polissacarídeos), localizado na região C-terminal, tem homologia com proteínas denominadas grupo 2 de alergênicos de pólen de gramíneas (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). α -expansinas e β -expansinas possuem resíduos conservados de cisteínas (Cys) na região N-terminal do domínio catalítico. Em lecitina esses resíduos formam uma série de pontes dissulfito que estabilizam a proteína (SCHERBAN *et al.*, 1995). Possuem, também, um motivo HFD (histidina, fenilalanina e aspartato, respectivamente) na região central e, resíduos conservados de triptofanos (Trp) na região C-terminal do segundo domínio (CHOI; CHO; LEE, 2006). Proteínas da família das α -expansinas podem ser distinguidas das outras famílias devido à presença de uma grande inserção e uma deleção próximas ao primeiro domínio.

EXLAs possuem resíduos conservados Cys e Trp nas regiões N-terminal e C-terminal, respectivamente. EXLAs possuem também um motivo CDRC (cisteína, aspartato, arginina, cisteína) na região amino terminal do domínio catalítico; seu segundo domínio tem uma extensão de aproximadamente 17 aa, que não são encontrados nas outras famílias de expansinas (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005).

EXLBs possuem resíduos conservados de Cys e Trp na região C-terminal, porém perderam o motivo HFD (histidina, fenilalanina e aspartato) na região C-terminal (CHOI; CHO; LEE, 2006). Visto que EXLA e EXLB perderam o

motivo HFD acredita-se que estas duas famílias de proteínas atuam de forma diferente que as outras duas.

Expansinas destas diferentes famílias apresentam identidade protéica, umas com as outras, entre 20% e 40%, sendo alto o grau de conservação no domínio catalítico. Proteínas maduras da família β -expansinas são mais divergentes entre si do que as da família α -expansinas. Para β -expansinas a média de identidade é de 44% em *A. thaliana* e 51% em arroz; já em α -expansinas a média é de 55% tanto para *A. thaliana* quanto para arroz (CHOI; CHO; LEE, 2006). EXLAs possuem alto grau de identidade entre suas proteínas, sendo 84% em *A. thaliana* e 73% em arroz.

3.4.1 Mecanismo de Ação e Regulação das Expansinas

As expansinas não têm atividade hidrolítica e nenhum outro tipo de atividade enzimática (LI; COSGROVE, 2001; MC-QUEEN MANSSON; COSGROVE, 1995). Essa multifamília protéica atua rapidamente, promovendo a extensão irreversível da parede celular e mediando o deslizamento dos polissacarídeos da matriz sem que ocorra a hidrólise dos polissacarídeos mais abundantes; ou seja, não ocorrem modificações estruturais na parede, e nem alterações na sua plasticidade e elasticidade (YUAN; WU; COSGOVE, 2001). Desta forma, foi proposto um mecanismo de ação não enzimático para as expansinas, onde essas proteínas desfazem ligações não covalentes que ligam a matriz de polissacarídeos entre si e com as microfibrilas de celulose (COSGROVE, 2000a). O movimento das expansinas parece ser restrito a sua difusão lateral, ao longo da superfície das microfibrilas de celulose (COSGROVE, 2000a). Esse tipo de difusão restrita possibilita as expansinas a procurarem pela superfície das microfibrilas, afrouxando localmente a ligação destas aos polissacarídeos, permitindo movimentação e relaxamento da parede celular (COSGROVE, 2000a). Um dos experimentos que comprova esse mecanismo de ação das expansinas mostra que estas proteínas conseguem promover relaxamento de papéis constituídos somente por celulose, visto que as forças da interação entre as fibras de celulose provem de ligações não covalentes (McQUEEN-MANSON; COSGROVE, 1994). As expansinas também

demonstram atividade de expansão *in vitro* (COSGROVE, 2000a); em contraste com a atuação das expansinas, a extensão da parede celular, promovida por endoglucanases aumentam a plasticidade e elasticidade da parede, indicando a ocorrência de mudanças estruturais (YUAN; WU; COSGOVE, 2001).

α -expansinas e β -expansinas atuam sobre substratos diferentes da parede (Figura 3). α -expansinas promovem relaxamento induzindo a dissociação local e o deslizamento de xiloglucanas sobre a superfície da celulose, enquanto que as β -expansinas atuam sobre xilanas (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). Segundo Cosgrove (2000b) as α -expansinas atuam com eficiência tanto na parede celular de monocotiledôneas e dicotiledôneas, enquanto β -expansinas demonstram melhor desempenho em células de gramíneas.

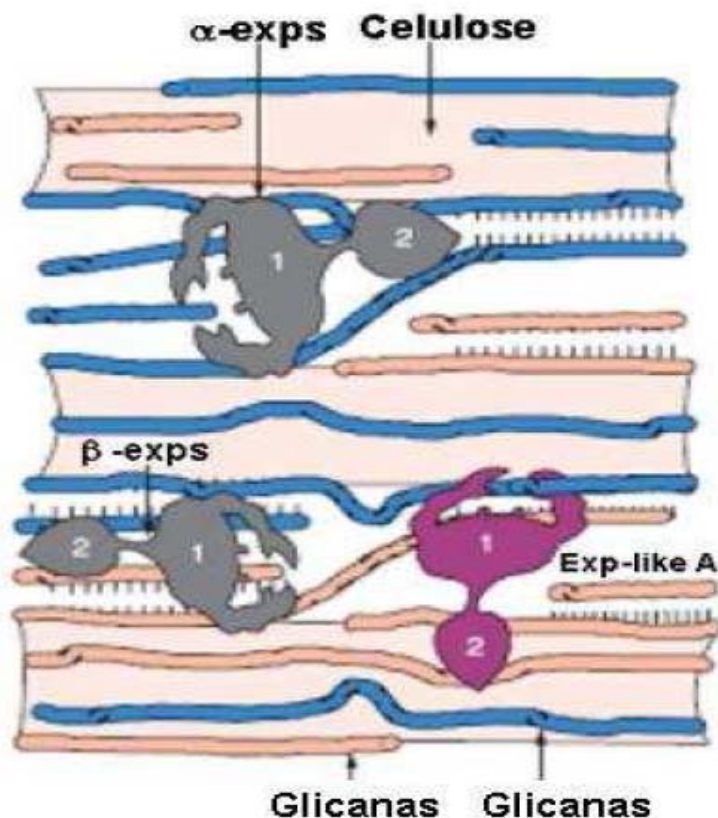


Figura 3 – Modelo simplificado da parede celular vegetal e de seu afrouxamento, causado pela atuação das expansinas. A parede é composta por microfibrilas de celulose (área rosa), as quais estão ligadas a diferentes glicanas, como xiloglucanas e xilanas (barras azuis e laranja). Juntos estes polissacarídeos formam uma matriz rígida e flexível unida por pontes de hidrogênio (pequenas linhas horizontais). A expansão da parede envolve a movimentação e separação das microfibrilas de celulose de forma irreversível. 1-domínio catalítico e 2-domínio para ligação de celulose. Sampedro, J. e Cosgrove, D. J. (2005).

A atuação das expansinas no alongamento e expansão celular já foi observada em diferentes tecidos em crescimento como: hipocótilos (SCHERBAN *et al.*, 1995; CADERAS *et al.*, 2000) raiz e pêlos radiculares (ZHANG; HASENSTEIN, 2000; CHO; COSGROVE, 2002), xilema (IM; COSGROVE; JONES, 2000; GRAY-MITSUMUNE *et al.*, 2004) e folhas (PIEN *et al.*, 2001; MULLER *et al.*, 2007). A relação das expansinas com processos de desenvolvimento e maturação de frutos vem sendo estudada em diversas espécies de plantas como: arroz (CHOI *et al.*, 2003) tomate (ROSE; LEE; BENNETT, 1997; BRUMMELL *et al.*, 1999; BRUMELL; HARPSTER, 2001; POWELL *et al.*, 2003), uva (ISHIMARU *et al.*, 2007), trigo (LIN *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007), figo (OMONDI *et al.*, 2004), banana (TRIVEDI; PRAVENDRA, 2004; VIDHU; ANIRUDDHA; PRAVENDRA, 2007), morango (CIVELLO *et al.*, 1999; DOTTO; MARTÍNEZ; CIVELLO, 2006) e manga (VIDHU; CHOURASIA; PRAVENDRA, 2005).

Rose *et al.* (1997) reportaram a identificação do gene *LeEXP1* em tomate (*Lycopersicon esculentum*). Este gene possui altos níveis de transcrição, sendo especificamente transcrito durante o final processo maturação do fruto e tem sua atividade regulada pelo etileno. Posteriormente, Brumell *et al.* (1999), também em tomate, isolaram cinco genes de α -expansinas (*LeEXP3* – *LeEXP7*) com atuação durante o desenvolvimento e maturação. Vidhu *et al.* (2007) identificaram quatro genes de α -expansinas expressos durante toda a fase de maturação em banana (*Musa acuminata*). Um dos genes identificados, *MaEXPA2*, é fruto específico, demonstrando expressão dependente de liberação de etileno e diretamente relacionada com a fase final de maturação.

3. 5 PROJETO GENOMA CAFÉ

O Projeto Genoma Café Brasileiro (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>), finalizado em 2005, teve como objetivo disponibilizar recursos da Gênomica à comunidade científica e aos diferentes segmentos da cadeia produtiva do café. O projeto consistiu no seqüenciamento em larga escala de genes expressos (ESTs) de cafeeiro e teve como meta identificar e anotar de 20.000 a 25.000 genes a partir do seqüenciamento de 200.000 clones de

ESTs obtidos de quarenta e quatro bibliotecas de cDNA, principalmente de *C. arabica*. O cDNA foi obtido a partir de diferentes tecidos do cafeeiro (folhas, raízes, flores, sementes, frutos, entre outros) em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidas a diversas condições de estresse. Também foram construídas bibliotecas de *C. canephora* e *C. racemosa*, espécies com característica de interesse agrônomo (VIEIRA *et al.*, 2006). O resultado final foi o sequenciamento de 214.964 *reads* entre as três espécies, sendo que seqüências indesejadas, como as que possuíam baixa qualidade e pequeno tamanho, foram retiradas para evitar a introdução de informação irrelevante no banco de dados. Após análises de bioinformática foram geradas cerca de 35.000 seqüências não redundantes (Unigenes). A exploração dos dados deste projeto fornece ferramentas que podem ser utilizadas em programas de melhoramento por mapeamento físico e/ou caracterização de genes pelas técnicas de clonagem. A partir das seqüências (*reads*), de genes expressos, é possível a obtenção de informações e dados sobre os mesmos, e a comparação com genes de outros organismos. Os dados gerados são fundamentais para a identificação de mecanismos genéticos que controlam características importantes no cafeeiro, entre elas o desenvolvimento e a maturação dos frutos, seja pela caracterização via banco de dados ou por experimentos mais detalhados de expressão gênica.

4 ARTIGO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRÊS GENES DE A-EXPANSINAS EM *COFFEA ARABICA* E *COFFEA RACEMOSA* DURANTE O DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DO FRUTO.

Artigo a ser submetido à Revista Plant Physiology and Biochemistry - Elsevier

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRÊS GENES DE α -EXPANSINAS EM *COFFEA ARABICA* E *COFFEA RACEMOSA* DURANTE O DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DO FRUTO

Ilara Gabriela Frasson Budzinski¹, Luiz Filipe Protasio Pereira², Luiz Gonzaga Esteves Vieira¹

Abstract

Fruit development and maturation involve several cell wall modifying enzymes and proteins, including expansins. Fruit specific expansins have been characterized in different species, but little is known about their expression in coffee fruits. The conditions during development and maturation of the coffee fruit have a large impact on grain size, cup quality and consequently on prices of the coffee beans. As a first step towards the study of the physiological role and the regulation of α -expansin gene family in *Coffea*, fruit-expressed isoforms of this gene were identified by using the ESTs in the Brazilian Coffee Genome Project database. Here we report here the expression pattern of three α -expansin genes, *CaEXPA1*, *CaEXPA2* and *CaEXPA3* in different fruit tissues (perisperm, endosperm and pericarp) of *C. arabica* IAPAR-59, *C. arabica* IAPAR-59 Graúdo and *C. racemosa*. *C. arabica* IAPAR-59 Graúdo is a cultivar characterized by its large fruit size. Accumulation of *CaEXPA1* transcripts was high in the perisperm (tissue responsible for the coffee bean size). In addition, transcript level differences observed between the perisperm of IAPAR-59 and IAPAR-59 Graúdo strongly suggest the participation of *CaEXPA1* in the regulation of coffee bean size. We observed specific transcription of *CaEXPA2* in pulp during the later stages of fruit maturation and ripening. *CaEXPA3* transcriptional pattern was similar to *CaEXPA1*; however the expression of *CaEXPA3* is probably associated with fruit maturation and ripening. *CaEXPA1*, *CaEXPA2* and *CaEXPA3* mRNA were not detected in the endosperm of both *C. arabica* and *C. racemosa*. These findings suggest that the three coffee α -expansins genes play an important role in coffee fruit cell division from the early developmental stages through the maturation/ripening.

Keywords: Coffee. Fruit development. Maturation. α -expansin.

¹ Instituto Agronômico do Paraná -IAPAR, LBI-AMG, CEP 481, 86001-970 Londrina, PR, Brasil - Universidade Estadual de Londrina – UEL, CEP 86051-990 Londrina, PR, Brasil.

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Café, CEP 481,86047-902 Londrina, PR, Brasil

Introdução

O café é um dos principais produtos agrícolas mundiais, sendo cultivado em mais de 60 países. No gênero *Coffea*, o desenvolvimento do fruto se dá entre a antese e o seu amadurecimento total. Em *C. racemosa* este processo leva de 2 a 3 meses, enquanto para *C. arabica* e *C. canephora* são necessários de 6 a 8 meses e 9 a 11 meses, respectivamente (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

A qualidade do café vem sendo associada com o estágio de maturação do fruto durante o período de colheita (PEREIRA *et al.*, 2005). O crescimento dos frutos de café não é uniforme, o que acarreta a presença de frutos em diferentes estádios de maturação na mesma planta. A presença de frutos verdes e maduros no mesmo lote de grãos do cafeeiro altera teores de acidez, amargor e conseqüentemente a qualidade da bebida (RIBAS; PEREIRA; VIEIRA, 2006). Uma das formas de minimizar este problema é a utilização de plantas de café com desenvolvimento e maturação uniforme dos frutos. O tamanho do grão de café é importante para os cafeicultores, pois, esta característica está associada a padrões internacionais de classificação, sendo que, grãos mais uniformes e maiores (peneira-alta) refletem em melhores preços para a venda.

As expansinas (exps) são proteínas que induzem a extensão da parede celular em condições de pH ácido (LIN *et al.*, 2005). Estas proteínas foram inicialmente identificadas em sementes de pepino (*Cucumis sativus*), sendo capazes de induzir a extensão de células isoladas (McQUEEN-MANSON; DURACHKO; COSGROVE, 1992). As expansinas são codificadas por uma família multigênica (WU, MEELEY; COSGROVE, 2001) e com base na similaridade entre as seqüências podem ser divididas em quatro famílias: α -expansinas, β -expansinas, expansina-like A e expansina-like B (LI *et al.*, 2003). A atuação das expansinas no alongamento e expansão celular já foi observada em diferentes tecidos em crescimento como: hipocótilos (SCHERBAN *et al.*, 1995; CADERAS *et al.*, 2000) raiz e pêlos radiculares (ZHANG; HASENSTEIN, 2000; CHO; COSGROVE, 2002), xilema (IM; COSGROVE; JONES, 2002; GRAY-MITSUMUNE *et al.*, 2004) e folhas (PIEN *et al.*, 2001; MULLER *et al.*, 2007). A relação das expansinas com processos de desenvolvimento e maturação de frutos vem sendo estudada em diversas espécies de plantas como: arroz (CHOI *et al.*, 2003) tomate (ROSE; LEE; BENNETT, 1997; BRUMMELL *et al.*, 1999; BRUMMELL; HARPSTER, 2001; POWELL *et al.*, 2003), uva (ISHIMARU *et al.*,

2007), trigo (LI *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007), figo (OMONDI *et al.*, 2004), banana (TRIVEDI; PRAVENDRA, 2004; VIDHU; ANIRUDDHA; PRAVENDRA, 2007), morango (CIVELLO *et al.*, 1999; DOTTO; MARTÍNEZ; CIVELLO, 2006) e manga (VIDHU; CHOURASIA; PRAVENDRA, 2005). *LeEXP1*, isolada de tomate, foi a primeira expansina fruto-específica identificada, tendo sua atividade regulada pelo etileno (ROSE *et al.*, 1997). Brumell *et al.* (1999), também em tomate, isolaram cinco genes de α -expansinas (*LeEXP3* – *LeEXP7*) com atuação durante o desenvolvimento e maturação de frutos. Vidhu *et al.* (2007) identificaram quatro genes de α -expansinas expressos durante toda a fase de maturação em banana (*Musa acuminata*). Um dos genes identificados, *MaEXPA2*, é fruto específico, demonstrando expressão dependente de liberação de etileno e diretamente relacionada com a fase final de maturação. Tendo em vista a importância econômica da cafeicultura, o nosso grupo teve por interesse compreender melhor a ação das expansinas durante os processos de desenvolvimento e maturação dos frutos de café. Neste trabalho, três isoformas de α -expansinas (*CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*) mais abundantes em frutos de cafeeiro foram identificados em banco de dados de ESTs. O padrão de expressão espacial e temporal de RNAm destas isoformas foram analisadas em tecidos de frutos de *C. arabica* e *C. racemosa* durante diferentes estádios de desenvolvimento.

Materiais e Métodos

Análise In silico dos Genes de Expansinas

Inicialmente foram realizadas buscas por *reads* (seqüências) de expansinas a partir da opção “palavra chave” no banco de dados do Projeto Genoma Café (www.lge.ibi.unicamp.br./café/). As seqüências obtidas foram clusterizadas localmente, e a partir dos contigs formados iniciou-se o processo de saturação em outras plataformas do Genoma Café, a fim de obter o maior número de *reads* altamente similares as expansinas. Posteriormente, os contigs e singletons foram reclusterizados e analisados através dos programas Sequencher v. 4.1.4 (Gene Codes Corporation, 1998) e BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.9.0 (HALL, 1999). Para a reclusterização no Sequencher foram utilizados os

parâmetros de 85% para a percentagem mínima de alinhamento (*minimum match percentage*) e de 20 pb para sobreposição mínima (*minimum overlap*).

Em seguida os contigs foram individualmente confrontados com as seqüências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando-se o algoritmo BlastX (ALTSHUL *et al.* 1990). A seqüência deduzida de aminoácidos de cada contig formado foi obtida através do programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder -NCBI). A localização de peptídeo sinal foi feita através do programa SignalP v. 3.0 Server (NIELSEN *et al.*, 1997) e a busca por domínios característicos das expansinas através do ScanProsite (<http://www.expasy.ch>). Para a predição da localização subcelular utilizou-se a ferramenta WolfPsort – Protein Subcellular Localization Prediction (HORTON *et al.*, 2007).

As árvores filogenéticas foram geradas por meio do método de Kimura-2 parâmetros com o auxílio do programa MEGA -Molecular Evolutionary Genetics Analysis v.3.1. Para testar a confiabilidade da análise foram utilizadas 1.000 réplicas de *bootstrap*.

Também foram realizadas buscas por seqüências de expansinas na plataforma HarvEST:*Coffea* v. 0.10 (<http://harvest.ucr.edu/>). O banco de dados utilizado pelo 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 clusterizadas. Os *contigs* formados foram reclusterizados com três *contigs* de α -expansinas previamente selecionados para verificar o possível agrupamento das seqüências do banco HarvEST:*Coffea* e do projeto Genoma Café.

Análise Molecular de α -Expansinas

Material vegetal

O material vegetal foi coletado no campo experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina (23°08'47''S e 50°52'23''O). Para análise molecular, foram coletados: botão floral, raiz, ramo plageotrópico, folha, flor e frutos de *C. arabica* cv. IAPAR-59, e frutos de *C. arabica* cv. IAPAR-59 Graúdo (cultivar de frutos grandes selecionado em populações de IAPAR-59) e de *C. racemosa*. A coleta dos frutos de *C. arabica* foi realizada a cada 25-30 dias em diferentes ramos de sete

plantas, entre os meses de outubro a abril, e, para *C. racemosa* os frutos foram coletados em diferentes ramos de cinco plantas, a cada 15 dias entre os meses de outubro a dezembro, ambos na safra de 2006/2007. Os frutos foram separados de acordo com o mês de coleta (Tabela 1) e coloração do pericarpo (Figura 4). Para as análises de biologia molecular os tecidos do fruto (pericarpo, perisperma e endosperma) também foram separados com auxílio de bisturi e nitrogênio líquido. Todo o material coletado foi estocado à temperatura de -70 °C, em recipiente hermeticamente fechado, até a sua utilização.

Tabela 1 – Modelo de separação dos frutos coletados para análises moleculares de *C. arabica*.

Mês	Dias Após Florada (DAF)	Coloração pericarpo	Estágio de Desenvolvimento
Outubro	30	Verde	Expansão Inicial (Desenvolvimento de Perisperma)
Novembro	60	Verde	
Dezembro	90	Verde	
Janeiro	120	Verde	Formação do Endosperma (Granação do Fruto)
Fevereiro	150	Verde	
Março*	180	Verde-Vermelho	Maturação dos Frutos
Abril	210	Cana-Cereja	

* Para *C. arabica* cv. IAPAR 59 no mês de março são encontrados, em sua maioria, frutos verdes. Porém o mutante *C. arabica* cv IAPAR-59 Graúdo apresenta já em março frutos de coloração verde até vermelho.





Figura 4 – Fases de maturação dos frutos dos frutos de café coletados para análises moleculares. A – *C. arabica* e B – *C. racemosa*.

Extração de DNA genômico

Para extração do DNA genômico de folhas de *C. arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo e *C. racemosa* foi utilizado o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações. Foram utilizados cerca de 2 g de material macerado em nitrogênio líquido, adicionados 20 mL de tampão de extração (2% (p/v)) CTAB, 2% (p/v) PVP, 100 mM de TRIS-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, 2% (p/v) de β -mercaptoetanol e 2% metabissulfito de sódio. O material foi incubado a 65 °C por 20 min e centrifugado a 7.500 rpm por 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifugação sendo adicionado o mesmo volume de clorofórmio (1:1), seguido de homogenização e centrifugação a 7.500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para novo tubo onde foi adicionado 0,6X volume de isopropanol. Após precipitação durante a noite, a -20 °C, as amostras foram centrifugadas a 7.500 rpm por 30 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. Em seguida o pellet foi ressuspenso em 1 mL de água milliQ autoclava e 200 μ L de RNase (1mg/ mL), deixado a 37 °C por 1h. Foi adicionado 100 μ g de proteinase K, e após a amostra permanecer 37 °C por 1 h foi adicionado 1X volume de clorofórmio seguido de centrifugação a 7.500 rpm por 5 min em temperatura ambiente; este passo foi repetido uma vez. A fase superior foi transferida para novo tubo e precipitada com acetato de sódio (3M) 10% e 2X o volume de etanol 100% *overnight* a -20° C. Após precipitação as amostras foram centrifugadas a 7.500 rpm por 30 min a 4° C, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em água milliQ autoclavada.

Para verificar a qualidade da extração do DNA, as amostras foram submetidas a eletrofose com tampão SB 1X (NaOH 500 mM) em gel de agarose 1% (p/v) com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizadas sob luz UV em transluminador. A quantificação do DNA foi feita em Fluorímetro QubitTM.

Extração de RNA total

Para evitar a degradação do RNA, todas as soluções e reagentes foram preparados com água milliQ filtrada e autoclavada e/ou água previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), a qual foi preparada na concentração de 0,1%, homogeneizada por 18 h a temperatura ambiente, seguida de autoclavagem (120 °C, 1 atm, 1 h). Com a mesma finalidade, todo material plástico utilizado foi autoclavado (120 °C, 1 atm, 20 min). A vidraria utilizada foi esterilizada a seco, a 180 °C, *overnight*. O material em porcelana foi esterilizado com álcool e RNaseAway (Invitrogen).

Para análise da expressão das isoformas de α -expansinas durante os estádios de desenvolvimento dos frutos de café, foi extraído RNA total de pericarpo, perisperma e endosperma de *C. arabica* cv. IAPAR 59, cv. IAPAR 59 Graúdo e de *C. racemosa*, em diferentes estágios de maturação. Para t

A metodologia para extração de RNA baseou-se no protocolo de Chang *et al.* (1993), com modificações. Foram usados de 2 a 3 g do material macerado em nitrogênio líquido, adicionados 25 mL de tampão de extração (2% (p/v) CTAB, 2% (p/v) PVP, 100mM de TRIS-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, 2% de β -mercaptoetanol e 2% (p/v) metabissulfito de sódio). Após incubação a 65 °C por 20 min, foi adicionado cerca de 20 mL de clorofórmio e, em seguida a solução foi centrifugada (7.500 rpm) por 5 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, seguido de homogeneização conforme descrito acima, sendo esse procedimento repetido quando necessário. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, foi adicionado LiCl₂ 12 M para uma concentração final de 2,5 M para precipitação *overnight* a 5 °C. Após a precipitação o material foi centrifugado durante 30 min (7.500 rpm) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com LiCl₂ 2,5 M, seguido de nova centrifugação. Posteriormente, o sobrenadante foi

descartado, o pellet ressuspendido em 1 mL de álcool 70% (v/v) e transferido para microtubos para centrifugação (11.000 rpm) por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em H₂O tratada com DEPC.

Para verificar a qualidade da extração de RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), com tampão TAE (2M Tris – acetato, 0,05 M EDTA), contendo brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizados sob luz UV em transluminador. A quantificação do RNA foi feita em Fluorímetro QubitTM (Invitrogen).

Clonagem do cDNAs de α -Expansinas

Para a obtenção dos cDNAs das isoformas CaEXPA1, CaEXPA2e CaEXPA3 foi utilizado 5 μg de RNA total obtido de diferentes tecidos de frutos para RT-PCR, seguindo a metodologia recomendada no kit ThermoScripttm RT-PCR System (Invitrogen). Baseado nas seqüências dos *contigs* das isoformas selecionadas no banco de dados do projeto Genoma Café, oligonucleotídeos específicos para as regiões 5'UTR (S) e 3'UTR foram desenhados usando o programa Primer Designer v. 2.0.

Cada reação de PCR (25 μL) foi realizada com 5 ng de cDNA , 10 mM TRIS-HCl pH 8,4; 50 mM KCL; 2,5 mM MgCl₂; 25 μM de cada dNTP; 1,0 U de *Taq* polimerase (Invitrogen) e 10 pmoles de cada iniciador específico para os genes de interesse. A reação foi submetida à desnaturação (5 min a 94 °C), seguida de 40 ciclos de amplificação (1 min a 94°C; 45 s a 60°C e 1min a 72°C) e à extensão final de (5 min a 72°C) em termociclador PTC -100Tm (MJ Research). Quando necessário foi realizado PCR de gradiente visando identificar a melhor temperatura de anelamento para obtenção de bandas específicas. Posteriormente, foi verificado em gel de agarose (1%) se o produto amplificado estava de acordo com o tamanho esperado.

O produto de PCR, de cada par de iniciador foi eluido em gel de agarose (1%) tampão TAE 1X, seguido de estocagem a -80 °C, por 1 h e centrifugação a 12.000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi retirado e armazenado a -20 °C.

O cDNA da isoforma *CaEXPA1* foi inserida em vetor pBluescript® II SK (+/-) (Stratagene) e das isoformas *CaEXPA2* e *CaEXPA3* foi inserida no vetor PCR 2.1– TOPO® cloning, (Invitrogen™, Life Technologies). Para a transformação foram usadas células competentes de *E. coli* estirpe DH5α ou DH10B preparadas para transformação via choque térmico ou eletroporação. As amostras foram plaqueadas em meio LB sólido (SAMBROOK *et al.*, 1989) contendo X-Gal e ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)/canamicina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a 37 °C durante a noite, sendo as colônias bacterianas transformadas selecionadas para análise.

Cortes com enzimas de restrição

Os plasmídeos foram extraídos das células bacterianas por lise alcalina, baseando-se no método desenvolvido por Birnboim & Doly (1979). Após o crescimento das colônias por um período de 16 h, os microtubos contendo 1,5 mL de suspensão bacteriana foram submetidas à centrifugação (10.000 rpm) por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 μL de GTE (glicose 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e EDTA 10 mM pH 8,0) misturado com 2,5 μL de RNase (20 mg mL^{-1}). As células foram ressuspensas sob agitação por 1 min e, em seguida, deixadas em repouso durante 6 min. Para a lise celular foi adicionado 200 μL da solução de lise (NaOH 0,2 N e SDS 1%), os tubos foram homogeneizados e levados ao gelo por 8 min. Em seguida, foi adicionado 150 μL de KOAc agitado por alguns segundos e levado novamente ao gelo por mais 5 min. Os tubos foram submetidos a centrifugação (10.000 rpm) por 5 min e em seguida adicionado 800 μL de ETOH 100%, e deixado em repouso por 5 min. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL de ETOH 70% e levado a centrifugação por mais 2 min. Foi descartado o sobrenadante e o tubo com o pellet foi levado à câmara de fluxo para secar, e ressuspendido em água. Posteriormente os clones foram digeridos com enzimas de restrição *HindIII* e *SalI* (*CaEXPA1*) e *NotI* *SalI* (*CaEXPA2* e *CaEXPA3*), para liberação do fragmento. A digestão foi realizada a 37 °C por 1 h e o produto separado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo 1 mg mL^{-1} de brometo de etídeo.

Seqüenciamento dos clones

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 µL de DNA, 6pmol do oligonucleotídeo específico para cada clone e M13, senso ou anti-senso, 4 µL de “DYEnamic ET reagent premix” (contendo dNTP associados às substâncias fluorescentes e Thermo SequenaseTM II DNA polimerase) e água MilliQ 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 min, 50° C por 15 min e 60°C por 60 min.

Após a reação, adicionou-se às amostras 1 uL de acetato de amônio 7,5 M, 27,5 uL de etanol 100%, e a placa foi invertida e centrifugada 4000 rpm g por 45 min. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado lavado com 145 uL de etanol 70%. Centrifugou-se por mais 10 min à 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram colocadas em estufa a 37 °C durante 5 min para a completa evaporação do álcool. Para o seqüenciamento, as amostras foram ressuspensas em 10 uL de água MilliQ autoclavada. O seqüenciamento foi realizado em equipamento MegaBace 1000.

Dot Blot

Amostras de DNA referentes aos três clones foram quantificadas e aliqüotadas na concentração de 1µg. Em poços de placa de 96 amostras foram adicionados 50µL de NaOH 0.4M + EDTA 10mM e 1µg de DNA plasmidial referente a cada clone. Para desnaturação a placa permaneceu a 100 °C por 10 min, em seguida neutralizada adicionado-se 50 µL de acetato de amônio 2M pH 7,0 gelado. O volume total foi transferido para o aparelho de Dot Blot (Bio-Dot[®] -Bio-Rad). Os poços não utilizados foram preenchidos com 100 µL de água destilada e em seguida aplicado vácuo até completa filtração. Após isto, adicionou-se 500 µL de NaOH 0,4 M por poço e novamente foi aplicado vácuo até filtração completa. Posteriormente, o aparato de Dot blot foi desmontado, a membrana lavada com SSC 2X (3M NaCl, 0.3 mM Citrato de sódio) e deixada a 180 °C por 2 h para a fixação do DNA.

As membranas foram pré hibridizadas por 2 h com solução UltraHyb (Ambion) $\alpha_p 32$ e hibridizadas com sonda marcada com dCTP usando a técnica de oligonucleotídeos aleatórios (*random priming*), por 24 h a 37 °C. Após hibridização as 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%), seladas em plástico 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).

Southern Blot

A amostras de DNA ($10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) provenientes de *C. arabica*, *C. racemosa* foram digeridas com as enzimas *DraI* e *HindIII* e incubadas a 37 °C por 16 h. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% (p/v) e tampão SB 1X a 2 V/cm por 16 h. Após a eletroforese, o gel foi lavado com solução de depurinação (0,25 M HCl) por 15 min solução de desnaturação (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) 2 x por 30 min e solução de neutralização (Tris 0,5 M; NaCl 3 M) 2 x durante 30 min. Foi feita a transferência do DNA à membrana de náilon XL Hybond (Amersham Biosciences) por capilaridade em solução SSC 10X e fixado mediante incubação a 80 °C por 2 h. O protocolo para a marcação das sondas e hibridização das membranas foi o mesmo descrito no item 4.2.2.7

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 de expansinas em *Coffea*.

Northern Blot

Para determinar o padrão transcricional das diferentes isoformas de expansina em frutos de *Coffea*, nos diferentes estádios de maturação e em diferentes tecidos, foi utilizada a técnica de Northern Blot (ALWINE; KEMP; STARK, 1977). Após extração foram utilizados 15 μg de RNA total e adicionados 0,5 X volume de tampão de corrida (SIGMA – R4268). As amostras foram desnaturadas a 65 °C por 10 min, seguido de 10 min em gelo antes da aplicação no gel. As amostras foram separadas eletroforeticamente em gel desnaturante 1,4 % agarose contendo

22,5% de formaldeído e 12,5% de tampão MOPS 10X (1M MOPS, 2M Acetato de sódio, 0,5 M EDTA). Após a corrida o gel foi lavado com água MilliQ autoclavada por 10 min e com SSC 10X por 10 min em mesa agitadora. O RNA foi transferido do gel para membrana de náilon XL Hybond (Amersham Biosciences) por capilaridade em solução SSC 10X. Posteriormente, a membrana foi exposta a 80 °C por 2 h para a fixação do RNA. O protocolo para a marcação das sondas e hibridização das membranas foi o mesmo descrito no item 4.2.2.7. Após captura da imagem, as sondas foram retiradas com solução fervente de SDS 0,5% para a reutilização das membranas.

Resultados

Identificação *In silico* de Expansinas

A partir de buscas no banco de dados disponibilizado pelo Projeto Genoma Café foram encontrados 162 *reads* referentes à palavra-chave expansina.

Como erros de seqüenciamento, fusão de seqüências de genes conhecidos e/ou desconhecidos e retenção de íntrons podem ocorrer em bancos de dados de ESTs, um dado gene pode ser composto por diversos *contigs*. Assim, para eliminar *contigs* redundantes e reagrupar as seqüências em *contigs* representando genes de expansinas únicos, foram realizadas análises e clusterizações utilizando os programas Sequencher e BioEdit. Após estas análises iniciais foram formados 22 *contigs* (seqüências-consenso) e 14 *singletons*. Em seguida, foi iniciado o processo de saturação com o objetivo de obter o maior número de seqüências similares à expansinas, para tanto foram utilizadas outras ferramentas disponíveis no Projeto Genoma Café. A reclusterização das seqüências obtidas por saturação, juntamente com os *contigs* e *singletons* inicialmente obtidos, resultou na formação final de 22 *contigs* e 9 *singletons*, sendo estes últimos desprezados em função da baixa qualidade das seqüências.

Visando verificar se os *contigs* formados demonstravam similaridade com genes de expansinas de outros organismos, cada *contig* teve sua seqüência nucleotídica individualmente confrontada com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (BlastX). Dos 22 *contigs* 72,7% demonstraram identidade variando de 90% a 71% com expansinas, 22,7% demonstraram identidade de 75%

com *putative blight associated proteins* e 4,5% demonstraram identidade de 86% com *pollen allergen proteins*. Posteriormente, foram obtidas as seqüências deduzidas de aminoácidos (aa) de cada um dos *contigs* utilizando-se o programa ORF Finder.

Como mencionado anteriormente, a multifamília das expansinas são caracterizadas por possuírem peptídeo sinal (região N-terminal), e dois domínios distintos, um localizado na região N-terminal o outro na região C-terminal (COSGROVE, 2000). Considerando estas características da família das expansinas, as seqüências de aa foram analisadas nos programas SignalP (predição de peptídeo sinal) e ScanProsite (localização de domínios), sendo observado que dos 22 *contigs* somente 11 puderam ser classificados como expansinas por atender os requisitos estabelecidos para esta classe de proteínas. Estas seqüências possuem os dois domínios, um homólogo ao domínio catalítico da família 45 de hidrolases glicosídicas (GH45) (primeiro domínio) e o outro homólogo ao grupo 2 de alergênicos de pólen de gramíneas (segundo domínio), cuja função ainda é desconhecida (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). O tamanho da região de peptídeo sinal dos 11 *contigs* variou de 31 a 18 aa, sendo uma região pouco conservada entre as isoformas. Através de alinhamento (ClustalW) foi verificado alto grau de conservação para o domínio catalítico com 65% de identidade; já para o domínio de ligação para polissacarídeos foi encontrada identidade de 51%. Foi observado também que das outras 11 seqüências que não puderam ser caracterizadas como expansinas 9,0% possuíam somente o peptídeo sinal e 27,7% não possuíam peptídeo sinal e nenhum dos domínios característicos. No entanto 54,5% das seqüências não possuíam somente o segundo domínio e 9,0% não possuíam apenas o primeiro domínio.

Kende *et al.* (2004) sugerem que a caracterização das expansinas quanto à família e, conseqüentemente, a nomenclatura, seja obtida mediante construção de árvores filogenéticas utilizando as seqüências de α -EXP, β -EXP, EXLA e EXLB disponíveis em www.bio.psu.edu/expansins/naming. Deste modo, as seqüências de aminoácidos dessas 11 isoformas foram analisadas no programa Mega 3.1 juntamente com seqüências de *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa*, *Lycopersicum esculentum*, *Medicago truncatula* e *Lactuca sativa*. Como pode ser observado na figura 5, as 11 isoformas de expansinas de *C. arabica* foram agrupadas em três grandes clusters, sendo nove classificadas como α -EXP, uma como EXLA e uma como EXLB.

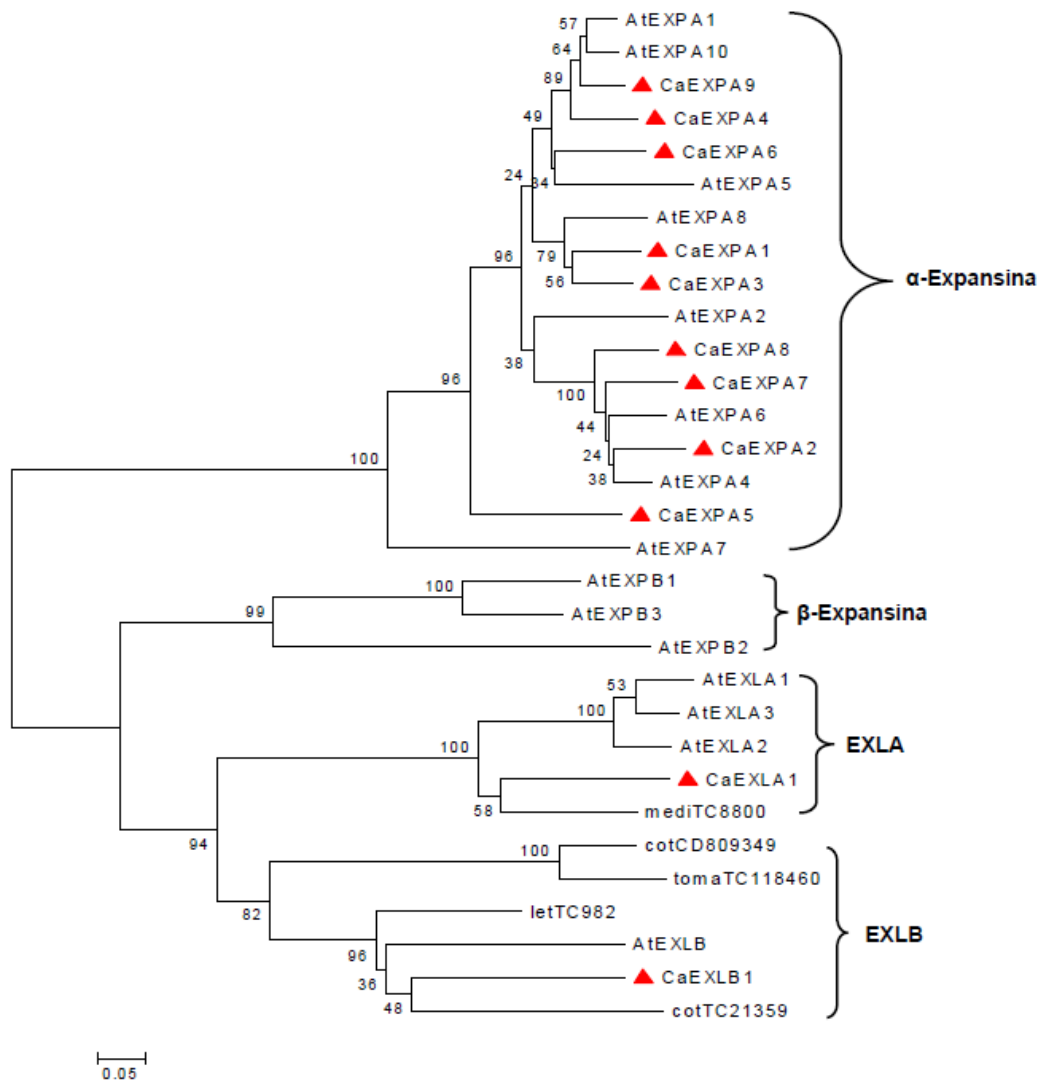


Figura 5 – Análise filogenética das isoformas de expansinas presentes no Genoma Café (triângulo vermelho) e de *Arabidopsis thaliana* (At), *Medicago trunculata* (medi), *Gossypium hirsutum* (cot), *Lycopersicon esculentum* (toma) e *Lactuca sativa* (let) disponíveis em <http://www.bio.psu.edu/EXPansins/>. As seqüências protéicas completas foram alinhadas através do CLUSTAL-W e a árvore filogenética foi construída usando o programa Mega 3.1. Foram utilizadas seqüências das quatro famílias de expansinas (α -expansina, β -expansina, expansina-like A e expansina –like B).

Para verificar a similaridade entre os 11 *contigs* de *C. arabica* foi construída árvore filogenética através do programa Mega 3.1 (Figura 6). É possível verificar que os dois *contigs* referentes às *expansina-like* (CaEXLA e CaEXLB) encontram-se em ramos filogenéticos distintos das α -expansinas. Isto se deve a presença de motivos e inserções específicas que só ocorrem nestas classes de expansinas. Também foi possível observar a formação de quatro subgrupos entre as α -expansinas.

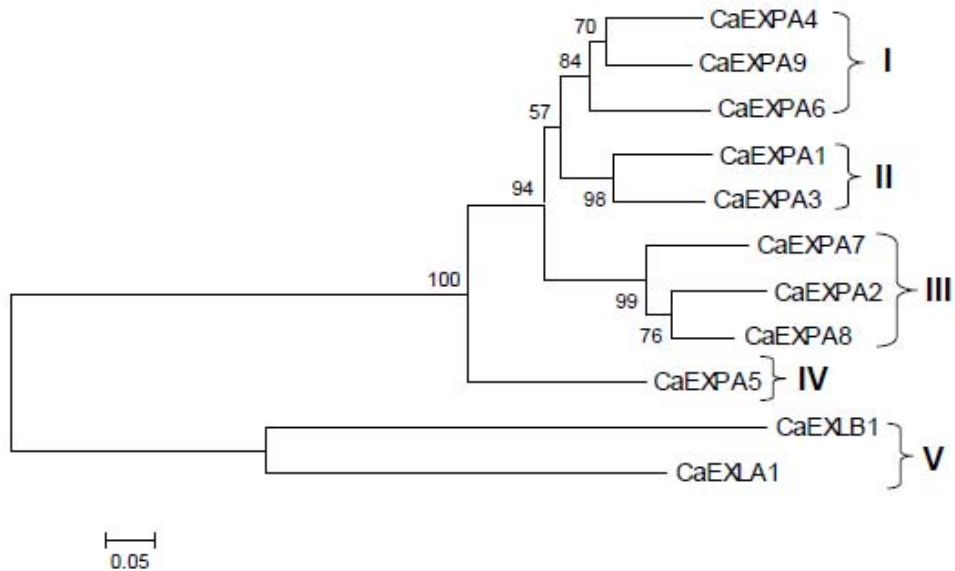


Figura 6 – Análise filogenética de 11 isoformas de expansinas selecionadas no banco de dados do projeto Genoma Café. As sequências foram alinhadas no CLUSTAL-W e a árvore filogenética foi construída usando o programa Mega versão 3.1.

Foi feita comparação entre os 11 *contigs* de α -expansinas para verificar quais possuíam maior número de seqüências provenientes de bibliotecas de frutos. Verificou-se que três *contigs* possuíam maior número de ESTs provenientes de bibliotecas de frutos e botão floral (Tabela 2). Deste modo, estes três *contigs*, denominados a seguir como isoformas *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*, foram consideradas de maior interesse e selecionados para análises moleculares mais detalhadas.

Tabela 2 – Isoformas de α -expansinas de *C. arabica* selecionadas por possuírem ESTs provenientes de bibliotecas de frutos. Tamanho dos *contigs*, bibliotecas que compõem cada *contig* e o número de ESTs nas bibliotecas.

Expansinas	cDNA pb	Proteína aa	Número de ESTs por biblioteca					Total ESTs
			Fruto e Flor	Folha	Células em Suspensão	Botão Floral	Calo	
<i>CaEXPA1</i>	1269	257	4	5	13	1	2	28
<i>CaEXPA2</i>	1281	258	1	X	1	4	3	11
<i>CaEXPA3</i>	1579	254	2	4	X	1	1	8

Caracterização *In silico* de três isoformas de α -expansinas

O cDNA de *CaEXPA1* (1269 pb) representa a proteína completa desta isoforma (Anexo1). A seqüência deduzida de aminoácido (257 aa) possui alta homologia (55-85% de identidade) com seqüências de expansinas de outros organismos listados no banco de dados NCBI. Quando realizado BlastX, esta isoforma apresenta ótimo alinhamento com seqüências de α -expansinas provenientes de *Populus tremula x Populus tremuloides*, *Cicer arietinum*, *Zinnia elegans*, *Prunus armeniaca* e *Lycopersicon esculentum*, com identidades entre 72% e 79%.

A isoforma *CaEXP2* (1281 pb) também apresenta a ORF completa e sua seqüência deduzida de aminoácido (258 aa) mostra alta homologia (86% a 57% de identidade) com outros membros das expansinas depositadas do banco de dados do NCBI (Anexo 2). *CaEXPA2* demonstra bom alinhamento (BlastX) com seqüências de α -expansinas de *Mangifera indica*, *Petunia x hybrida*, *Populus tremula x Populus tremuloides* e *Prunus cerasus* com identidade entre 83% e 86%.

A isoforma *CaEXP3* (1579 pb) codifica para proteína com 254 aa. Sua seqüência está completa e demonstra alta homologia (86 a 78% de identidade) com seqüências de expansinas presentes no NCBI (Anexo 3). Para esta isoforma foi encontrado no BlastX ótimo alinhamento com α -expansinas de *Prunus armeniaca*, *Populus tremula x Populus tremuloides*, *Petunia x hybrida* e *Prunus cerasus*, com identidade entre 73% e 76%.

Foi verificado alto grau de similaridade (Tabela 3) entre as três α -expansinas selecionadas (68% a 89% identidade), sendo que essa similaridade normalmente deve-se ao alto grau de conservação do primeiro domínio (CHOI *et al.*, 2006).

Tabela 3 – Análise do grau de similaridade entre três α -expansinas selecionadas.

	<i>CaEXPA1</i>		<i>CaEXPA2</i>		<i>CaEXPA3</i>	
	I*	P	I	P	I	P
<i>CaEXPA1</i>	----	----	68%	82%	75%	89%
<i>CaEXPA2</i>	68%	82%	----	----	70%	81%
<i>CaEXPA3</i>	75%	89%	70%	81%	----	----

*I: grau de identidade (aas iguais) e P: grau de positividade (aas com as mesmas propriedades físico-químicas).

As isoformas *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3* possuem resíduos conservados já descritos para as expansinas (SCHERBAN *et al.*, 1995; CHOI *et al.*, 2006), como os resíduos de cisteína (Cys) na região N-terminal do domínio catalítico, um motivo HFD (histidina, fenilalanina e aspartato) na região central da proteína e resíduos conservados de triptofano (Trp) na região C-terminal do domínio de ligação para polissacarídeos (Figura 7 e Anexo I).

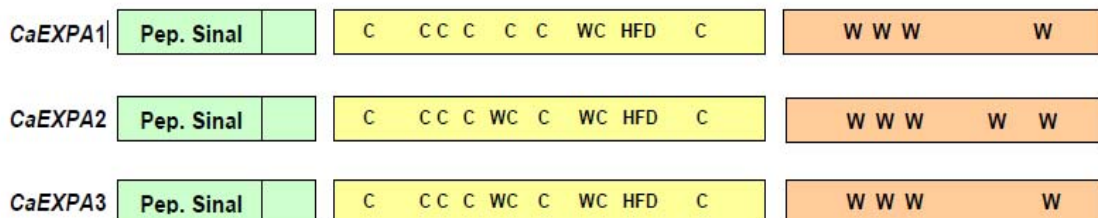


Figura 7 – Estrutura esquemática dos *contigs* selecionados, indicando a presença de resíduos conservados, cisteína (C), His-Phe-Asp (HFD) e triptofano (W). Em verde a região do peptídeo sinal, em amarelo a região do domínio catalítico e em laranja o domínio de ligação para polissacarídeo.

As três isoformas selecionadas no banco de dados do projeto Genoma Café foram clusterizadas com oito *contigs* de expansinas provenientes do banco HarvEST Coffea. A plataforma HarvEST fornece informações sobre os tecidos e estádios de desenvolvimento dos frutos onde os genes são transcritos, sendo possível inferir a provável expressão temporal dos genes. Após a clusterização foi verificado que somente as isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA2* possuem similaridade com os *contigs* deste banco de dados. *CaEXPA1* demonstrou similaridade com o *contig* 1017, formado por 11 seqüências de diferentes bibliotecas, folha jovem, pericarpo (todas as fases), perisperma e endosperma entre 42 e 46 dias após a polinização (DAP). *CaEXPA2* possui similaridade com o *contig* 3351, formado por oito seqüências proveniente de bibliotecas de pericarpo (todas as fases), perisperma e endosperma entre 42 e 46 DAP. Com base nas análises do banco HarvEST Coffea, foi possível inferir a provável expressão temporal das isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA2* (Figura 8).

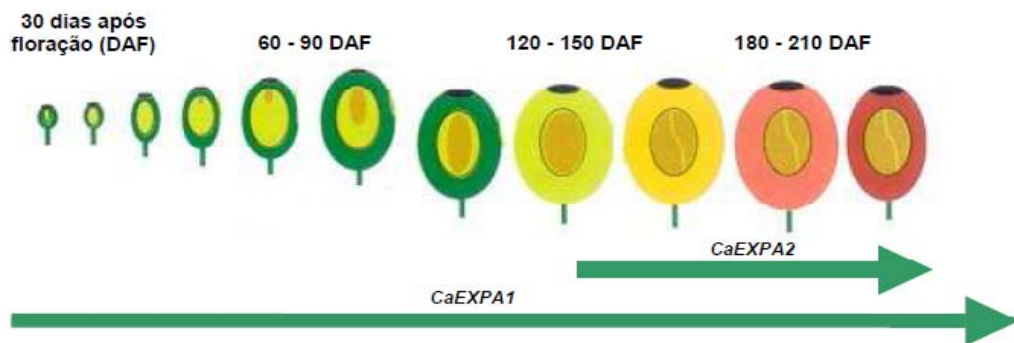


Figura 8 – Estádios do desenvolvimento do fruto de café com provável expressão *in silico* de genes EXPA. Adaptado de (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

Análises moleculares de três isoformas de α -expansinas

Os iniciadores utilizados para obtenção de sondas de hibridização para as três isoformas foram desenhados utilizando o software Primer Designer baseado nas regiões de menor similaridade entre as ORFs. No entanto, tendo em vista o alto grau de conservação entre os genes da família α -expansinas, foi realizado experimento de Dot-blot (Figura 9) para confirmar a especificidade das sondas obtidas a partir do produto de PCR. *CaEXPA1* (Figura 9 A), *CaEXPA2*

(Figura 9 B) e *CaEXPA3* (Figura 9 C) demonstraram ser específicas, não ocorrendo hibridização cruzada entre as três isoformas e com o controle negativo (cDNA diferente da seqüência de expansina ligado ao mesmo vetor utilizado para clonar as três isoformas).

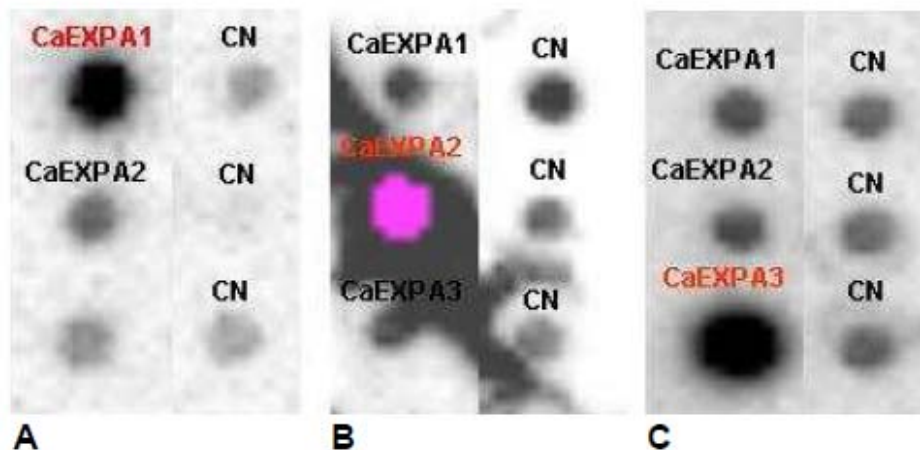


Figura 9 – Dot blot realizado para confirmar a especificidade das sondas. A – sonda com hibridização específica para *CaEXPA1*, B – sonda hibridização específica para *CaEXPA2* e C – sonda com hibridização específica para *CaEXPA3*. CN refere-se ao controle negativo.

Southern Blot

A determinação do número de cópias das três isoformas de α -expansinas foi realizada através de Southern Blot, com membrana contendo DNAs de *C. arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo e de *C. racemosa* digeridos com as enzimas de restrição *DraI* e *HindIII*.

Através do programa Ncbutter, verificou-se que o cDNA de *CaEXPA1* não possui sítio de restrição para a enzima *DraI* e apresenta dois sítios de corte para *HindIII* (Anexo II). O primeiro sítio de corte para *HindIII* (887 pb) encontra-se dentro da região de homologia à sonda, o que não ocorre para o segundo sítio (1187 pb). A hibridização com a sonda de *CaEXP1* apresentou dois sinais de hibridação intensos com aproximadamente 4360 pb e 4310 pb tanto para *C. arabica* cv. IAPAR-59 como para o cv. IAPAR-59 Graúdo, quando digeridos com *DraI* (Figura 10). Para a digestão com *HindIII* estes dois genótipos também apresentam duas

bandas idênticas entre si, em torno de 6320 pb e 6550 pb (Figura 10). Em *C. racemosa* a digestão com *DraI* resultou na identificação de duas bandas, em torno de 4360 pb e 4310 pb. Para a digestão com *HindIII* foram identificadas duas única bandas com aproximadamente 6320 pb.

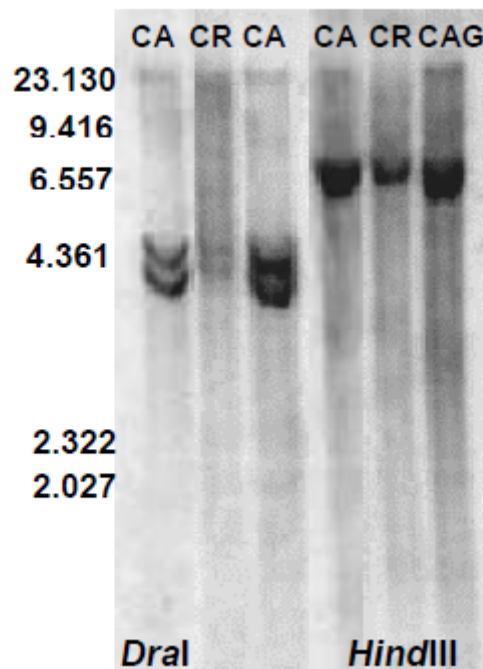


Figura 10 – Análise por Southern Blot de DNA genômico de *C. arabica* cv. IAPAR-59 (CA), *C. arabica* cv. IAPAR-59 Graúdo (CAG) e *C. racemosa* (CR) digerido com *DraI* e *HindIII*. Membrana hibridizada com a sonda de *CaEXPA1*.

Para *CaEXPA2*, não foram encontrados sítios de clivagem tanto para *DraI* quanto para *HindIII* na seqüência do cDNA (Anexo III). Em *C. arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo foram observadas duas bandas intensas com aproximadamente 2322 pb e 2430 pb quando utilizada a enzima *DraI*. Em *C. racemosa*, para digestão com *DraI* foi visualizada uma banda com aproximadamente 500 pb (Figura 11). Resultados similares em termos de número de fragmentos foram obtidos empregando a enzima *HindIII*, resultando na visualização de duas bandas com aproximadamente 1600 pb e 1020 pb em *C. arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo. Em *C. racemosa* foi identificada somente uma banda com cerca de 3290 pb (Figura 11).

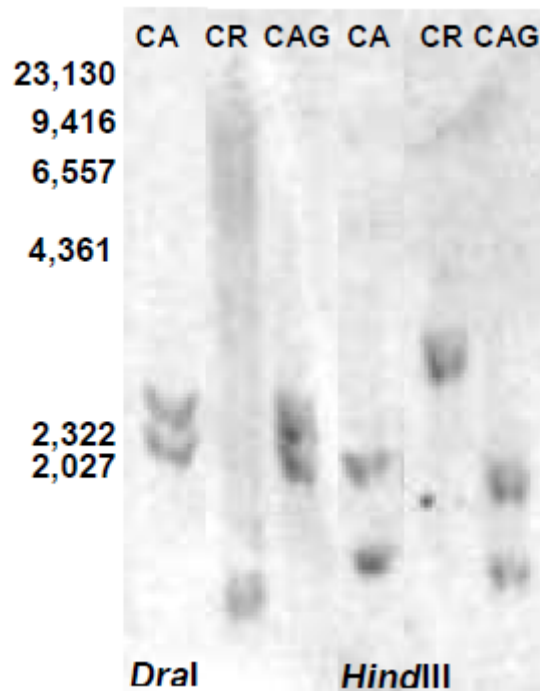


Figura 11 – Análise por Southern Blot do DNA genômico de *C. arabica* cv. IAPAR-59 (CA), *C. racemosa* (CR) e *C. arabica* cv. IAPAR-59 Graúdo (CAG) digerido com *DraI* e *HindIII*. Membrana hibridizada com a sonda de *CaEXPA2*.

A seqüência de cDNA de *CaEXPA3* também não possui sítios de clivagem para *DraI* e *HindIII* na seqüência do cDNA (Anexo IV). A hibridização do DNA digerido com a enzima *DraI* com a sonda específica para a isoforma *CaEXP3* apresentou três bandas com padrão similar em *C. arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo. Em *C. racemosa*, digerido com *DraI* foi visualizado uma banda com cerca de 680 pb (Figura 12). No entanto, a digestão de *C. arabica* cv. IAPAR-59 com *HindIII* apresentou duas bandas intensas com cerca de 17000 pb e 8500 pb (Figura 12) enquanto que no cv. IAPAR-59 Graúdo também foram visualizadas duas bandas, mas neste caso com padrão de digestão diferente, apresentando bandas em torno de 17000 pb e 14000 pb. Em *C. racemosa* foi identificada uma banda com aproximadamente 9000 pb, resultante da digestão com *HindIII*.

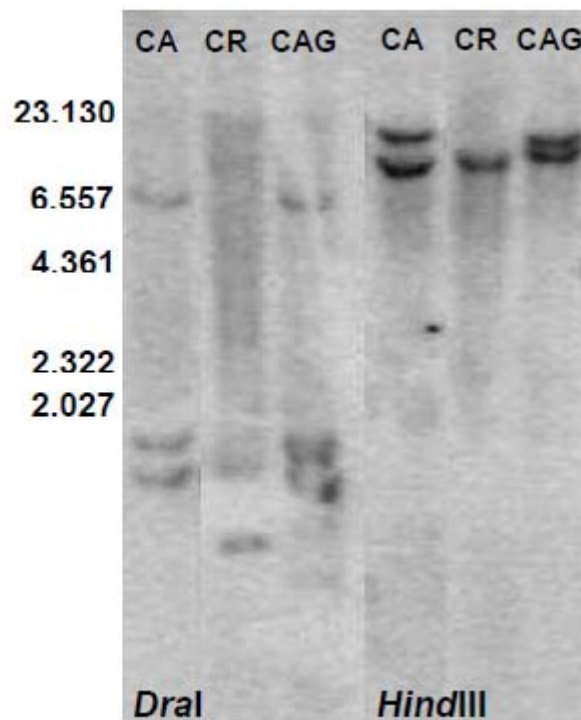


Figura 12 – Análise por Southern Blot do DNA genômico de *C. arabica* cv. IAPAR-59 (CA), *C. racemosa* (CR) e *C. arabica* cv. IAPAR-59 Graúdo (CAG) digerido com *Dral* e *HindIII*. Membrana hibridizada com a sonda de *CaEXPA3*.

Northern Blot de diferentes tecidos de *C. arabica* com as isoformas *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*

Northern blots de diferentes tecidos de *C. arabica* cv. IAPAR-59 mostraram que a maior atividade transcricional das isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA3* foi em botão floral, tecido que possui alta taxa de divisão celular (Figura 13A e C). *CaEXPA1* também apresentou sinais de hibridação em raiz e, em menor grau, em ramo jovem (Figura 13A). Para a isoforma *CaEXPA2* foi observado sinais de hibridação em raiz, ramo jovem e ramo maduro (Figura 12B), sendo estes últimos tecidos os que apresentaram maior transcrição desta isoforma. A presença de transcritos de expansinas em outros tecidos que não os de frutos é reportada por diversos autores (LINK; COSGROVE, 1998; HASENSTEIN; ZHANG, 2000; CHO; COSGROVE, 2002; PIEN *et al.*, 2001; SZAREJKO; KWASNIEWSKI, 2006; MULLER *et al.*, 2007).

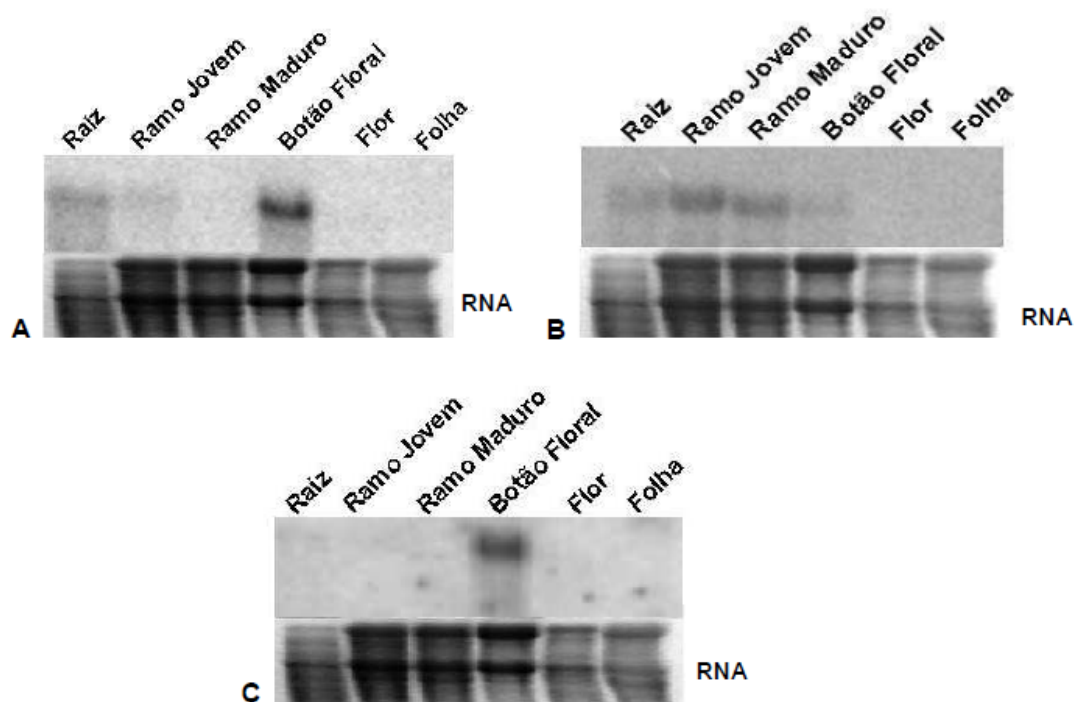


Figura 13 – Membrana de Northern blot contendo RNA total de raiz, ramo jovem, ramo maduro, botão floral, flor e folha de *C. arabica* cv. IAPAR-59. A - Hibridização com sonda de *CaEXPA1*. B - Hibridização com sonda de *CaEXPA2* e C - Hibridização com sonda de *CaEXPA3*. RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras.

Northern Blot em *Coffea* - *CaEXPA1*

Para verificar diferenças temporais e espaciais na transcrição de *CaEXPA1* em frutos de *C. arabica*, sonda desta isoforma foi usada para hibridizar membranas de Northern blot contendo RNA total de fruto inteiro e de diferentes tecidos do fruto (pericarpo, perisperma e endosperma) do cv. IAPAR-59 e do cv. IAPAR-59 Graúdo. Inicialmente foi realizada hibridização em membrana contendo RNA de fruto inteiro nas diferentes fases de desenvolvimento e maturação (Figura 14). Para o cultivar IAPAR-59 foram observados transcritos no início do desenvolvimento e durante o final da maturação, com maior transcrição em novembro (60 DAF), abril (estádios de maturação vermelho e cereja, ambos 210 DAF) (Figura 14). No IAPAR-59 Graúdo foi identificada transcrição de *CaEXPA1* no início do desenvolvimento do fruto, meses de outubro (30 DAF), novembro (60 DAF), mas com maior número de transcritos em dezembro (90 DAF) em relação ao primeiro cultivar. Foi identificada também alta atividade transcrricional durante a

maturação do fruto, meses de março (estádios avermelhado e vermelho, ambos 180 DAF) com queda no mês abril (cereja, 210 DAF).

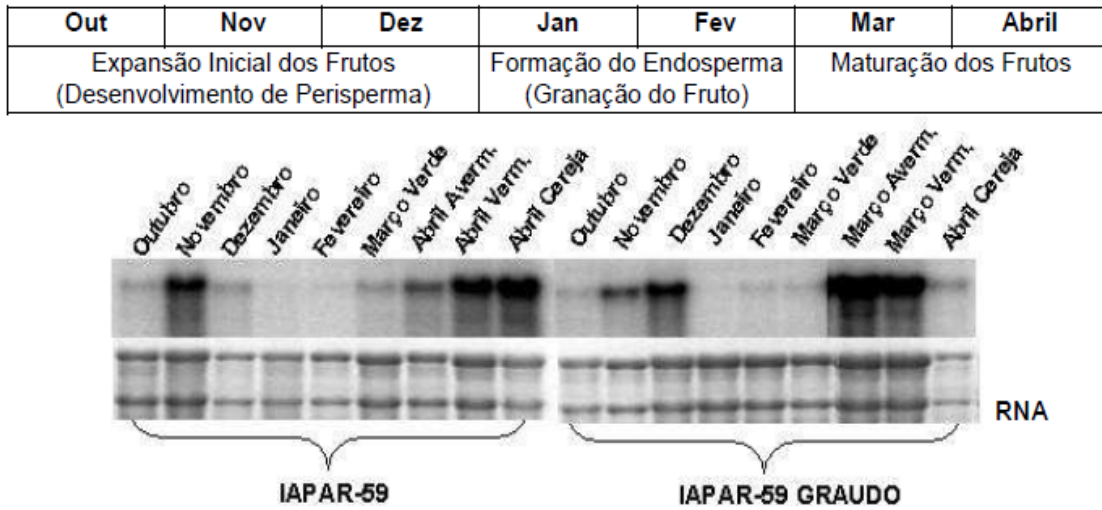


Figura 14 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do fruto inteiro de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda de *CaEXPA1*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde - avermelhado -vermelho, todos 180 DAF) e Abril (avermelhado -vermelho e cereja, 210 DAF). RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras.

Para verificar a contribuição de diferentes tecidos dos frutos na atividade transcricional da isoforma *CaEXPA1*, frutos foram dissecados e RNA total de pericarpo e perisperma foram extraídos individualmente para os Northern blots. Para IAPAR-59, a partir do mês de dezembro (90 DAF) já foi observado atividade transcricional, embora em menor escala do que o detectado no mês de dezembro (90 DAF) e abril (estádios cana, avermelhado, vermelho e cereja, 210 DAF) (Figura 15). Em pericarpo de IAPAR-59 Graúdo foi encontrado alto número de transcritos já em dezembro (90 DAF, final do período de rápida expansão do fruto), também em março (estádios verde e cana, ambos 180 DAF) e abril cereja (210 DAF, final da maturação) (Figura 15).

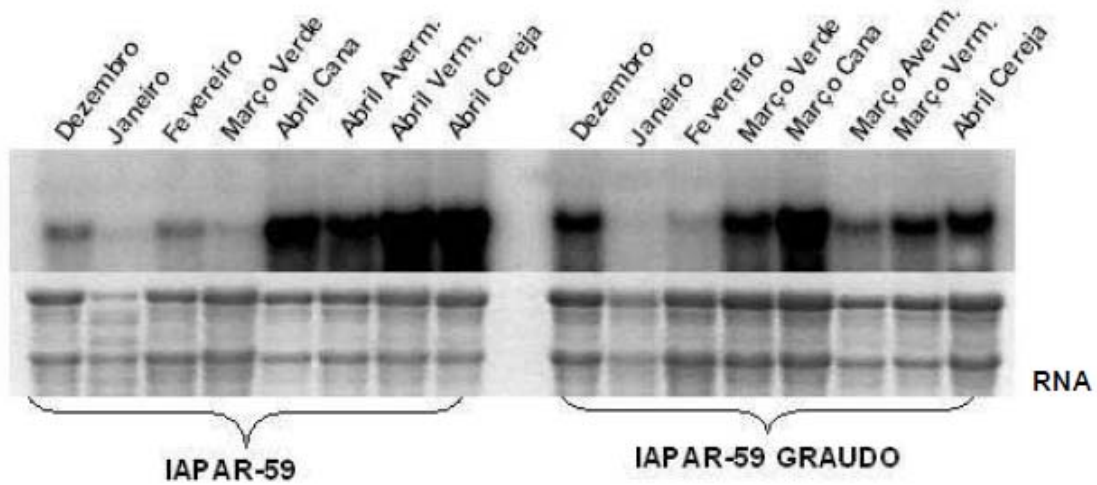


Figura 15 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do pericarpo de frutos de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda de *CaEXPA1*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde -cana – avermelhado – vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (cereja – 210). RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras.

Em perisperma foi observada maior transcrição em dezembro (90 DAF) tanto para IAPAR-59 quanto para o cultivar IAPAR-59 Graúdo (Figura 16). Nesta fase do desenvolvimento o perisperma está em processo de divisão celular, expandindo-se e delimitando o local que será posteriormente ocupado pelo endosperma. A presença de transcritos de expansinas neste tecido confirma a relação deste gene com o processo de divisão celular e evidencia a participação desta isoforma com a formação do grão. A maior expressão de *CaEXPA1* no IAPAR-59 Graúdo em comparação ao IAPAR-59 aos 90 DAF, estágio em que ocorre maior crescimento e alongamento do perisperma, indica a participação da isoforma *CaEXPA1* na modulação do tamanho final do grão no IAPAR-59 Graúdo.

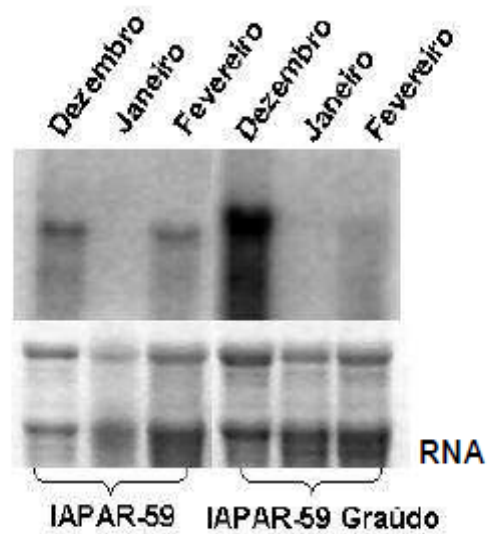


Figura 16 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do perisperma de *C. arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento, hibridizada com sonda de *CaEXPA1*. Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF) e Março (180 DAF). RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras.

Northern Blot em *Coffea arabica* -*CaEXPA2*

A hibridização de sondas de *CaEXPA2* com membrana contendo RNA total de fruto inteiro proveniente de IAPAR-59 e do IAPAR-59 Graúdo mostrou que esta isoforma tem expressão específica nas fases finais da maturação (Figura 17). O mesmo perfil temporal de expressão foi encontrado na hibridização com RNA total extraído de diferentes tecidos do fruto. No entanto, foi verificada a ausência de transcritos em todos os estádios de desenvolvimento do perisperma analisados (dados não mostrados) e somente a presença de transcritos em pericarpo (Figura 18). Da mesma forma que observado para *CaEXPA1* estes resultados indicam que está isoforma também atua durante a fase final da maturação dos frutos, porém de forma específica.

Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abril
Expansão Inicial dos Frutos (Desenvolvimento de Perisperma)			Formação do Endosperma (Granação do Fruto)		Maturação dos Frutos	

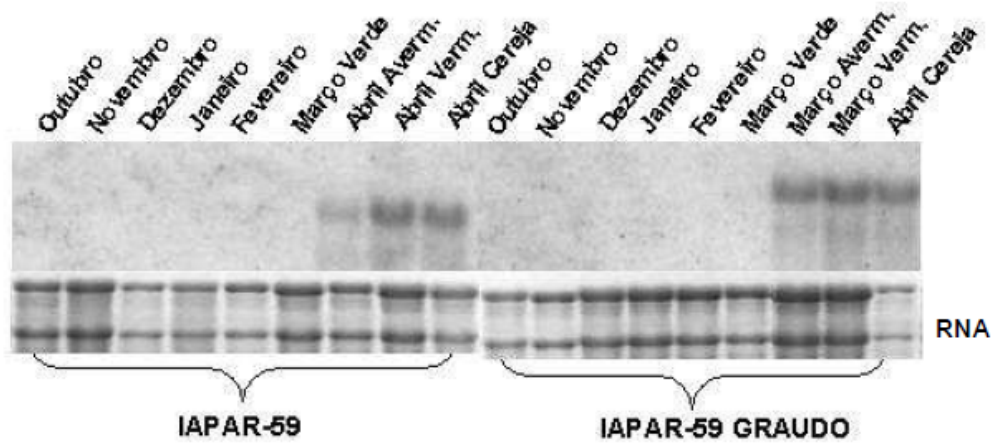


Figura 17 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do fruto inteiro de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda *CaEXPA2*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde - avermelhado -vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (avermelhado -vermelho e cereja, 210 DAF). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot.

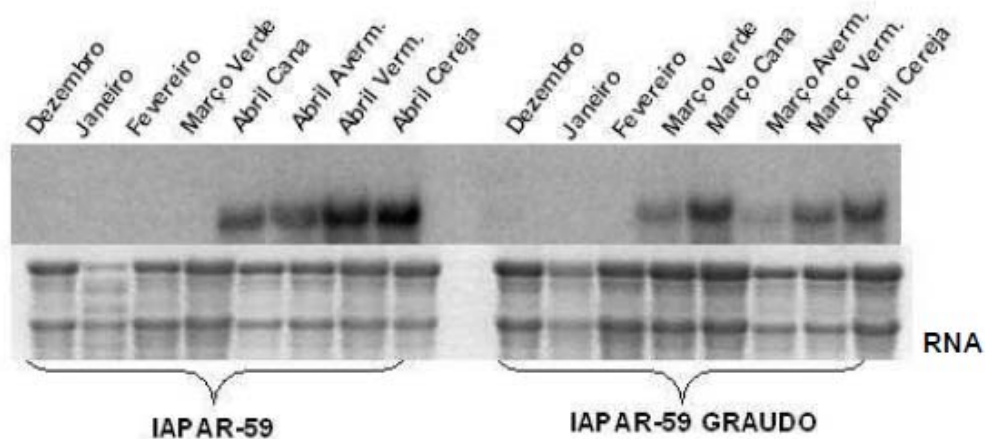


Figura 18 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do pericarpo de *C. arabica* IAPAR 59 e *C. arabica* IAPAR 59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda *CaEXPA2*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde -cana – avermelhado – vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (cereja – 210). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot.

Northern Blot em *Coffea arabica* -CaEXPA3

A partir da hibridização de *CaEXPA3* com membrana contendo RNA total de fruto inteiro (Figura 19) foi possível observar para o cultivar IAPAR-59 baixo número de transcritos em outubro, aumentando o padrão de transcrição em novembro (60 DAF) com decréscimo a partir de dezembro (90 DAF). Também foi detectada alta atividade transcricional no final da maturação (180 e 210 DAF) (Figura 19). Resultado semelhante foi encontrado para o IAPAR-59 Graúdo; no entanto, o maior número de transcritos foi encontrado em novembro (90 DAF) e dezembro (120 DAF).

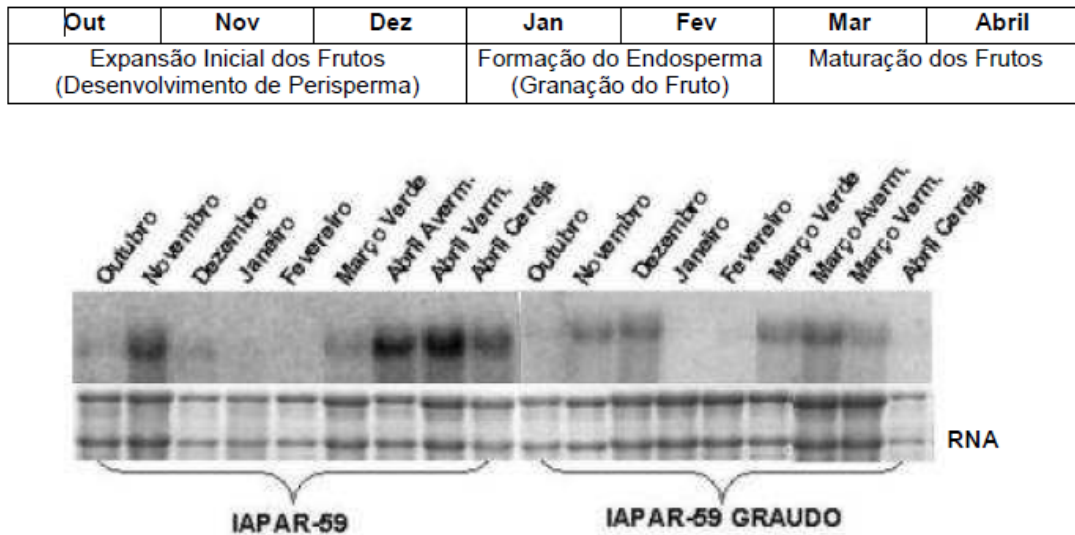


Figura 19 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do fruto inteiro de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda *CaEXPA3*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde – avermelhado – vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (avermelhado – vermelho e cereja, 210 DAF). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot.

A membrana com RNA extraído de pericarpo (Figura 20) confirmou o padrão de transcrição encontrado em fruto inteiro. Já em perisperma (Figura 21) foram encontrados transcritos somente em dezembro (90 DAF), sendo maior o acúmulo deste transcrito no genótipo IAPAR-59 Graúdo quando comparado com o IAPAR-59. Da mesma forma como observado nas outras duas isoformas, não foram

detectados sinais de hibridização de CaEXPA3 em endosperma (dados não apresentados).

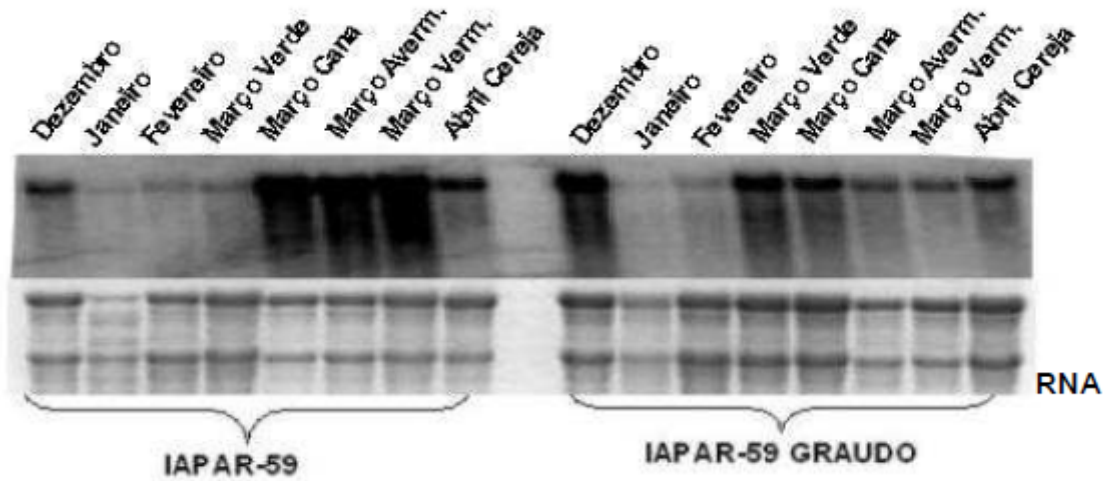


Figura 20 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do pericarpo de *C. arabica* IAPAR-59 e do *C. arabica* IAPAR-59 Graúdo em diferentes fases de desenvolvimento e maturação. Membrana hibridizada com sonda *CaEXPA3*. As amostras foram coletadas a cada 30 dias a partir do florescimento (DAF): Outubro (30 DAF), Novembro (60 DAF), Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF), Fevereiro (150 DAF), Março (verde - cana – avermelhado – vermelho, ambos 180 DAF) e Abril (cereja – 210). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot.

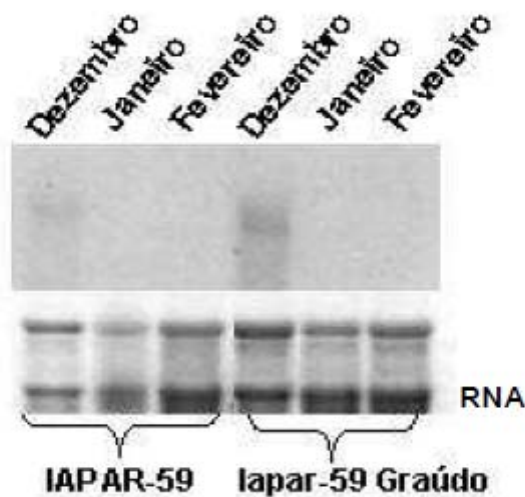


Figura 21 – Membrana de Northern blot contendo RNA total extraído do perisperma de *C. arabica* IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo, em diferentes fases de desenvolvimento. Membrana hibridizada com sonda de *CaEXPA3*. Dezembro (90 DAF), Janeiro (120 DAF) e Fevereiro (150 DAF). RNA total refere-se ao gel desnaturante de Northern blot.

Northern Blot em *Coffea racemosa*

As isoformas *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3* foram hibridizadas com membranas contendo RNA total de *C. racemosa*. Esta espécie é caracterizada pelo rápido desenvolvimento e maturação dos frutos (em torno de 60 a 90 dias após a antese) e alta relação pericarpo/endosperma. Após hibridização com a sonda de *CaEXPA1* foram observados transcritos em todas as fases do fruto inteiro (Figura 22A), com maior intensidade no final da maturação. A análise da atividade transcricional em diferentes tecidos do fruto mostrou que a isoforma *CaEXPA1* é somente expressa em pericarpo (Figura 22B).

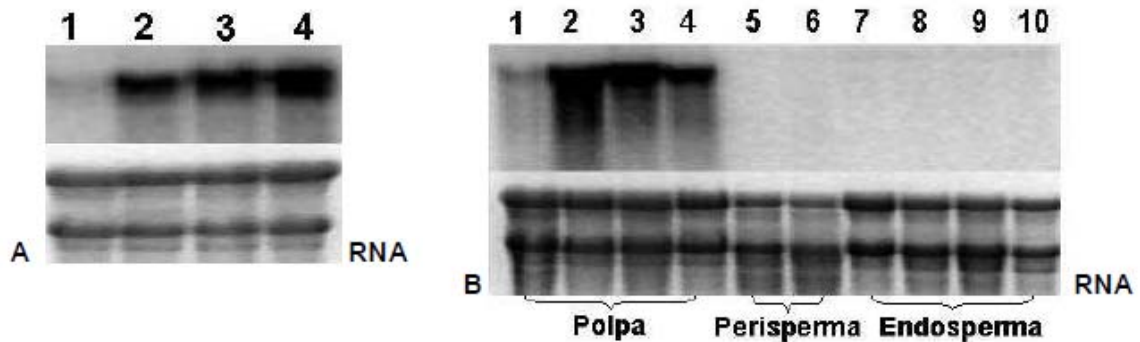


Figura 22 – Membrana de Northern blot com RNA total de *C. racemosa*, hibridizada com sonda de *CaEXPA1*. Em (A): fruto inteiro e (B): diferentes tecidos do fruto. Coluna 1 - fruto 15 DAF, 2 - fruto 30 DAF, 3 - fruto 45 DAF, 4 - fruto 60 DAF, 5 - perisperma 45 DAF, 6 - perisperma 60 DAF, 7 - endosperma 15 DAF, 8 - endosperma 30 DAF, 9 - endosperma 45 DAF e 10 - endosperma 60 DAF. RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras.

Para a *CaEXPA2* foram observados transcritos em fruto inteiro a partir de 30 DAF (Figura 23A). Da mesma forma que observado nos dois cultivares de *C. arabica*, a expressão desta isoforma é devida somente à sua atividade transcricional na pericarpo do fruto, pois sinais de hibridação foram observados somente neste tecido (Figura 23B).

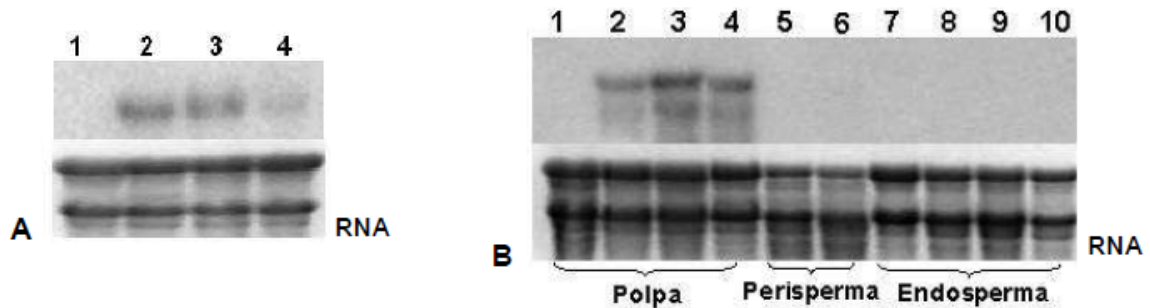


Figura 23 – Membrana de Northern blot com RNA total de *C. racemosa* hibridizada com sonda de *CaEXPA2*. Em (A): fruto inteiro e (B): diferentes tecidos do fruto. Coluna 1 - fruto 15 DAF, 2 - fruto 30 DAF, 3 - fruto 45 DAF, 4 - fruto 60 DAF, 5 - perisperma 45 DAF, 6 - perisperma 60 DAF, 7 - endosperma 15 DAF, 8 - endosperma 30 DAF, 9 - endosperma 45 DAF e 10 - endosperma 60 DAF. RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras.

E a hibridização de membranas contendo RNA total de *C. racemosa* com a sonda de *CaEXPA3* resultou na observação de transcritos em fruto inteiro a partir de 30 DAF (Figura 24A), padrão temporal de transcrição similar ao observado para a isoforma *CaEXPA2*. Entretanto, comparativamente às outras duas isoformas, foi observado baixo número de transcritos de *CaEXPA3* em pericarpo, também a partir de 30 DAF (Figura 24B).

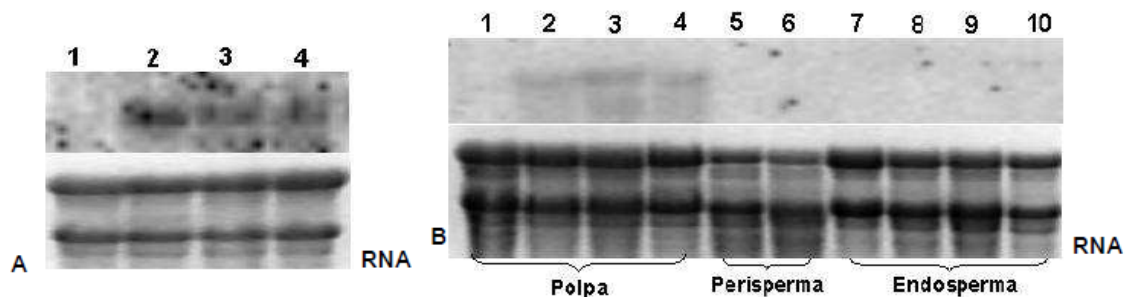


Figura 24 – Membrana de northern blot com RNA total de *C. racemosa* hibridizada com sonda de *CaEXAP3*. Em (A) fruto inteiro e (B) diferentes tecidos do fruto. Coluna 1 - fruto 15 DAF, 2 - fruto 30 DAF, 3 - fruto 45 DAF, 4 - fruto 60 DAF, 5 - perisperma 45 DAF, 6 - perisperma 60 DAF, 7 - endosperma 15 DAF, 8 - endosperma 30 DAF, 9 - endosperma 45 DAF e 10 - endosperma 60 DAF. RNA total refere-se ao gel de Northern para comparação da concentração das amostras.

Como pode ser visto nas Figuras 22, 23 e 24, o padrão transcricional espacial e temporal das três isoformas em *C. racemosa* foi similar tanto em fruto inteiro quanto nos diferentes tecidos do fruto. Ficou evidenciada que nesta espécie de cafeeiro a transcrição das α -expansinas analisadas é tecido específica, ocorrendo somente no pericarpo. Isto provavelmente ocorre devido à porcentagem de massa fresca do pericarpo no final do desenvolvimento do fruto, que é quase oito vezes maior que a do endosperma, diferentemente de *C. arabica* que possui uma relação menor entre esses tecidos (GEROMEL, 2006).

Discussão

Análises In silico

As expansinas são proteínas que promovem o relaxamento e expansão da parede celular, sendo codificadas por uma família multigênica organizada em quatro subfamílias (CHOI *et al.*, 2006). Altos níveis de transcritos de expansinas foram detectados em muitos tecidos em crescimento, incluindo hipocótilo (SCHERBAN *et al.*, 1995; CADERAS *et al.*, 2000), raiz (ZHANG; HASENSTEIN, 2000), folha (REINHARDT *et al.*, 1998) e frutos jovens (CHEN; BRADFORD, 2001). A expressão de expansinas também foi detectada durante as etapas finais de maturação de frutos, fases em que não ocorre a expansão celular, sugerindo uma relação entre a atuação dessas proteínas com a dissociação da parede celular e a maciez dos frutos (ISHIMARU *et al.*, 2006). A relação das α -expansinas com o desenvolvimento e maturação das plantas já foi demonstrada por inúmeros estudos e, diferentes isoformas já foram caracterizadas em diversas plantas como: pepino (SCHERBAN *et al.*, 1995), tabaco (LINK; COSGROVE, 1998), tomate (ROSE *et al.*, 1997; BRUMMELL *et al.*, 1999; REINHARDT *et al.*, 1998), morango (CIVELLO *et al.*, 1999; HARRISON *et al.*, 2001), *Arabidopsis thaliana* (WHITNEY *et al.*, 2000), pêssego (HAYAMA *et al.*, 2000), arroz (LEE; KENDE, 2002), milho (ZHANG; HASENSTEIN, 2000; CHAO *et al.*, 2003), soja (LEE *et al.*, 2003), pêra (HIWASA *et al.*, 2003), manga (VIDHU *et al.*, 2005), trigo (LIN *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007) *Rumex palustris* (COLMER *et al.*, 2005), uva (ISHIMARU *et al.*, 2006), banana (VIDHU *et al.*, 2007), *Physcomitrella patens* (CAREY; COSGROVE, 2007).

A busca por expansinas no banco de ESTs do Projeto Genoma Café pela ferramenta *keyword search* permitiu inicialmente a identificação de 44 *contigs* e 35 *singletons*. Após as clusterizações e análises mais refinadas, utilizando diferentes programas de bioinformática, foram identificados somente 11 isoformas de expansinas (nove α -expansinas, uma expansina-like A e uma expansina-like B) no banco de ESTs do Projeto Genoma Café, partindo de um total de 22 *contigs*. Em *A. thaliana* foram identificadas 36 expansinas (26 α -expansinas, seis β -expansinas, três expansinas-like A e uma expansina-like B) e em arroz 58 expansinas (34 α -expansinas, 19 β -expansinas, quatro expansina-like A e uma expansina-like B) (SAMPEDRO *et al.*, 2005). Portanto, o número de expansinas identificadas no banco de dados do Projeto Genoma Café é comparativamente pequeno, isto devido às características de projetos de seqüenciamento de ESTs (bibliotecas obtidas usando RNA de somente alguns tecidos, extração de RNA em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, transcritos raros etc).

Foi observado que dentre as 11 sequências não caracterizadas como expansinas 54,5% apresentaram ausência somente do segundo domínio. Em plantas são encontradas duas proteínas com alguma similaridade ao primeiro domínio das expansinas, mas que apresentam ausência do domínio C-terminal implicado na capacidade de ligação com polissacarídeos. Uma dessas proteínas, denominada peptídeo natriurético de plantas (PNP), pertence a uma nova classe de peptídeos com atividade biológica sistêmica em processos de crescimento e homeostasia em plantas (MORSE *et al.*, 2004). A segunda proteína pertence a classe das proteínas-relacionadas a patogênese (pathogenesis-related proteins) da família PR4 (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). Deste modo, as sequências com similaridade às expansinas encontradas no banco de dados do Projeto Genoma Café podem pertencer a um desses dois grupos protéicos.

Através da construção de árvore filogenética contendo expansinas de *C. arabica*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. esculentum*, *M. truncatula* e *L. sativa* foi verificado que dentre as 11 isoformas, nove referem-se a α -expansinas, uma a EXLA, uma a EXLB, não sendo encontrada nenhuma β -expansina em *C. arabica*, espécie dicotiledônea. Já em gramíneas e outras monocotiledôneas, as β -expansinas são mais abundantes (WU, MEELEY; COSGROVE, 2001), provavelmente por que α e β -expansinas atuam em diferentes substratos (LI *et al.*, 2003). Também, como as β -expansinas são expressas durante a formação do tubo

polínico, o fato de o banco de ESTs do Genoma Café não possuir bibliotecas específicas para essa fase pode explicar a ausência dessa família no banco de dados.

Tendo em vista o alto grau e similaridade entre as seqüências de α -expansinas, o grande número de isoformas dessa proteína em diferentes organismos também pode ser explicado pela necessidade de um controle seletivo do relaxamento da parede nos diferentes tipos celulares (COSGROVE, 2000). A análise filogenética das 11 isoformas mostrou a formação de quatro subgrupos entre as α -exp, sendo um destes formado por *CaEXPA1* e *CaEXPA3*, isoformas que demonstraram padrão semelhante de transcrição. Como era esperado *CaEXLA1* e *CaEXLB1* formaram ramos filogenéticos distintos entre si e das demais expansinas.

Devido ao nosso interesse em estudar o papel das expansinas no desenvolvimento e maturação de frutos de café, as isoformas *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*, que apresentaram ESTs em bibliotecas de frutos, foram selecionadas para uma análise *in silico* mais detalhada. O tamanho das proteínas codificadas variou entre 248 e 258 aa, tamanho similar ao encontrado em expansinas de outros organismos (SAMPEDRO e COSGROVE, 2005). Também pode ser observada nas três isoformas a presença de peptídeo sinal responsável pela secreção da proteína para a parede celular (BRUMMELL *et al.*, 1999) e a região de clivagem para a formação da proteína madura. As três α -expansinas selecionadas possuem os dois domínios característicos desta multifamília, um próximo a região N-terminal (domínio catalítico) e outro na região C-terminal (domínio de ligação para polissacarídeo/celulose). Possuem também resíduos identificados em outras expansinas já caracterizadas (SCHERBAN *et al.*, 1995; Ishimaru *et al.*, 2006) como oito resíduos conservados de cisteína (Cys) na porção N-terminal que atuam na formação de pontes dissulfito (COSGROVE, 2000), um motivo HFD (histidina, fenilalanina e aspartato) na porção central e quatro resíduos de triptofano (Trp) na porção C-terminal, com exceção para *CaEXPA2* que possui somente cinco resíduos de Trp.

Análises Moleculares

Southern Blot

As análises obtidas através de Southern blot revelaram fragmentos de diferentes perfis para cada uma das três isoformas. A hibridização com sondas de *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3* resultou na visualização de duas ou três bandas fortes.

Os padrões de restrição obtido com as enzimas *DraI* e *HindIII* sugerem que as três isoformas são cópias únicas em *C. arabica* cv. IAPAR 59 e cv. IAPAR 59 Graúdo, e em *C. racemosa*. A digestão com *DraI*, resultou em dois ou três sinais intensos. Estes são, possivelmente, devidos à presença de sítios de restrição das enzimas utilizadas nos íntrons dos genes. A similaridade da intensidade dos sinais de hibridação e ausência de sítio de restrição *DraI* na região das sondas reforça a indicação que esses genes são codificados por duas cópias no genoma, visto que *C. arabica* é uma espécie autotetraplóide, de modo que cada uma das duas espécies parentais contribui com uma cópia do gene. A digestão com *HindIII* também resultou na presença de dois sinais de hibridização.

Enquanto que para as isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA2* o padrão de bandas entre *C. arabica* cv. IAPAR 59 e cv. IAPAR 59 Graúdo sempre foi similar, a presença de sinais de hibridação de tamanhos diferentes para a isoforma *CaEXPA3* (digestão com *HindIII*) mostra que a “estrutura genômica” desta isoforma é diferente entre estas cultivares.

A organização éxon/íntron é bem conservada entre a multifamília de expansinas, sendo variável a quantidade de íntrons (até seis íntrons) e o tamanho dessas regiões (LEE *et al.*, 2001). Análise da seqüência de cDNA das três isoformas no programa *Intron Finder* (<http://www.sgn.cornell.edu/tools>) identificou dois possíveis íntrons em cada gene. Para *CaEXPA1* e *CaEXPA3* os íntrons estariam localizados entre a região de peptídeo sinal e o domínio catalítico (1º domínio) e no final do domínio de ligação para polissacarídeo (2º domínio). Já a *CaEXPA2* teria íntrons no início do 1º domínio e no final do 2º domínio. Com os *primers* desenhados a partir das regiões 5' e 3' UTR do cDNA de cada uma das três isoformas foi somente possível amplificar a região genômica de *CaEXPA1* e *CaEXPA2* (dados não apresentados). A não amplificação da região codante da isoforma *CaEXPA3*

pode ser devido à presença de transposons localizados na região 5' UTR. Estudos sobre a expressão gênica em plantas têm demonstrado que elementos transponíveis com inversões repetidas (MITEs) localizados nas regiões 5'UTR e 3'UTR fornecem sequências regulatórias envolvidas no início da transcrição e na estabilidade do mRNA, deste modo os MITEs podem ser uma importante ferramenta evolutiva para alteração no padrão da expressão gênica (WESSLER, BUREAU; WHITE, 1995).

Northern Blot

A utilização da técnica de Northern blot para a análise da transcrição de genes pode ser problemática quando o objetivo é o estudo da expressão de uma família gênica com alta similaridade das seqüências nucleotídicas devido à necessidade de sondas específicas, o que nem sempre é possível. Em nosso caso a obtenção de sondas específicas foi confirmada pelo experimento de Dot-blot, onde não foi observada hibridização cruzada entre as três sondas. O perfil transcricional das isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA2* obtido pelos resultados das análises de Northern blot seguiram o padrão observado *in silico* utilizando as seqüências presentes do banco HarvEST Coffee (Figura 7).

Os resultados de Northern blot obtidos com as membranas contendo diferentes tecidos de cafeeiro mostraram que as isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA3* tiveram maior número de transcritos em botão floral. Já a *CaEXPA2* apresentou transcritos em raiz, ramo jovem e maduro, com queda do sinal de hibridização em botão floral. A presença destes transcritos em botão floral provavelmente é devido à intensa divisão celular que ocorre neste órgão, o que também pode explicar a presença de expansinas em tecidos de ramo e de raiz. A atuação das expansinas em raiz e pêlos radiculares já foi reportada em *Arabidopsis thaliana* (BIBIKOVA *et al.*, 1998; CHO; COSGROVE, 2002), milho (ZHANG; HASENSTEIN, 2000), soja (LEE *et al.*, 2003) e *Rumex palustris* (COLMER *et al.*, 2005).

Membranas com RNA extraído de frutos inteiros de *C. arabica* hibridizadas com sondas de *CaEXPA1* e *CaEXPA3* apresentaram transcritos no início do desenvolvimento e final da maturação. O mesmo resultado foi observado na hibridização com RNA de pericarpo. No entanto, o padrão transcricional de *CaEXPA1* em perisperma, indica maior atuação desta isoforma com o início da rápida expansão dos frutos (60 DAF), enquanto que a *CaEXPA3* parece estar mais

relacionada com a fase de maturação dos frutos. A presença de transcritos dessas duas isoformas na fase de transição entre os estádios de café chumbinho (nome dado aos frutos verdes no início do seu desenvolvimento) e início da expansão dos tecidos dos frutos do cafeeiro sugerem a atuação dessas proteínas em processo de divisão celular, tanto do pericarpo quanto do perisperma. Após cessado o período de rápida expansão dos frutos, em torno de 90 DAF, observa-se queda no número de transcritos tanto de *CaEXPA1* como de *CaEXPA3*, com aumento da expressão nas fases referentes a maturação do pericarpo. Neste estágio final de desenvolvimento do fruto também ocorre intenso alongamento celular e dissociação da parede celular. Devido ao envolvimento das expansinas na maturação de frutos, tem sido relatada a sua modulação pela ação do fitormônio etileno (ROSE *et al.*, 1997; HAYAMA *et al.*, 2006; VIDHU *et al.*, 2005 e 2007; JACKSON, 2008). Contudo, o padrão de transcrição apresentado tanto por *CaEXPA1* quanto *CaEXPA3* indica que estas isoformas são independentes da regulação por etileno, visto que parecem atuar durante quase todo o processo de desenvolvimento e maturação de frutos de café, com acúmulo de transcritos em determinados estádios de desenvolvimento e maturação. Resultados similares foram observados em banana (VIDHU *et al.*, 2007), onde a isoforma *MaEXPA4* apresentou transcritos durante desenvolvimento e maturação dos frutos, em frutos sem tratamento com etileno e em frutos tratados com o inibidor 1-MCP (1-metilciclopropeno), indicando que esta isoforma é diferente das demais encontradas em banana, não sendo regulada por etileno. Em morango foi verificado que a isoforma *FaExp2* com atividade em frutos também não é modulada por etileno (CIVELLO *et al.*, 1999).

É importante destacar que o acúmulo de transcritos da *CaEXPA1* observado em pericarpo realça a atuação desta isoforma com a etapa de desenvolvimento rápido dos frutos, uma vez que é altamente transcrita em novembro (60 DAF) e em dezembro (90 DAF) no IAPAR-59 e no IAPAR-59 Graúdo, respectivamente. A manutenção da transcrição da isoforma *CaEXPA1* até o mês de dezembro (90 DAF) para o genótipo IAPAR-59 Graúdo, caracterizado por ter frutos e grãos de maior tamanho em comparação com o cv. IAPAR-59, indica a provável atuação dessa expansina no crescimento e alongamento do perisperma, sugerindo o envolvimento da *CaEXPA1* na definição do tamanho do grão de café. Neste estágio de desenvolvimento, o perisperma sofre intensa divisão celular e tem-se o alongamento e relaxamento da parede celular. O crescimento do perisperma nesta

fase, eventualmente determinará o tamanho final do grão, pois o espaço delimitado pelo perisperma será posteriormente preenchido pelo endosperma (GEROMEL *et al.*, 2006; MARRACCINI; CASTRO, 2006). Estudos complementares de hibridização *in situ* poderão ajudar a comprovar a importância desta isoforma na formação do grão de café.

Em relação a *CaEXPA3* observou-se maior expressão desta isoforma durante os estádios de alongamento inicial do fruto e, principalmente, durante maturação do fruto (150 a 210 DAF), visto que foi observado menor acúmulo de transcritos em perisperma em comparação ao pericarpo.

A observação do padrão transcricional de *CaEXPA1* e *CaEXPA3* em pericarpo de frutos verdes (180 DAF) de IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo, mostra maior acúmulo de transcritos das duas isoformas no segundo genótipo com frutos maiores. O maior nível de mRNA desses genes de expansinas no fruto marçõ-verde (180 DAF) do IAPAR-59 Graúdo indica que neste genótipo já estão ocorrendo os processos de dissociação e solubilização da parede celular do pericarpo, eventos relacionados com a maturação dos frutos. A maior transcrição de *CaEXPA1* e *CaEXPA3* nesta fase sugere que ambos podem servir como marcadores fisiológicos do processo de maturação em frutos de café, visto que em IAPAR-59 Graúdo, o período de transição entre fruto verde e fruto verde cana ocorre aos 180 DAF (maior acúmulo de transcritos das duas isoformas) enquanto em IAPAR-59 essa transição se dá entre 180 DAF e 210 DAF.

Os resultados obtidos para *CaEXPA2* através da hibridização com membranas contendo RNA de frutos inteiros e de pericarpo evidenciam a atuação específica desta isoforma somente nas fases finais da maturação dos frutos tanto em *C. arabica* cv. IAPAR-59 como em IAPAR-59 Graúdo. Isto, aliado à ausência de transcritos em perisperma e endosperma, sugere que a isoforma *CaEXPA2* pode ser modulada por etileno. Resultado semelhante foi encontrado para a isoforma *MaEXPA1*, caracterizada em banana (KUMAR *et al.*, 2004). Em tomate, Rose *et al.* (1997) demonstraram a participação das expansinas com o processo de maturação e, conseqüentemente, maciez do fruto através da identificação do gene *LeEXPA1* que é regulado por etileno e apresenta transcrição específica nas fases finais de maturação do tomate. Brummell *et al.* (1999) estudaram mais detalhadamente a relação de *LeEXPA1* com a maciez do fruto e o metabolismo da parede celular em tomateiros com a transcrição deste gene superexpressa ou reprimida. Estes autores

observaram que frutos de tomate com o gene superexpresso eram macios enquanto que a sua repressão proporcionou frutos mais firmes. As mudanças físicas ocorridas nas características dos tomates transgênicos foram também acompanhadas por mudanças nos polímeros da parede, sugerindo que as expansinas promovem maciez do fruto, inicialmente, agindo diretamente nas células da parede e controlando a entrada de pectinases (CHO; COSGROVE, 2004). Salmona *et al.* (2008) identificaram uma seqüência de cDNA em café com similaridade à expansina de *Zinnia elegans* (Expansin-2 – AAF35901) com transcrição específica nas fases finais de maturação (>210 DAF), deste modo os autores sugerem o uso deste gene como um marcador fenológico, indicando a maturação do endosperma. Do ponto de vista do melhoramento genético do cafeeiro, estudos sobre a regulação do gene *CaEXP2* podem levar a um maior uniformidade dos frutos de café durante o período de colheita, o que implicaria em uma melhor qualidade do café produzido.

O padrão transcricional espacial e temporal das três isoformas em *C. racemosa* foi similar tanto em fruto inteiro quanto nos diferentes tecidos do fruto. Ficou evidenciada que nesta espécie de café, diferentemente do observado em *C. arabica*, a transcrição das três isoformas de expansinas é específica, ocorrendo somente no pericarpo.

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para a melhor compreensão do desenvolvimento e maturação dos frutos de café, evidenciando a relação das expansinas com estes dois processos. As três isoformas analisadas apresentaram diferenças temporais e espaciais no padrão transcricional, sugerindo diferentes modos de regulação gênica. *CaEXPA1* parece estar relacionada com a regulação do tamanho dos frutos do cafeeiro enquanto que as isoformas *CaEXPA2* e *CaEXPA3* são mais expressas durante a maturação dos frutos, com maior destaque para *CaEXPA2*, que apresenta atuação específica no pericarpo. *CaEXPA1* e *CaEXPA2* destacam-se como dois importantes genes atuando no desenvolvimento e maturação dos frutos de café, fatores com importância direta na cadeia produtiva do café por influenciarem a qualidade da bebida e, conseqüentemente, o lucro/prejuízo dos cafeicultores. Os resultados obtidos servirão de base para análises mais detalhadas a respeito do padrão de expressão protéica, caracterização das regiões promotoras, entre outros. Embora desafiador face aos problemas de redundância funcional das expansinas e dificuldades técnicas para obtenção de plantas transgênicas de cafeeiro de modo

rápido e eficiente, seria importante a obtenção de plantas com aumento ou inibição da expressão das isoformas identificadas neste trabalho para verificar de forma mais detalhada o papel dessas α -expansinas no desenvolvimento dos diferentes tecidos do fruto de café.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 5, p. 403-410, 1990.

ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5350–5354, 1977.

ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O. et al. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, v. 118, p. 53–65, 2001.

ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; ASTORGA, C. et al. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 894–900, 2002.

ASHA, V.A. S.; ANIRUDDHA, P.S.; PRAVENDRA, N. Multiple forms of α -expansin genes are expressed during banana fruit ripening and development. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 184–192, 2007.

BIBIKOVA, T.N.; JACOB, T.; DAHSE, I. et al. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 125, p. 2925-2934, 1998.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 13-23, 1979.

BRIDSON, D.M.; VERDCOURT, B. **Flora of tropical East Africa: Rubiaceae**. (Part 2). Cape Town: Iziko Museums of Cape Town, 1988. p.415-747.

BRUMMEL, D.A.; HARPSTER, M.H.; CIVELLO, P.M. et al. Modification of Expansin Protein Abundance in Tomato Fruit Alters Softening and Cell Wall Polymer Metabolism during Ripening. **The Plant Cell**, v.11, p. 2203-2216, 1999.

BRUMMEL, D.A.; HARPSTER, M.H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p 311-340, 2001.

CADERAS, D.; MUSTER, M.; VOGLER, H. et al. Limited Correlation between Expansin Gene Expression and Elongation Growth Rate. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1399– 1413, 2000.

CAMARGO, A.P. Florescimento e frutificação do café arábica nas diferentes regiões cafeeiras do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 7, p. 831 -839, 1985.

CAMARGO, A.P.; CAMARGO, M.B.P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, v. 60, n. 1, p. 65 -68, 2001.

CAREY, R.E.; Portrait of the expansin superfamily in *Physcomitrella patens*: comparisons with angiosperm expansins. **Annals of Botany**, v. 99, p. 1131-1141, 2007.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell wall in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v.3, p.1-30, 1993.

CARVALHO, V.D.; CHALFOUN, S.M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, v.11, p.79-92, 1985.

CAVALARI, A.A. **Invertase ácida, sacarose sintase e o metabolismo de açúcares no desenvolvimento de semente de café (*Coffea arabica* L.)**. Campinas, 2004. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CIVELLO, P.M.; POWELL, A.L.T.; SABEHAT, A. et al. An Expansin Gene Expressed in Ripening Strawberry Fruit. **Plant Physiology**, v.121, p. 1273-1279, 1999.

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

CHAO, L. L.; BEDINGER, P.A.; VOLK, C. et al. Purification and characterization of four β -expansins (zea m 1 isoforms) from maize pollen1. **Plant Physiology**, v. 132, p. 2073–2085, 2003.

CHAPARRO, A.P.; CRISTANCHO, M.A.; GAITÁN, A.L. Genetic variability of *Coffea arabica* L. accessions from Ethiopia evaluated with RAPDs. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 291–297, 2004.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: Clifford, M.N. & Wilson, K.C. (ed.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helm, 1985. p. 13-47.

CHEN, F.; DAHAL, P.; BRADFORD, K. J. Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. **Plant Physiology**, v. 127, p. 928-936, 2001.

CHO, H.T.; COSGROVE, D.J. Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 14, p. 3237–3253, 2002.

CHO, H.T.; COSGROVE, D.J. Expansins as agents in hormone action. In: Davies, P.J. (ed). **Plant Hormones**, 3 ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 2004. p.262-281.

CHO, H.T.; KENDE, H. Expression of Expansin Genes is Correlated with Growth in Deepwater Rice. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1661-1671, 1997.

CHOI, D.; CHO, H.T; LEE, Y. Expansins: expanding importance in plant growth and development. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 511–518, 2006.

CHOI, D.; LEE, Y.; CHO, H.T. et al. Regulation of Expansin Gene Expression Affects Growth and Development in Transgenic Rice Plants. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1386-1398, 2003.

COLMER, T.D.; PEETERS, A.J.; WAGEMAKER, C.A. et al. Expression of alpha-expansin genes during root acclimations to O₂ deficiency in *Rumex palustris*. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 423–437, 2004.

CONAB -Companhia Nacional de Abastecimento -Disponível no site <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>>. Acesso em março 2007. 6:850-861, 2005. COSGROVE, D.J. Cell wall loosening by expansins. **Plant Physiology**, v. 118, p. 333–339, 1998.

COSGROVE, D.J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 47, p. 321-326, 2000a.

COSGROVE, D.J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 109–124, 2000 b.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature**, v. 6, p. 850-861, 2005 a.

DEDECCA, D.M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. Typica Cramer. **Bragantia**, v.16, p. 315-355.

DE CASTRO, R.D.; ESTANISLAU, W.T.; CARVALHO, L.M.M. et al. Functional development and maturation of Coffee (*Coffea arabica*) fruit and seeds.

Proceedings of the 20th International Scientific Colloquium on Coffee, Bangalore, International Scientific Association on Coffee, Paris, p.619-635.

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

DENTAN, E. The microscopy structure of the coffee bean. In: Clifford MN and Wilson KC (Ed.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helm, 1985. p. 284-304.

DOTTO, M.C.; MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 301-307, 2006.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EIRA, M.T.S.; DA SILVA, E.A.A.; DE CASTRO, R.D. et al. Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.149-163, 2006.

EMBRAPA Café -Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Disponível no site <<http://www22.sede.embrapa.br/café/>>. Acesso em março 2007.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.C.; CALADO, V. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, V. 98, p. 373–380, 2006.

GRAY-MITSUMUNE, M.; MELLEROWICZ, E.J.; ABE, H. et al. Expansins Abundant in Secondary Xylem Belong to Subgroup A of the α -Expansin Gene Family. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1–13, 2004.

GEROMEL, C. **Metabolismo da sacarose em frutos de café**. Campinas, 2006. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Curso de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L.P.; BOTTCHEER, A. et al. Sucrose metabolism during fruit development in *Coffea racemosa*. **Annals of Applied Biology**, v. 152, n. 2, p. 179-187, 2008.

GUERREIRO FILHO, O. *Coffea racemosa* Lour. une revue. **Café Cacao Thé** (Paris), vol. XXXVI, no 3, p. 171-186, 1992 HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41:95-98, 1999.

HARRISON, E.P.; McQUEEN-MASON, S.J.; MANNING, K. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1437-1446, 2001.

HAYAMA, H.; SHIMADA, T.; HAJI, T. et al. Molecular cloning of a ripening-related expansin cDNA in peach: evidence for no relationship between expansin accumulation and change in fruit firmness during storage. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 567–573., 2000.

HAYAMA, H.; SHIMADA, T.; FUJII, H. et al. Ethylene-regulation of fruit softening and softening-related genes in peach. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 15, p. 4071–4077, 2006.

HIWASA, K.; ROSE, J.K.C.; NAKANO, R. et al. Differential expression of seven α -expansin genes during growth and ripening of pear fruit. **Physiologia Plantarum**, v. 117, p. 564–572. 2003.

HORTON, P.; PARK, K.J.; OBAYASHI, T. et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 585-587, 2007.

IM, K.H.; COSGROVE, D.J.; JONES, A.M. Subcellular Localization of Expansin mRNA in Xylem Cells. **Plant Physiology**, v. 123, p. 463–470, 2000.

ISHIMARU, M.; SMITH, D.L.; GROSS, K.C. et al. Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1675-1682, 2007.

JACKSON, M.B. Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. **Annals of Botany**, v. 101, p. 229-248, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN. 2005. KWASNIEWSKI, M.; SZAREJKO, I. Molecular cloning and characterization of b-expansin gene related to root hair formation in barley. **Plant Physiology**, v.141, p. 1149–1158,2006.

KENDE, H. et al. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. **Plant Molecular Biology**, v.55, p. 311–314, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

KUMAR, V.; NAIDU, M.M.; RAVISHANKAR, G.A. Developments in coffee biotechnology -in vitro plant propagation and crop improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 7, p.49–65, 2006.

LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, E. et al. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, v. 87, p. 59–64, 1996.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P. et al. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p.947–955, 1997.

LEE, D.K.; AHN, J.H.; SONG, S.K. et al. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. **Plant Physiology**, v,131, p.985– 997, 2003.

LEE, Y.; KENDE, H. Expression of α -expansin and expansin-like genes in deepwater rice. **Plant Physiology**, v. 130, p.1396-1405, 2002.

LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B. et al. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n.1, p. 229-242, 2006.

LI, Y.; JONES, L.; MCQUEEN-MASON, S. Expansins and cell growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 603–610, 2003.

LI, L.C.; COSGROVE, D.J. Grass group I pollen allergens (β -expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 4217-4226, 2001.

LIN, Z.; NI, Z.; ZHANG, Y. et al. Isolation and characterization of 18 genes encoding a-and b-expansins in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, v. 274, p. 548-556, 2005.

LINK, B.M.; COSGROVE, D.J. Acid-Growth Response and a-Expansins in Suspension Cultures of Bright Yellow 2 Tobacco. **Plant Physiology**, v. 118, p. 907-916, 1998.

LIU, Y.; LIU, D.; ZHANG, H. et al. The α -and β -expansin and xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene families of wheat: Molecular cloning, gene expression, and EST data mining. **Genomics**, v. 90, p. 516-529, 2007.

MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D.M.; COSGROVE, D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **The Plant Cell**, v. 4, p. 1425-1433, 1992.

MCQUEEN-MASON, S.; COSGROVE, D.J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 91: 6574-6578, 1994.

MCQUEEN-MASON, S.; COSGROVE, D.J. Expansin mode of action on cell walls. **Plant Physiology**, v. 107, p. 87-100, 1995.

MENDES, A.J.T. Desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v. 2, p.115-128, 1942.

MIRANDA, E.M.; PEREIRA, R.C.A.; BERGO, C.L. Comportamento de seis linhagens de café (*Coffea arabica* L.) em condições de sombreamento e a pleno sol no estado do Acre. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 1, p. 62-69, 1999.

MOHNEN, D. **Biosynthesis of pectins and galactomannans**. In: COMPREHENSIVE NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY ELSEVIER SCIENCE, Amsterdam, 1999.

MORSE, M.; PIRONCHEVA, G.; GEHRIN, C. AtPNP-A is a systemically mobile natriuretic peptide immunoanalogue with a role in *Arabidopsis thaliana* cell volume regulation. **Federation of European Biochemical Societies**, n. 556, p. 99-103.

MULLER, B.; BOURDAIS, G.; REIDY, B. et al. Association of Specific Expansins with Growth in Maize Leaves Is Maintained under Environmental, Genetic, and Developmental Sources of Variation. **Plant Physiology**, v. 143, p. 278–290, 2007.

NIELSEN, H.; ENGELBRECH, J.; BRUNAK, S. et al. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineering**, v.10, p.1–6, 1997.

NUNES, F.M.; COIMBRA, M.A. Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 283–285, 1998.

OMONDI, W.O.; NAKANO, R.; KUBO, Y. et al. Coordinated expression patterns of genes encoding cell wall modifying enzymes during ripening in distinct anatomical tissue regions of the fig (*Ficus carica* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 253-261, 2004.

OOSTERVELD, A.; HARMSSEN, J. S.; VORAGEN, A.G.J. et al. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 285–296, 2003.

OUGUERRAM, A. Contribution à l'étude des parois cellulaires de deux fruits industriels: l'olive et le café. Paris VI University, France. PhD Thesis, 1999.

PEREIRA, L.F.P.; GALVÃO, R.M.; KOBAYASHI, A.K. et al. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 283 – 289, 2005.

PEZZOPANE, C.G. **Influências ambientais e da variabilidade genética no rendimento intrínseco do café**. Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, 2003.

PIEN, S.; WYRZYKOWSKA, J.; SMART, C. et al. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 11812–11817, 2001.

PIMENTA, C.J.; CHAGAS, S.J.R.; COSTA, L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*coffea arabica* L.) colhido em quatro estádios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v.24, n. 4, p.1079-1083, 2000.

PIMENTA, C.J.; VILELA, E.R. Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) colhido em sete épocas diferentes na região de Lavras-MG. *Ciência e Agrotecnologia – Edição Especial*, p. 1481 -1491, 2002.

PINTO, F.O. **Associação de marcadores EST-SSR à resistência ao bicho-mineiro em cafeeiros**. Campinas, 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Curso de Pós Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas.

POWELL, A.L.T.; KALAMAKI, M.S.; KURIEN, P.A. et al. Simultaneous transgenic suppression of LePG and LeExp1 influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 7450–7455, 2003.

PRAKASH, N.S.; COMBES, M.C.; SOMANNA, N. et al. AFLP analysis of introgression in coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) derived from a natural interspecific hybrid. **Euphytica**, n. 124, p. 265–271, 2002.

RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1271-1274, 1992.

REDGWELL, R.; FISCHER, M. Coffee carbohydrates. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n.1, p. 165-174, 2006.

RENA, A.B. et al. **Culturas do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro**. 1. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1986. 447p.

REINHARDT, D.; WITTEW, F.; MANDEL, T. et al. Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. **The Plant Cell**, v.10, p. 1427–1437, 1998.

RIBAS, A.F.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 83-94, 2006.

RIBEIRO, F.L. **Identificação e caracterização de cDNAs expressos diferencialmente durante a maturação dos frutos de *Coffea arabica* L.** Campinas, 2007. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

- ROSE, J.C.; LEE, H.H.; BENNETT, A.B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 5955-5960, 1997.
- SALMONA, J.; DUSSERT, S.; DESCROIX, F. et al. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. **Plant Molecular Biology**, v. 66, p. 105-124, 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D.J.; The expansin superfamily. **Genome Biology**, v. 6, p. 242.1-241.11, 2005.
- SCHERBAN, T.Y.; SHI, J.; DURACHKO, D.M. et al. Molecular cloning and sequence analysis of expansins—a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 9245-9249, 1995.
- SZAREJKO, I.; KWASNIEWSKI, M. Molecular Cloning and Characterization of β -Expansin Gene Related to Root Hair Formation in Barley. **Plant Physiology**, v. 141, p. 1149-1158, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 449-484.
- TRIVEDI, K.P.; PRAVENDRA, N. MaExp1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit. **Plant science**, v. 167, p. 1351-1358, 2004.
- URBANEJA, G.; FERRER, J.; PAEZ, G. et al. Acid hydrolysis and carbohydrates characterization of coffee pulp. **Renewable Energy**, v. 9, p.1041-1044, 1996.
- VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J.J. et al. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 197-204.
- VIDHU, A.S.; CHOURASIA, A.; PRAVENDRA, N. Softening in mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) is correlated with the expression of an early ethylene responsive, ripening related expansin gene, *MiExpA1*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 38, p. 223–230, 2005.
- VIDHU, A.S.; ANIRUDDHA, S. P.; PRAVENDRA, N. Multiple forms of α -expansin genes are expressed during banana fruit ripening and development. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 184–192, 2007.
- VIEIRA, L.G.E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 95-108, 2006.
- WESSLER, S.R.; BUREAU, T.E.; WHITE, S.E. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, n.5, p.814-821, 2005.

WU, Y.; MEELEY, R.B.; COSGROVE, D.J. Analysis and Expression of the α -Expansin and β -Expansin Gene Families in Maize. **Plant Physiology**, v. 126, p. 222-232, 2001.

YUAN, S.; WU, Y.; COSGROVE, D.J. A Fungal Endoglucanase with Plant Cell Wall Extension Activity. **Plant Physiology**. 127: 324–333, 2001.

ZHANG, N.; HASENSTEIN, K.H. Distribution of Expansins in Gravidresponding Maize Roots. **Plant Cell Physiology**, v. 41, p. 1305-1312, 2000.