



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATHALIA VOLPI E SILVA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES DE
TRÊS ISOFORMAS DE EXPANSINAS DE *COFFEA ARABICA***

NATHALIA VOLPI E SILVA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES DE
TRÊS ISOFORMAS DE EXPANSINAS DE *COFFEA ARABICA***

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

Orientador: Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586c Silva, Nathalia Volpi e.
Clonagem e caracterização de promotores de três isoformas de expansinas de *Coffea arabica* / Nathalia Volpi e Silva. – Londrina, 2012. 98f.: il.

Orientador: Luiz Filipe Protasio Pereira.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2012. Inclui bibliografia.

1. Café – Melhoramento genético – Teses. 2. Genética – Expressão – Teses. 3. Café – Maturação – Teses. 4. Plantas – Clonagem molecular – Teses. I. Pereira, Luiz Filipe Protasio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 631.52:633.73

NATHALIA VOLPI E SILVA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES DE TRÊS
ISOFORMAS DE EXPANSINAS DE *COFFEA ARABICA***

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira
EMBRAPA – Londrina – PR

Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor
EMBRAPA – Londrina – PR

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
EMBRAPA – Londrina – PR

Londrina, 15 de fevereiro de 2012

AGRADECIMENTOS

A Deus, e a minha família.

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 Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa.

Aos Doutores Luiz Filipe Protasio Pereira (orientador), Douglas Silva Domingues e Luiz Gonzaga Esteves Vieira, pela oportunidade, confiança, orientação e atenção, boa vontade, ensinamentos, paciência, apoio, incentivo e amizade. Por toda a contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos Dr(a)s. Alessandra Ferreira Ribas, Rosângela M. P. Moreira, Hugo Bruno Correa Molinari e Ricardo Vilela Abdelnoor, pelas contribuições e sugestões dadas na correção deste trabalho. E por aceitarem prontamente o convite para participarem das bancas de qualificação e defesa.

A Dra. Alessandra ferreira Ribas e a Sandra Maria Bellodi Cação, por terem me ensinado e ajudado no laboratório, sempre com muita atenção, boa vontade e paciência.

Ao Lucas Canesin, por ter me ajudado na transformação de tomateiro.

Ao Dr. Tumoru Sera, por permitir a utilização do genótipo Graúdo.

A todos os amigos do LBI que contribuíram direta ou indiretamente com o meu trabalho, possibilitando o meu crescimento profissional.

SILVA, Nathalia Volpi e. **Clonagem e caracterização de promotores de três isoformas de expansinas de *Coffea arabica***. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A maturação de frutos do cafeeiro é um processo bioquímico e fisiológico que altera cor, sabor aroma e textura. Esses processos envolvem a expressão de diferentes enzimas e proteínas tais como as expansinas, responsáveis por promoverem o relaxamento da parede celular. A caracterização do padrão de expressão de expansinas do cafeeiro (*CaExp1*, 2 e 3) em diferentes tecidos do fruto despertou o interesse no estudo da região promotora desses genes. Deste modo este trabalho teve por objetivo clonar as regiões promotoras dos genes, *CaExp1*, *CaExp2* e *CaExp3* de *C. arabica* em duas cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59 Graúdo; comparar e caracterizar *in silico* as regiões promotoras assim como validar a função do promotor (*ProCaExp2*). Os fragmentos dos promotores foram gerados utilizando o kit *Genome Walker* e ligados ao vetor PCR 2.1–TOPO. As sequencias foram comparadas utilizando os bancos de dados: PLACE, RegSite, MatInspector e PlantCare. A análise *in silico* dos promotores revelou a presença de motivos de resposta a luminosidadenos quatro promotores. Também foi observada a presença de motivos para fitorreguladores como etileno e auxina no *ProCaExp2*e ABA, Brassinosteróides e GA nos *ProCaExp1* e *ProCaExp3*. O *ProCaExp2*foi fusionado ao gene *GUSA* e inserido via *A. tumefaciens* no tomateiro. A análise histomíquica do gene *GUSA*foi realizada em diferentes tecidos das plantas transformadas e controles não transformados. A análise da expressão do gene *GUSA* demonstrou que o *ProCaExp2* direciona a expressão do gene para o endosperma antes do início da maturação e para o endosperma e polpa durante a maturação do fruto. A disponibilidade de promotores específicos é uma importante ferramenta biotecnológica para direcionar a expressão de genes para os frutos sem interferir em outros processos metabólicos das plantas.

Palavras-chave: α -expansinas. Promotores. *C. arabica*. Maturação do fruto

SILVA, Nathalia Volpi e. **Cloning and characterization of promoters of three isoforms of expansins *Coffea arabica***. 2012. 98 p. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The maturation of coffee fruits is a physiological and biochemical process that changes color, flavor, aroma and texture. These processes involve the expression of different enzymes and proteins such as expansins, responsible for promoting the cell wall expansion. The characterization of expression pattern of expansions (*CaExp1*, *CaExp2*, *CaExp3*) in different fruit tissues in coffee instigate the interest in the promoter region of these genes. Thus, this study aimed to clone the promoter regions of genes, *CaExp1*, *CaExp2* and *CaExp3* in two cultivars of *C. arabica*: IAPAR 59 and 59 IAPAR Graúdo in order to compare *in silico* these promoter regions and to validate the function of the promoter (ProCaExp2). Promoter fragments were generated using the Genome Walker kit and ligated to PCR 2.1-TOPO vector. These sequences were compared using the databases: PLACE, RegSite, MatInspector and PlantCare. The ProCaExp2 was fused to the *GUSA* gene and inserted via *A. tumefaciens* in tomato. *In silico* analysis of the promoters revealed the presence of motifs responsive to light in the four promoters analysed. Furthermore, we also detected the presence of motifs for growth regulators such as ethylene and auxin in ProCaExp2; and ABA, brassinosteroids and GA in ProCaExp1 and ProCaExp3. The histochemical analysis of the *GUSA* gene was accomplished in different stages of development in transformed and non transformed plants. The expression of gene *GUSA* demonstrated that the ProCaExp2 drives the gene expression to the endosperm before the beginning of maturation and for the endosperm and pericarp during maturation of the fruit. The availability of specific promoters is an important biotechnological tool to direct the expression of genes for fruit without interfering with other metabolic processes of plants.

Keywords: α -expansins. Fruit development. Maturation. Promoter. *C.arabica*

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 mostradas (De Castro e Marraccini, 2006)16
- Figura 2** – Desenvolvimento e maturação do fruto de *C. arabica*. (De Castro e Marraccini, 2006, adaptado por Budzinski, 2008).....16
- Figura 3** – Regiões regulatórias de eucariontes. Promotor contendo o elemento iniciador (Inr), o TATAbox, DPE (elemento do promotor downstream), insulador e regiões regulatórias silenciadoras e ativadoras (silencer e enhancer). Adaptado de Adams (2008).....23
- Figura 4** – Frutos de *C. arabica* cv. IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo (BUDZINSKI et al., 2011)28
- Figura 5** – Etapas da metodologia utilizada para a obtenção das regiões promotoras dos genes de interesse. Fonte: BD GenomeWalker™ Universal Kit User Manual (2004).....31
- Figura 6** – Construções gênicas empregadas. A) Estrutura do cassete de transformação utilizados para a análise funcional do promotor B) Mapa de restrição do vetor binário pCAMBIA 1381 contendo o gene repórter GUSA (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/2053/>).....35
- Figura 7** – Construção gênica mostrando os sítios de digestão e o tamanho do fragmento esperado de fragmento referente à posição correta do promotor37
- Figura 8** – Fragmentos dos promotores dos genes de expansina de *C. arabica* Iapar 59 e *C. arabica* Iapar 59 cv. Graúdo obtidos utilizando o kit Universal Genome Walker (Clontech)™: A) Amplificação da biblioteca EcoRV; B) Amplificação da biblioteca DraI40

Figura 9 – Alinhamento no programa CLC (Main Workbench 4.1.1) entre as sequências de ProCaExp1 das cvs lapar 59 (I59) e .Graúdo. Colunas indicam similaridade entre as seqüências	42
Figura 10 – Alinhamento no programa CLC (Main Workbench 4.1.1) entre as sequencia de ProExp2 e ProCaExp1. Colunas indicam similaridade entre as seqüências.....	43
Figura 11 – Alinhamento no programa CLC (Main Workbench 4.1.1) entre as sequências de ProCaExp1 e ProCaExp3. Colunas indicam similaridade entre as sequências.....	44
Figura 12 – A. Construção gênica mostrando os sítios de digestão e o tamanho do fragmento esperado de fragmento referente a posição correta do promotor. B. Digestão do cassete de expressão contendo o promotor do gene CaEXPA2 de C. arabica lapar 59 com as enzimas Xbal e PstI	54
Figura 13 – Transformação do tomateiro. A- germinação in vitro de sementes de tomate cv. MicroTom; BC – regeneração de brotos em meio seletivo contendo higromicina; D – desenvolvimento in vitro de planta provavelmente transformada; EF- Aclimatação dos tomateiros em casa-de-vegetação.....	55
Figura 14 – Análise molecular dos eventos de tomateiros provavelmente transformados contendo o promotor putativo CaEXP2 fusionado ao gene gusA usado a PCR. M – Marcador de peso (1 Kb plus); B – branco (mix sem DNA); C- Planta de tomate não transformada; 1 - 9 plantas regeneradas.....	56
Figura 15 – Produção da geração T1 de tomateiros transgênicos. A- florescimento; B-C frutificação.....	56
Figura 16 – Análise da confirmação das plantas na geração T1 de um evento de transformação usando PCR. M – Marcador de peso (1 Kb plus); B – branco (mix sem DNA); C- (Planta de tomate não transformada);1 – 7 sementes de 1 evento de transformação	57
Figura 17 – Ensaio histoquímico de (A) folha, (B) flor e (C-E) frutos em diferentes fases de desenvolvimento.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligos gene-específicos utilizados para a amplificação da região promotora dos genes de interesse	33
Tabela 2 – Número de clones e tamanho em pb dos promotores dos genes de expansina e das diferentes cultivares de <i>C. arabica</i> analisadas	41
Tabela 3 – Análise dos motivos encontrados no ProCaExp1 e ProCaExp3 dos cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59 Graúdo	46
Tabela 4 – Identificação de 17 motivos encontrados no promotor putativo de <i>CaEXPA2</i>	50
Tabela 5 – Comparação dos principais motivos encontrados em quatro promotores de expansina de cafeeiros	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	ASPECTOS ECONÔMICOS DO CAFEIEIRO	14
3.2	CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DO CAFEIEIRO.....	14
3.3	FRUTIFICAÇÃO DO CAFEIEIRO	15
3.4	EXPANSINAS.....	18
3.5	REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA EM EUKARIOTES	20
3.5.1	Aspectos Gerais	20
3.5.2	Controle Transcricional em Eucariotos	21
3.5.3	Elementos Regulatórios.....	22
3.6	IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES PROMOTORAS EM PLANTAS CULTIVADAS.....	24
4	ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA PLANT CELL REPORT- SPRINGER	26
4.1	INTRODUÇÃO	26
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.2.1	Material Vegetal	28
4.2.2	Extração de DNA Genômico	29
4.2.3	Construção de Bibliotecas Genome Walker™	29
4.2.4	Obtenção das Sequências Promotoras de Interesse	32
4.2.5	Clonagem dos Fragmentos	33
4.2.6	Sequenciamento dos Fragmentos Obtidos	34
4.2.7	Análise das Sequências e Comparação Genômica in Silico entre dois Cultivares de Café	34
4.2.8	Construções de Vetores de Expressão	35
4.2.9	Inserção dos Vetores em Agrobacterium Tumefaciens.....	37
4.2.10	Transformação de Solanum Lycopersicum cv. Microtom.....	38
4.2.11	Análise Histoquímica.....	39

4.3	RESULTADOS	39
4.3.1	Isolamento e Clonagem da Região Promotora	39
4.3.2	Análise in Silico dos Promotores	41
4.3.3	Análise dos Motivos dos Promotores Expansina 1 e 3.....	44
4.3.4	Análise dos Motivos Promotores Expansina 2	49
4.3.5	Comparação dos Promotores de Expansina de Cafeeiros.....	52
4.3.6	Validação Funcional do Promotor Caexp2 em Planta Modelo	54
4.4	DISCUSSÃO	58
4.4.1	Análise dos Motivos Presentes no Procaexp1 e 3	58
4.4.2	Análise dos Motivos Presentes no Procaexp2	60
4.4.3	Validação Funcional do Promotor Caexp2 em Tomateiro	62
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS.....	66
6	ANEXO 1	77
6.1	INTRODUÇÃO	77
6.2	METODOLOGIA	79
6.2.1	Comparação do Perfil de Expressão de α -expansinas	79
6.2.2	Análise das Sequências Promotoras e Comparação Genômica in Silico entre as Cinco α -expansinas	80
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
6.3.1	Comparação do Perfil de Expressão de α -expansinas	80
6.3.2	Análise de Promotores	88
6.4	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas mundiais, sendo cultivado em mais de 60 países. O Brasil é o maior produtor mundial de café com estimativa de produção em 2011 de 43,15 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado (CONAB 2011). O gênero *Coffea* L. contém aproximadamente 100 espécies, cujo centro de origem é o continente africano. As espécies *Coffea arabica* e *C. canephora* têm maior importância comercial, representando 70% e 30%, respectivamente, do mercado mundial de café, sendo o *C. arabica* o café mais apreciado pelos consumidores.

A produção do café é uma atividade de grande importância econômica e social. Aproximadamente dois terços dos produtores de café no Brasil são pequenos e médios agricultores, sendo que nestas propriedades a atividade cafeeira é uma das principais culturas geradoras de renda. Além disto, o agronegócio do café tem grande impacto econômico pela transferência de capital a outros setores da economia, sendo responsável por expressiva capacidade de absorção de mão de obra no campo, indústria e comércio.

A produção de cafés de qualidade é a chave para manutenção e conquista de novos mercados do agronegócio café. A qualidade do café produzido e consequentemente da bebida 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 et al., 2006). Uma maneira de minimizar este problema é a utilização de plantas de café com desenvolvimento e maturação uniforme dos frutos. 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 (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006). O entendimento desse processo de maturação nos seus diversos níveis é fundamental para o desenvolvimento de estratégias visando melhorar a qualidade dos cafés.

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 (PEREIRA et al., 2005). Neste contexto, as expansinas destacam-se como proteínas responsáveis por promoverem o relaxamento da parede celular. Elas estão envolvidas nos processos que requerem expansão celular como: organogênese, germinação de sementes, solubilização da parede, desenvolvimento e maturação dos frutos (COSGROVE, 1997).

Em recente trabalho realizado por BUDZINSKI et al. (2011) o padrão de transcrição de três isoformas de α -expansinas (EXPA) foi identificado e caracterizado, em frutos do cafeeiro. As isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA3* mostraram mesmo padrão de transcrição no perisperma (tecido responsável pela definição do tamanho do grão do café). Também foram observadas diferenças nos padrões de transcrição no perisperma entre IAPAR-59 e de IAPAR-59 Graúdo (cultivar com tamanho maior de grão) sugerindo a participação destas duas isoformas 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 maturação do pericarpo devido a despolimerização da parede celular. Portanto, a alta expressão destas isoformas em tecidos distintos do fruto despertou o interesse na caracterização da região promotora das três isoformas em *C. arabica*, além da comparação dessas seqüências regulatórias nas cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59-Graúdo.

A identificação dos promotores de expansinas com atividades relacionadas aos estágios de desenvolvimento dos frutos poderá ser importante em trabalhos de transformação genética do cafeeiro, tanto com relação à produção de plantas transgênicas, como para auxiliar na compreensão dos fatores genéticos e fisiológicos relacionados à formação do grão e maturação do fruto.

2 OBJETIVOS

Clonagem e caracterização da região promotora de três genes de α -expansinas (EXPA), envolvidos em estágios de desenvolvimento e maturação de frutos do cafeeiro, *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonagem das regiões promotoras dos genes, *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3* em *C. arabica* cv. IAPAR 59 e IAPAR 59 Graúdo;
- Comparação *in silico* das regiões promotoras clonadas;
- Validação funcional do promotor *CaEXPA2* por meio de transformação estável da planta modelo (*Solanum lycopersicum* cv. MicroTom) via *A. tumefaciens* contendo o cassete de expressão ProCaExp2:*GUSA*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS ECONÔMICOS DO CAFEIEIRO

São produzidos por ano cerca de 6,5 milhões de toneladas de grãos de café em 11 milhões de hectares no mundo. O café é a principal “commodity” em todo o mundo, depois do petróleo, com vendas globais alcançando cerca de noventa bilhões de dólares (AMARAL et al., 2011). O Brasil é o maior produtor mundial com uma safra estimada em 44 milhões de sacas para 2011 (CONAB, 2011). A área total cultivada com café (*C.arabica* e *C.canephora*) está estimada em mais de 2,3 milhões de hectares. Em Minas Gerais está concentrada a maior área com 1 milhão de hectares em produção, detendo 50,2% da produção do país. O Espírito Santo é o segundo maior estado produtor e o principal produtor de *C.canephora*, com 479.798 hectares plantados e uma produção de 26,8%, seguido de São Paulo com 7,7 % e do Paraná com 4,2%, da produção nacional (CONAB, 2011). Além disso, segundo dados da ABIC o Brasil representa 13% de todo o consumo mundial de café ficando atrás somente dos Estados Unidos.

3.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DO CAFEIEIRO

O cafeeiro é uma planta arbustiva, dicotiledônea do gênero *Coffea*, pertencente à família Rubiaceae. Já foram descritas 100 espécies do gênero *Coffea*, mas a produção comercial do café envolve predominantemente duas espécies: *C. arabica* Linnaeus (70% da produção mundial) e *C. canephora* Pierre ex Froehner (30%). A espécie *C. arabica* é a única espécie tetraplóide conhecida do gênero ($2n = 4x = 44$ cromossomos) e autógama; as demais espécies são diplóides ($2n = 2x = 22$ cromossomos) e em sua maioria auto-incompatíveis (CARVALHO et al., 1991).

C. arabica é originária da Etiópia, a partir da hibridização natural entre duas espécies ancestrais diplóides, *C. eugenioides* e *C. canephora* (LASHERMES et al. 1999). No híbrido resultante teria havido uma não redução do número de cromossomos, originando uma nova planta tetraplóide ($2n = 4x = 44$) (ANTONY et al. 2002). A espécie *C. arabica* caracteriza-se por possuir base genética

estreita, resultado da recente origem alotetraplóide e da biologia da reprodução autógama. O café arábica é o de maior aceitação comercial devido a melhor qualidade da bebida (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006).

O desenvolvimento do fruto no gênero *Coffea* se dá entre a antese e o seu amadurecimento total. Sendo que em *C. racemosa* este processo leva de 10 a 12 semanas podendo chegar a mais de um ano em *C. liberica*. Nas espécies de maior importância econômica, *C. arabica* e *C. canephora*, são necessários de 6 a 8 meses e 9 a 11 meses, respectivamente (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006).

O fruto e a semente do cafeeiro são formados a partir de uma dupla fecundação, onde uma fecundação dá origem ao embrião e a outra forma o endosperma. O fruto é classificado como uma drupa de formato ovóide, que pode ser caracterizada como um fruto carnoso, indeiscente, com pericarpo nitidamente diferenciado em exocarpo, mesocarpo e endocarpo (BORÉM et al., 2008). No início do desenvolvimento o fruto apresenta uma coloração verde, passando a vermelho (ou amarelo) com a maturação do fruto. Contém duas sementes em forma elíptica, plano-convexas e que possuem um sulco longitudinal sobre a superfície plana (CAVALARI, 2004), sendo que, o embrião fica localizado próximo a superfície convexa. No fruto maduro, as sementes são envolvidas por uma camada de células esclerenquimatosas e transparentes, o perisperma, conhecida como película prateada (BORÉM et al., 2008).

O crescimento dos frutos de cafeeiro não ocorre de maneira uniforme e isto acarreta na presença de frutos em diferentes estádios de maturação na mesma planta. Sendo que, em *C. arabica* foi observado uma maior tendência à uniformidade dos frutos durante o estágio final de maturação, quando proporções significativas do fruto se encontram no estágio cereja (DE CASTRO et al., 2005).

3.3 FRUTIFICAÇÃO DO CAFEIEIRO

A frutificação do cafeeiro tem início com o processo de pegamento da flor, seguido pelo desenvolvimento do fruto e maturação. Inicialmente há um pequeno crescimento do fruto, seguido por um período de crescimento rápido, até o fruto verde atingir seu tamanho final que corresponde à metade do tamanho do fruto maduro (RENA et al., 1986). O fruto de café é constituído por pericarpo e perisperma

da fecundação até o estágio intermediário do seu desenvolvimento (Figura 1-A e 2), a partir daí o perisperma é gradualmente substituído pelo endosperma, que corresponde a semente verdadeira (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006). No começo do desenvolvimento, o endosperma encontra-se na fase aquosa e ao final da frutificação se torna rígido (Figura 1-B e 2) devido ao acúmulo de proteínas de reserva, sacarose e polissacarídeos. No ultimo estágio da maturação ocorre então à desidratação do endosperma e mudança na coloração do pericarpo (DE CASTRO e 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 e Marraccini, 2006).

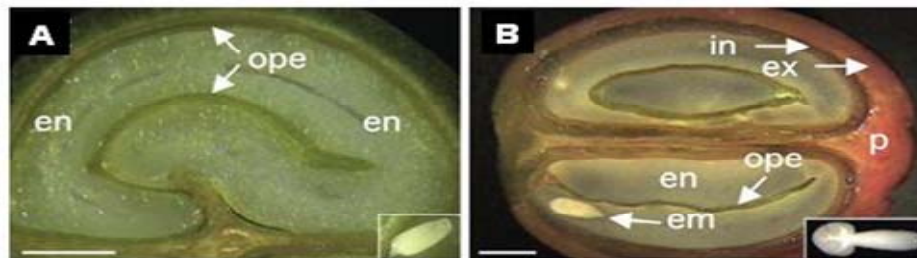
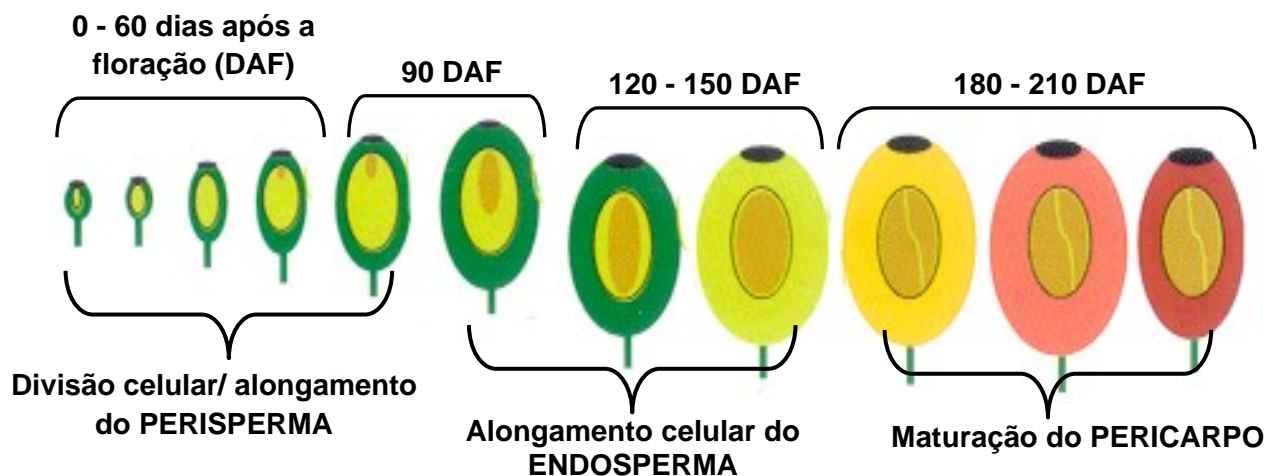


Figura 2– Desenvolvimento e maturação do fruto de *C. arabica*. (De Castro e Marraccini, 2006, adaptado por Budzinski, 2008)



Logo após a fecundação, o nucelo do óvulo se desenvolve no perisperma do café (MENDES, 1942). Segundo De Castro e Marraccini (2006) os estádios iniciais do desenvolvimento do perisperma (0-90 DAF) são marcados por intensa divisão e expansão celular (Figura 2). De acordo com Geromel et al. (2006) há um aumento de massa do perisperma a partir de 50 dias após o florescimento (DAF) com pico máximo em torno de 100 DAF e decréscimo até 200 DAF. Desta forma, o perisperma delimita o espaço que será preenchido pelo endosperma sendo então, o tecido responsável por determinar o tamanho final do grão de café (GEROMEL et al., 2006). Com o amadurecimento do fruto, o perisperma torna-se uma fina película, chamada de película prateada (DEDECCA, 1957).

O endosperma é o tecido de armazenamento que servirá de reserva nutricional para o embrião. De 90 DAF a 150 DAF, ocorre simultaneamente o aumento do perisperma e a histo-diferenciação e crescimento do endosperma e do embrião, nesta fase ocorre intensa atividade mitótica e de expansão. O processo de maturação está completo por volta de 230 DAF (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006).

Desta forma, o fruto maduro é formado pelo perisperma, endosperma e pericarpo. O pericarpo é composto pelo exocarpo, mesocarpo e endocarpo (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006). O exocarpo ou casca corresponde ao tecido mais externo do fruto (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006; BORÉMet al.,2008), e permanece como um tecido de coloração verde durante a maior parte do desenvolvimento do fruto e se constitui em um tecido fotossinteticamente ativo, o que pode ser importante para suprir a demanda necessária de carboidratos, principalmente durante o estágio de preenchimento do grão (VAAST et al., 2006). O mesocarpo ou polpa se constitui, nos tecidos verdes, em um tecido rígido composto por células com parede celular densa e compacta, e com o amadurecimento do fruto forma um tecido coloidal, hialino e mucilaginoso, que é rico em açúcares e pectinas (CARVALHO,1997 apud BORÉMet al.,2008). A estrutura mais interna do pericarpo é o endocarpo ou pergaminho e é formado por três a sete camadas de células esclerenquimatosas (BORÉMet al., 2008).

Quanto a fisiologia do fruto do cafeeiro, Pereira et al.(2005) sugerem que a maturação de frutos de café é climatérica, ou seja, a maturação é acompanhada por um aumento na respiração e na produção de etileno (KARVOLA

et al., 2011). Foi observado que nos frutos verde-cana houve um rápido crescimento na produção de etileno e que esta produção decresce nos frutos cereja (PEREIRA et al., 2005). Outros compostos relacionados a maturação do frutos são ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina (KY et al., 2000).

3.4 EXPANSINAS

As expansinas são 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 expansão celular é impulsionada pela captação de água no vacúolo central. Várias evidências mostram que o fluxo de água dentro da célula e o conseqüente alongamento da célula são iniciados pelo relaxamento induzido por estresse da parede celular. As expansinas são pH dependentes com um pH ótimo em torno de 5 ou inferior (LEE et al., 2001). Assim, a acidificação do meio permite que a célula regule rapidamente a atividade das expansinas por meio de modulações no pH da parede celular (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005, COSGROVE 2005), através do controle da bomba de próton (H^+ -ATPase) na membrana plasmática (COSGROVE, 2005). 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). Aparentemente as expansinas endógenas facilitam o acesso de enzimas hidrolíticas aos polímeros da parede celular (LEE et al., 2001).

As expansinas são uma superfamília de proteínas de plantas composta por quatro famílias: α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), expansina-like A (EXLA) e expansina-like B (EXLB). Destas, apenas as proteínas das EXPA e EXPB já têm demonstrado experimentalmente ação na extensão da parede celular. As outras duas famílias, EXLA e EXLB, são conhecidas até o momento as sequências gênicas, sendo que nenhuma função foi ainda determinada para estas proteínas (SAMPEDRO e COSGROVE, 2005; COSGROVE 2005). A maior família é representada pelas α -expansinas, que pertencem a um grupo de proteínas altamente conservadas, caracterizadas por apresentarem atividade em um pH ótimo em torno de 4. Provavelmente as α -expansinas são responsáveis por

controlar a extensão da parede celular e processos de desenvolvimento incluindo a dissociação e separação da célula (McQUEEN-MANSON, DURACHKO; COSGROVE, 1992; CHO; KENDE, 1997). As β -expansinas, que compõem a segunda maior família, promovem intensa degradação da parede celular dos grãos de pólen (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005); sendo o pH ótimo para estas expansinas caracterizado em torno de 5,5 (LI; JONES; McQUEEN-MASON, 2003). Provavelmente as EXPB estão envolvidas no crescimento e afrouxamento da parede celular que é associada com a invasão de tecidos maternos pelo tubo polínico (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005).

Acredita-se que as expansinas atuem na quebra das ligações não covalentes entre polissacarídeos entreduas paredes celulares (COSGROVE, 2005) extendendo de maneira irreversível a parede celular sem que ocorram modificações estruturais na parede, e alterações na sua plasticidade e elasticidade (YUAN; WU; COSGOVE, 2001).

Choi et al. (2003) investigaram a função da *OsExp4* em plantas de arroz sugerindo que esta expansina pode estar relacionada com o tamanho do grão. Lizana et al., (2010) analisaram a expressão de uma expansina de trigo (*Triticum aestivum* L.) que apresentou transcritos principalmente encontrados no pericarpo durante o início do desenvolvimento do grão e posteriormente em ambos, endosperma e pericarpo, sugerindo também que esta expansina pode estar associada ao tamanho final do grão. A expressão de expansinas em frutos já foi descrita em diversas espécies de plantas como: tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (ROSE, LEE, e BENNET 1997; BRUMMELL, HARPSTER e DUSMUIR 1999; POWELL et al., 2003), morango (*Fragaria X ananassa* Duch.) (CIVELLO et al., 1999; HARRISON, Mc QUEEN e MANNING 2001; DOTTO, MARTINEZ e CIVELLO 2006; FIGUEROA et al., 2009), ameixa (*Prunus armeniaca*) (MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ et al., 2002), pêra (*Pyrus communis*) (HIWASA et al., 2003), pêssego (HAYAMA et al., 2003), banana (TRIVEDI e NATH 2004), figo (OMONDI et al., 2004), uva (ISHIMARU et al., 2007), manga (VIDHU; CHOURASIA e PRAVENDRA, 2005), mamão (*Vasconcellea pubescens*) (GAETE-EASTMAN et al., 2009), framboesa (*Rubus idaeus* L.) (ZHENG e HRAZDINA 2010).

A caracterização de expansinas em cafeeiro foi iniciada por Budzinski et al. (2011), onde a expressão de três isoformas de α - expansinas

(*CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*) foram analisadas em detalhes durante o desenvolvimento de frutos de dois cultivares de *C. arabica* (IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo). Os padrões de transcrição no perisperma (tecido responsável pela definição do tamanho do grão do café) de IAPAR-59 e de IAPAR-59 Graúdo (que possui um maior tamanho de grão) indicam a participação similar de *CaEXPA1* e *CaEXPA3* na regulação do tamanho do grão de café. Além disso, quando realizada a caracterização molecular através de Southern blot, foi observado um padrão diferente de bandas produzidas entre os genes *CaEXPA3* nas cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59-Graúdo (BUDZINSKI et al., 2011). A caracterização do promotor de *CaEXPA1* e *CaEXPA3* poderá fornecer informações importantes quanto a regulação da atividade destas isoformas na cv. IAPAR-59 Graúdo, e verificar seu envolvimento no tamanho dos grãos de café.

Por outro lado, o gene *CaEXPA2* mostrou transcrição específica em pericarpo nos estádios finais de maturação do fruto tanto em *C. arabica* cv. IAPAR-59 como em IAPAR-59 Graúdo. Isto, aliado à ausência de transcritos em perisperma e endosperma, sugere que esta isoforma pode estar envolvida na despolimerização da parede celular e, conseqüentemente, no controle da maturação do pericarpo (BUDZINSKI et al., 2011). Deste modo, seu promotor é um excelente candidato para estudos de controle da maturação dos frutos de cafeeiro. Do ponto de vista do melhoramento genético do cafeeiro, estudos sobre a regulação do gene *CaEXPA2* podem auxiliar a compreender o processo de maturação dos frutos o que implicaria no possível desenvolvimento de plantas com frutos mais uniformes e conseqüentemente, com uma melhor qualidade do café produzido.

3.5 REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA EM EUCARIONTES

3.5.1 Aspectos Gerais

Para que ocorra a produção de uma determinada proteína na célula, é preciso que a partir de um gene se transcreva uma molécula de mRNA (RNA mensageiro) correspondente que será posteriormente traduzida em uma proteína (ALBERTS et al., 2002). Este processo é realizado por um complexo enzimático cuja enzima chave é a RNA polimerase II, composta de várias subunidades e que realiza

a polimerização do RNA a partir de um molde de DNA (ALBERTS et al., 2002). A transcrição é iniciada quando a RNA polimerase II liga-se ao promotor, localizado imediatamente antecedente ao gene. O promotor posiciona o aparato basal no local em que a transcrição deve ser iniciada e a partir deste ponto, a RNA polimerase II move-se ao longo do DNA sintetizando RNA, até chegar a uma seqüência de terminação (LEWIS et al., 2009). Enquanto em eucariontes a transcrição ocorre no núcleo e a tradução no citoplasma, ou seja, são separadas temporal e espacialmente, em procariontes estes processos ocorrem concomitantes (ALBERTS et al., 2002).

3.5.2 Controle Transcricional em Eucariotos

A expressão gênica pode ser regulada em diferentes etapas da via DNA-RNA-Proteína (ALBERTS et al., 2002). Em eucariontes, a regulação da expressão gênica ocorre em diferentes etapas de eventos nucleares e citoplasmáticos (MANIATIS et al., 1987). A transcrição é o primeiro estágio na expressão gênica e a principal etapa na qual esta é regulada (SINGH 1998; LEWIS et al., 2009). O aparelho basal de transcrição precisa reconhecer e se ligar ao promotor para que a transcrição se inicie. O promotor é uma região contendo os sítios de ligação para sustentar a transcrição com eficiência e controle adequado. Ele é capaz de regular apenas os genes aos quais estão fisicamente ligados e sua função é determinada pela sua estrutura que contém os elementos *cis*-regulatórios (LEWIS et al., 2009).

Em eucariotos um único promotor pode ser regulado por um grande número de seqüências regulatórias espalhadas ao longo do DNA, pois proteínas regulatórias podem influenciar o promotor mesmo estando ligadas ao DNA milhares de nucleotídeos distantes dele (ALBERTS et al., 2002). Assim, uma diferença significativa entre a transcrição de mRNA eucarióticos e procarióticos está no fato da iniciação em um promotor eucariótico envolver um grande número de fatores que se ligam a uma variedade de elementos que atuam em *cis* (HOCHHEINER & TIJAN 2003; LEWIS et al., 2009).

Desta forma, a expressão gênica é regulada por elementos *cis*-regulatórios, seqüências de DNA regulatórios, e os elementos *trans*-regulatórios e

proteínas de ligação ao DNA capazes de regular os genes através do reconhecimento e interação com os elementos *cis*-regulatórios (EMERSON; HSIEH; SUNG, 2010).

3.5.3 Elementos Regulatórios

De maneira geral, a regulação transcricional na expressão gênica em eucariotos é mediada pela interação entre os fatores de transcrição (TFs), uma classe de proteínas regulatórias, como os elementos *cis*-regulatórios (HOCHHEIMER & TIJAN 2003; PRIEST, FILICHKIN, MOCKLER, 2009). Os elementos-*cis*, sítios de ligação dos TFs, são os elementos funcionais do DNA, e são eles que influenciam temporal e espacialmente a atividade transcricional. Múltiplos elementos-*cis* formam os módulos *cis*-regulatórios (CRMs), os quais integram sinais de múltiplos TFs resultando em uma alta especificidade no controle da expressão dos genes alvo (PRIEST; FILICHKIN; MOCKLER 2009).

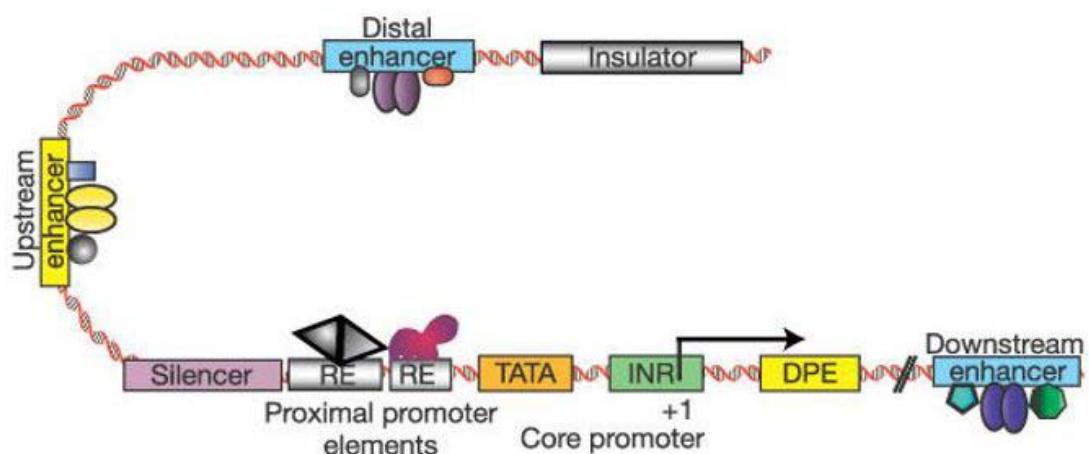
Os elementos *cis*-regulatórios que controlam a atividade transcricional de um gene estão distribuídos ao longo do DNA em região promotora mínima (*core* do promotor), regiões ativadoras (*enhancers*) ou inibidoras (silenciadores) da transcrição, e insuladores (LEVINE & TIJAN, 2003).

O *core* do promotor é compacto e é composto de cerca de 60pb (LEVINE & TIJAN, 2003). Ele é definido como sendo a região do DNA que direciona a iniciação da transcrição pela RNA polimerase II (JUVEN-GERSHON & KADONAGA 2009). Existem vários motivos que podem contribuir para a formação do complexo de iniciação dentre eles estão motivos como TATA box, BREu (elemento de reconhecimento *upstream* TFIIB), Inr (iniciador), MTE (motif elemento dez), DPE (elemento do promotor *downstream*) e XCPE1 (elemento 1 do *core* do promotor X) (SANDELIM et al., 2007; JUVEN-GERSHON & KADONAGA 2009). A transcrição geralmente é iniciada no motivo Inr, sendo o nucleotídeo ATG no consenso Inr é usualmente designado como sendo a posição +1. O TATA Box foi o primeiro motivo de *core* do promotor a ser descoberto (JUVEN-GERSHON & KADONAGA 2009). Geralmente, o TATA-box esta localizado a cerca de -30 pares de bases (pb) do ponto +1, e elementos promotores proximais estão localizados

entre -100 (CCAAT-box) e -200 pb (GC-box) deste ponto (STEPHEN & JAMES, 2003; JUVEN-GERSHON & KADONAGA 2009).

As regiões regulatórias (ativadores ou silenciadores) podem estar localizadas próximas ou distantes do gene, em regiões 5' e 3' regulatórias ou dentro de íntrons. Uma típica região regulatória tem cerca de 500pb e contém cerca de 10 sítios de ligação para pelo menos 3 ativadores ou repressores diferentes. Existem também os insuladores que previnem que regiões regulatórias atuem sobre promotores de genes vizinhos (LEVINE & TIJAN, 2003).

Figura 3– Regiões regulatórias de eucariontes. Promotor contendo o elemento iniciador (Inr), o TATAbox, DPE (elemento do promotor *downstream*), insulador e regiões regulatórias silenciadoras e ativadoras (silencer e enhancer). Adaptado de Adams (2008).



Existem diversos tipos de promotores, enquanto alguns podem conferir uma expressão constitutiva ao gene, outros permitem uma expressão órgão-específica ou ter sua expressão induzida pelo meio ambiente (OWet al., 1987). Os elementos *cis*-regulatórios são ferramentas chave no processo de transcrição e são responsáveis pelo padrão de expressão dos genes sobre determinado estímulo, tratamento ou condições ambientais (PRIEST, FILICHKIN, MOCKLER, 2009) e por isto estudos destas regiões regulatórias são de grande importância.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES PROMOTORAS EM PLANTAS CULTIVADAS

Em plantas diferentes seqüências regulatórias que conferem diversos padrões de expressão foram identificadas e clonadas, permitindo construções de vetores para que a expressão de um gene de interesse seja regulada de maneira desejável, por exemplo, em plantas geneticamente modificadas.

O promotor mais utilizado para expressão de genes exógenos (transgenes) em plantas dicotiledôneas é o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (OWet al., 1987). O promotor CaMV 35S promove uma forte expressão na maioria das dicotiledôneas (FROMM et al., 1985). Entretanto para o desenvolvimento de plantas transgênicas com características especializadas, tais como maior tamanho de grão ou diferenças na composição química do grão, a utilização de promotores constitutivos não garante expressão espacial e temporal adequada (NEUTEBOOM et al., 2002; PETRASOVITS et al., 2007).

Alguns promotores de expansinas já foram descritos na literatura. Lee, Choi e Kende (2001) caracterizaram um promotor de expansina de arroz. Em *Arabidopsis* Cho e Cosgrove (2002) descreveram um promotor de expansina (*AtExp7*) raiz- específico. Karaaslan e Hrazdina (2010) descreveram um promotor fruto-específico em cereja (*Prunus cerasus L.*). Em trabalho recente, Sun, Zhang e Chai (2011) clonaram e caracterizaram a região promotora da *BjEXPA1* de mostarda (*Brassica juncea L.*) para tentar entender o padrão de expressão desta expansina sob estresse de metal pesado. Stalker et al., (2003) patentearam um promotor de expansina expresso em fibra de algodão e Ro et al., (2002) patentearam um promotor fruto específico de tomate.

Até o momento poucos estudos foram realizados em promotores de cafeeiro, Marraccini et al., (1999) isolaram o primeiro promotor relacionado com frutos e sementes a partir de genes de proteína de reserva 11S globulina. Outro exemplo de promotor clonado em café é o promotor da proteína de reserva 11S legumina (ACUÑA et al., 1999). Satyanarayana et al. (2005) clonaram a seqüência promotora do gene que codifica uma N-metiltransferase, proteína essencial na síntese de cafeína em plantas de café. Também já foram descritos mais dois promotores para frutos e sementes do cafeeiro, relacionados com os genes de

Dehidrina e Oleosina (HINNIGER et al., 2006). Recentemente, Brandalise (2009) descreveu a clonagem e caracterização de dois promotores específicos para raiz e folha de café, utilizando os dados gerados pelo Projeto Genoma Café. Também em 2009 foi descrito a clonagem e caracterização de quatro regiões promotoras no cafeeiro sendo um constitutivo *CaGAPDH*, um específico de fruto *CaAN2* (*anthocyanin2*), e dois correspondentes a genes induzidos mediante a presença de agentes patogênicos *CaPR1* e *CaNPR1* (*basic form of pathogenesis-related protein1* e *nonexpressor of PR genes*) (CAVALLARI 2009).

Similarmente, Salgado (2009) isolou e caracterizou um promotor de um gene para uma proteína de transferência de lipídeos (LTP) de *Coffea racemosa*, com especificidade para endosperma de frutos de café.

A transformação genética de cafeeiros para estudos de promotores é passível e importante de ser realizada, mas demanda um tempo prolongado para o processo de transformação (RIBAS et al., 2005, 2006, 2011), sem contar o tempo para frutificação do cafeeiro de três anos. Portanto a maioria dos trabalhos para análise de promotores de cafeeiro utiliza plantas modelo para os testes iniciais. Neste contexto se destaca o tomate (*Solanum lycopersicum*), pertencente à família das Solanaceae, que tem afinidades taxonômicas e genéticas com o cafeeiro, incluindo a produção de frutos carnosos e conteúdo similar do genoma (C= 950 e 640 Mb para tomate e cafeeiro, respectivamente) (VAN DER HOEVEN et al., 2002), número básico de cromossomos similar (x= 12 para tomate e x=11 para cafeeiro) e arquitetura cromossômica similar com cromossomos pericêntricos altamente condensados e heterocromatina e eucromatina descondensada durante a fase de paquíteno na meiose (RICK 1971; PINTO-MAGLIO e CRUZ 1998). Outra vantagem da utilização do tomateiro como modelo é a introdução da cultivar miniatura Micro-Tom (MT) que apresenta diversos recursos favoráveis como o tamanho reduzido (15-20 cm), ciclo rápido de vida (70-90 dias) e fácil transformação (PINO-NUNES 2009).

4 ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA PLANT CELL REPORT- SPRINGER

CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA EXPANSINA DE *C. ARABICA*

ABSTRACT: The maturation of coffee fruits is a physiological and biochemical process that changes color, flavor, aroma and texture. These processes involve the expression of different enzymes and proteins such as expansins, responsible for promoting the cell wall expansion. The characterization of expression pattern of expansions (*CaEXP1*, *CaEXP2*, *CaEXP3*) in different fruit tissues in coffee aroused the interest in the promoter region of these genes. Thus, this study aimed to clone the promoter regions of genes, *CaExp1*, *CaExp2* and *CaExp3* in two cultivars of *C. arabica*: IAPAR 59 and 59 IAPAR Graúdo; to compare *in silico* these promoter regions and to validate the function of the promoter (*ProCaExp2*). *In silico* analysis of the promoters revealed the presence of motifs responsive to light in the four promoters and growth regulators such as ethylene and auxin in *ProCaEXP2* and ABA, brassinosteroids and GA in *ProCaEXP1* and *ProCaEXP3*. The expression of gene *GUSA* demonstrated that the *ProCaEXP2* drives the gene expression to the endosperm before the beginning of maturation and for the endosperm and pericarp during maturation of the fruit. The availability of specific promoters is an important biotechnological tool to direct the expression of genes for fruit without interfering with other metabolic processes of plants.

Keywords: α -expansins. Fruit development. Maturation. Promoter. *C. arabica*

4.1 INTRODUÇÃO

O café é uma das principais “commodities” mundiais, com vendas globais alcançando cerca de noventa bilhões de dólares (AMARAL et al., 2011). Apesar de já terem sido descritas 100 espécies no gênero *Coffea*, a produção comercial do café envolve predominantemente duas espécies: *C. arabica* Linnaeus (70% da produção mundial) e *C. canephora* Pierre ex Froehner (30%).

A não uniformidade no crescimento dos frutos de cafeeiro acarreta a presença de frutos em diferentes estágios de maturação na mesma planta. Esta maturação desuniforme vem sendo associada à qualidade da bebida do café (PEREIRA et al., 2005). 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 maneira de minimizar este problema é a utilização de plantas de café com desenvolvimento e maturação

uniforme dos frutos. Portanto, o entendimento desse processo de maturação nos seus diversos níveis é fundamental para o desenvolvimento de estratégias visando melhorar a qualidade dos cafés.

Eventos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem durante a maturação alteram cor, sabor aroma e textura dos frutos, e envolvem a expressão de diferentes enzimas e proteínas relacionadas com o alongamento, relaxamento e expansão da parede celular e despolimerização das pectinas. A clonagem e manipulação dos genes envolvidos nas fases de desenvolvimento e maturação possibilitam retardar ou até mesmo inibir esses processos fisiológicos, principalmente em frutos climatéricos (PEREIRA et al., 2005). Em cafeeiro, duas isoformas de α -expansinas (EXPA) (*CaEXP1* e *CaEXP3*), com alta expressão em perisperma apresentam padrão de transcrição distintos em duas cultivares de *C. arabica*, IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo (cultivar com tamanho maior de grão), sugerindo a relação destes genes com a definição do tamanho do grão do café (BUDZINSKI et al. 2011). Além disso uma terceira isoforma de EXP, *CaEXP2*, apresenta padrão de transcrição específico 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, na maturação do pericarpo (BUDZINSKI et al. 2011).

Portanto, a alta expressão destas isoformas em tecidos distintos do fruto despertou o interesse na caracterização da região promotora das três isoformas em *C. arabica*, além da comparação dessas seqüências regulatórias nas cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59-Graúdo.

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), folhas (PIEN et al., 2001; MULLER et al., 2007). Em frutos, foi observada atividade de genes de expansinas em processos de desenvolvimento e maturação (ROSE, LEE, e BENNET 1997; BRUMMELL, HARPSTER e DUSMUIR 1999; POWELL et al., 2003; CHOI et al., 2003; BUDZINSKI et al. 2011) Promotores de expansinas tanto relacionados ao desenvolvimento e maturação de frutos em arroz (LEE, CHOI e KENDE 2001), cereja (*Prunus cerasus L.*) (KARAASLAN e HRAZDINA 2010) e tomate (RO et al.

2002), como em outros processos de desenvolvimento foram descritos (CHO e COSGROVE 2002; STALKER et al., 2003; SUN, ZHANG e CHAI 2011).

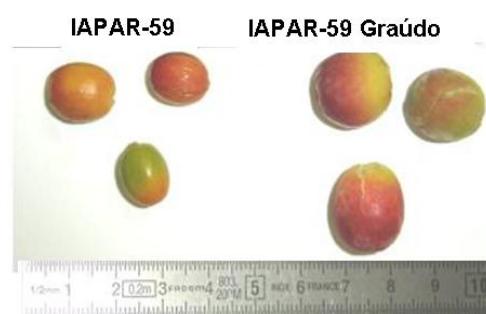
Portanto, a identificação dos promotores de expansinas de cafeeiro com atividades relacionadas aos estágios de desenvolvimento dos frutos poderá ser importante em trabalhos de transformação genética do cafeeiro, tanto com relação à produção de plantas transgênicas, como para auxiliar na compreensão dos fatores genéticos e fisiológicos relacionados à formação do grão e maturação do fruto. Neste trabalho, foi realizada a clonagem e caracterização da região promotora de três genes de α -expansinas (EXPA), envolvidos em estágios de desenvolvimento e maturação de frutos do cafeeiro, *CaExp 1* (GenBank: GQ434001), *CaExp2* (GenBank:GQ434002) e *CaExp3* (GenBank:GQ434003). Também foi realizada a transformação da planta modelo (*Solanum lycopersicum* cv. MicroTom) com vetor de transformação contendo o promotor de *CaExp2* fusionado com o gene *GUSA*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material Vegetal

Plantas de café da espécie *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 e cv. IAPAR-59 Graúdo (Figura 4) do Instituto Agrônomo do Paraná foram utilizadas para clonagem dos promotores. Foram coletadas cerca de cinco folhas de cada cultivar, e maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino, para posterior armazenamento em -80° C, até extração de DNA genômico.

Figura 4– Frutos de *C. arabica* cv. IAPAR-59 e IAPAR-59 Graúdo (BUDZINSKI et al., 2011).



4.2.2 Extração de DNA Genômico

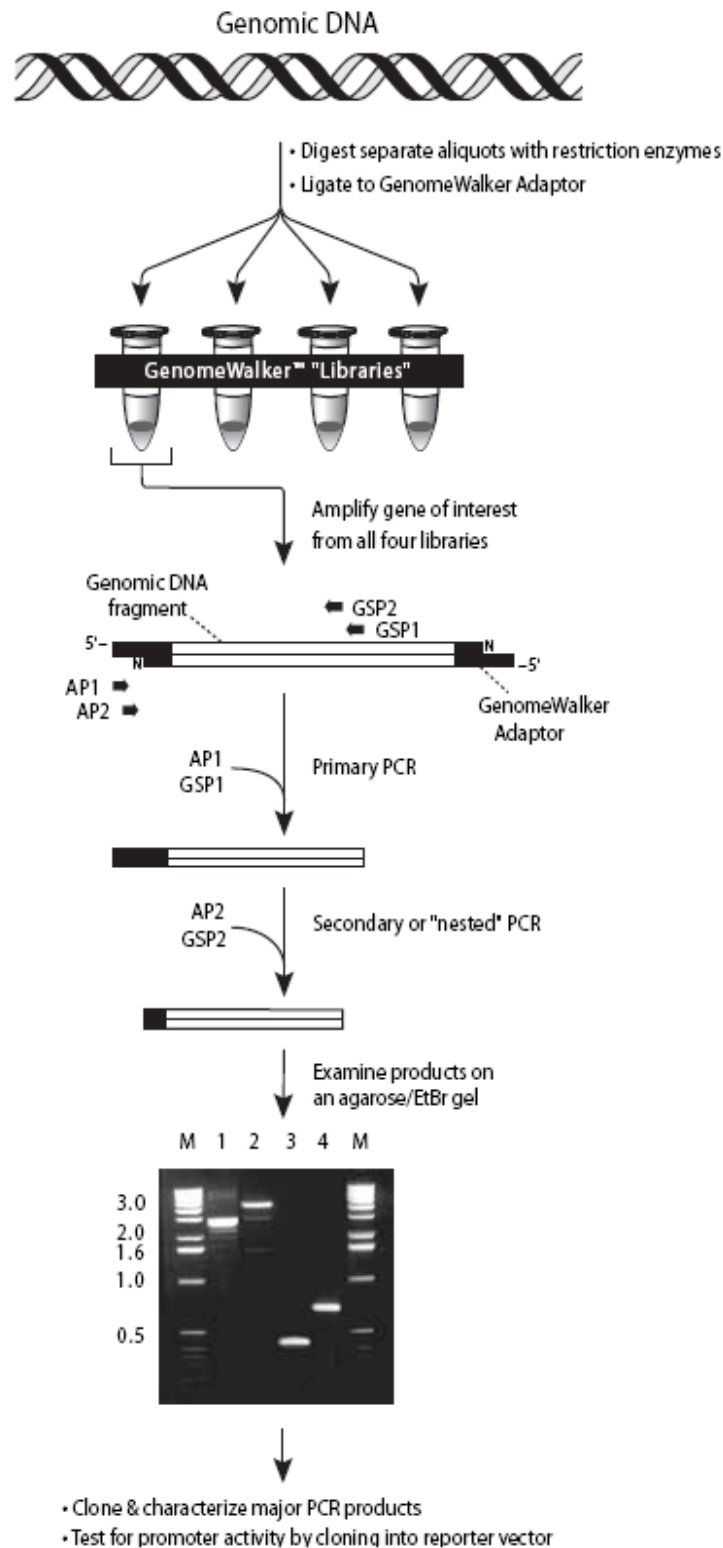
A extração de DNA genômico foi baseada no protocolo descrito por Doyle & Doyle, 1987. Cerca de 3g de folhas maceradas em nitrogênio líquido foram utilizadas para extração com 20 ml de tampão de extração CTAB contendo 0,4 mL de β -mercaptoetanol e 0,4 de metabissulfito de sódio 10%, e colocados em banho Maria a 65°C por 20 minutos. A seguir o material foi centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi retirado e adicionado 1X o volume de clorofórmio e centrifugado novamente nas mesmas condições. A fase superior foi recolhida e novamente foi colocado 1X volume de clorofórmio e centrifugado. A fase superior foi retirada e sendo acrescentado de isopropanol 0,6X do volume. O material foi precipitado a -20°C overnight. Após a precipitação, foram centrifugados por 30 minutos a 4°C 7500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspense em 1mL de água milli-Q autoclavada, contendo 200 μ l de RNaseA- 10mg/ml seguido de incubação por 1 hora a 37°C. Depois foi adicionado 1 volume de fenol clorofórmio e centrifugado a 7500 rpm, 5 minutos em temperatura ambiente. A fase superior foi coletada, adicionada 1X o volume de clorofórmio e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Após retirar a fase superior o material foi precipitado com acetato de sódio 3M pH 5,2 (10% do volume retirado) e 2X o volume de etanol 100%. A precipitação foi realizada a -20°C overnight e centrifugado por 30 minutos a 4°C 7500 rpm, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a secagem do DNA adicionou-se de 0,1mL TE (1:10).

4.2.3 Construção de Bibliotecas Genome Walker™

O Kit GenomeWalker™ proporciona um método de amplificar regiões não conhecidas flanqueada por regiões de seqüências conhecidas. Para construção das bibliotecas foi realizada a digestão do DNA genômico com quatro enzimas de restrição de terminal abrupto (*EcoRV*, *DraI*, *SspI* e *PvuII*). Os fragmentos do DNA digerido foram ligados a adaptadores específicos, resultando quatro bibliotecas de *C.arabica* cv. IAPAR-59 e 4 bibliotecas *C.arabica* cv. IAPAR-59 Graúdo. Para a construção da biblioteca foi utilizada 2,5 μ g de DNA genômico, 10 U

da enzima de restrição, 10µl do tampão específico para a enzima e 57µl de água miliQ autoclavada. Depois de digerido o DNA foi purificado por fenol-clorofórmio onde se adicionou em cada tubo 95µl de fenol-clorofórmio proporção 1:1 então as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase superior foi coletada e depois de adicionado 1X volume de clorofórmio foi submetida à centrifugação nas mesmas condições anteriores. Após retirar a fase superior o material foi precipitado com acetato de sódio 3M pH 5,2 (10% do volume retirado) e 2X volume de etanol 100%. A precipitação foi realizada a -20°C por 16 horas e o DNA foi centrifugado por 30 minutos a 4°C 7500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a secagem do DNA adicionou-se de 10 µl de água miliQ autoclavada. A ligação dos adaptadores foi feita utilizando 4 µl do DNA digerido e purificado, 1,9 µl dos adaptadores fornecidos pelo Kit GenomeWalker™, 1,6 µl de Tampão fornecidos pelo Kit GenomeWalker™, 6U de T4 DNA ligase e incubado a 16°C por 16 horas seguido de uma incubação a 70° por 5 minutos para inativar a enzima. Após inativada a enzima foi adicionado 72µl de água miliQ autoclavada. Os adaptadores servem de sítio de anelamento para *primers* específicos, que juntamente com *primers* específicos do gene, passaram por dois ciclos de amplificação para clonagem da região de interesse. Para a ligação dos adaptadores foram utilizados 4 µl do DNA digerido e purificado. O esquema da metodologia utilizada para a obtenção da sequência do promotor está representado na figura 5.

Figura 5– Etapas da metodologia utilizada para a obtenção das regiões promotoras dos genes de interesse. Fonte: *BD GenomeWalker™ Universal Kit User Manual* (2004).



4.2.4 Obtenção das Sequências Promotoras de Interesse

A região promotora dos genes de interesse foi isolada utilizando-se duas etapas de PCR por biblioteca. A amplificação da PCR primária usou o *primer* adaptador (AP1) (5'GTAATACGACTCACTATAGGGC3') fornecido pelo kit e presente na sequência do adaptador *GenomeWalker* e outro *primer* do gene específico (GSP1, Tabela 1). A reação de amplificação foi realizada segundo indicações do fabricante utilizando ciclo inicial sendo realizado um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C e 3 minutos a 72°C, seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 4 minutos.

A reação da PCR foi constituída por 1 µL de DNA de cada biblioteca, onde foram adicionados (concentração final): GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix 2X (GoTaq® Hot Start DNA Polymerase, 2X Colorless GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP e 4mM MgCl₂) e 0,5 µM de cada oligo (AP1 e GSP1). O volume final da reação foi de 20 µl, o qual foi obtido adicionando-se água deionizada autoclavada.

O produto primário da PCR foi diluído na proporção 1:50 e usado como alvo para uma amplificação secundária ou *nested* PCR. Para cada reação foi utilizado 1µL de DNA da 1° reação diluída, 0,5 µM do *primer* adaptador (AP2)(5'ACTATAGGGCACGCGTGGT3')e0,5 µMdo *primer* gene-específico (GSP2, Tabela 1). A reação de amplificação foi realizada utilizando ciclo inicial sendo realizado seguido de 7 ciclos de desnaturação a 94°C por 25 segundos, 72° C por 4 minutos, seguido de 32 ciclos de 25 segundos a 94°C, 4 minutos a 67°C e extensão final por7 minutos a 67°C.Cada fragmento de DNA, que começa na sequência conhecida na posição 5' do GSP2 e estendida até a região não conhecida adjacente do DNA foi clonada e posteriormente analisada.

Os primers gene-específicos (GSP1 e 2) foram desenhados pelo programa PRIMER DESIGN 2.0, a partir da sequência nucleotídica dos genes previamente caracterizados (BUDZINSKI et al., 2011).

Tabela 1– Oligos gene-específicos utilizados para a amplificação da região promotora dos genes de interesse.

Gene	GSP1	GSP2
CaEXPA1	5' TGCCACCCTCCATAGTCCCCAAAAGCT 3'	5' AGAGGAGATGAGGAGGAGGAGAACGCC 3'
CaEXPA2	5' TGCCACCCTCCATAGTCCCCAAAAGCT 3'	5' AGGGGCGAGAGAAAGAGGGGGAAACGA 3'
CaEXPA3	5' AGGTGTGGAAGTGAAGGGAGCAGCGT 3'	5' GCCATCATTATCAGGCACCGACCGGCA 3'

4.2.5 Clonagem dos Fragmentos

Os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor PCR 2.1–TOPO® cloning, (Invitrogen™, Life Technologies) seguindo as indicações do fabricante para sequenciamento e caracterização *in silico*. Para a transformação foram usadas células competentes de *E. coli* estirpe DH10B preparadas para transformação via eletroporação. As amostras foram plaqueadas em meio LB sólido (SAMBROOK et al., 1989), contendo X-Gal e agente seletivo canamicina (30 µg/L) e incubadas a 37° C durante 18 horas, sendo as colônias bacterianas brancas transformadas selecionadas para análise. As colônias brancas selecionadas foram crescidas em meio LB (SAMBROOK et al., 1989) contendo canamicina (30 µg/L) e incubadas a 37° C e 200 rpm de rotação durante 18 horas. Depois de crescidos os clones foram submetidos à extração de plasmídeo por lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Foi realizada então uma reação de digestão com enzima *EcoRI* para verificar se os clones continham o inserto. Os plasmídeos foram analisados via padrão de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (3U) e 200ng de plasmídeo realizadas a 37°C na presença de tampão de reação 1X e água milliQ autoclavada. O padrão de digestão foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

A utilização do Kit *Genome Walker*™ possibilita a obtenção de fragmentos de diferentes tamanhos do mesmo promotor devido à utilização de diferentes enzimas. Desta forma, os diferentes tamanhos obtidos das três isoformas de expansinas estudadas das cvs. IAPAR 59 e IAPAR 59-Graúdo: *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3* foram clonados.

Os clones que apresentaram o inserto foram replicados em meio LB (SAMBROOK et al., 1989) contendo canamicina (30µg/L) e 10% de glicerol para

placas de 96 poços onde foram crescidas a 37°C por 18 horas e fechadas com adesivo selador e mantidas em freezer -80°C para estoque.

4.2.6 Sequenciamento dos Fragmentos Obtidos

Após a confirmação da clonagem, os fragmentos de diferentes tamanhos foram submetidos aos procedimentos de sequenciamento no sequenciador ABI PRISM™ 3130 da Applied Biosystem. As amostras de DNA utilizadas foram provenientes de extrações de DNA plasmidial em pequena escala por lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989) e as reações foram preparadas utilizando o Kit Big Dye Terminator seguindo indicações do fabricante e utilizando o 5µM do primer universal M13.

Para denominação dos promotores utilizamos o prefixo Pro seguido da denominação do gene regulado, sem italização, de acordo com indicação do Molecular Plant Journal (http://www.oxfordjournals.org/our_journals/mplant/for_authors/nomenclature_and_terminology.html)

4.2.7 Análise das Sequências e Comparação Genômica *in silico* Entre Dois Cultivares de Café

A fim de identificar o promotor de ambos os haplótipos em *C. arabica*, foram analisados as sequências de 10 clones de cada promotor utilizando o programa CLC (Main Workbench 4.1.1). Após esta etapa foram feitas as análises das sequências visando a buscas de regiões regulatórias e a comparação genômica entre os promotores das diferentes cultivares utilizando o programa CLC (Main Workbench 4.1.1) e os seguintes bancos de dados:

PLACE (HIGO et al., 1999) –

<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>

RegSite - <http://softberry.com>

MatInspector (CARTHARIUS et al., 2005) –
<http://www.genomatix.de/matinspector.html>

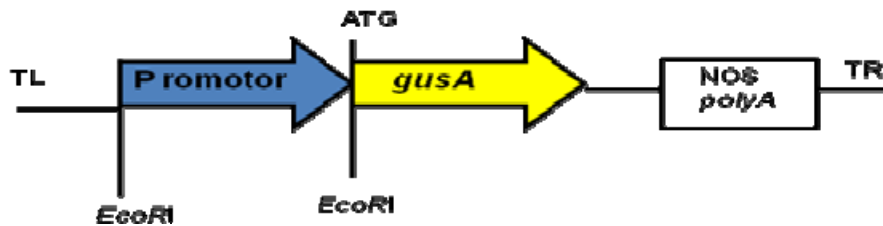
PlantCare (LESCOT et al., 2002) –
<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

4.2.8 Construções de Vetores de Expressão

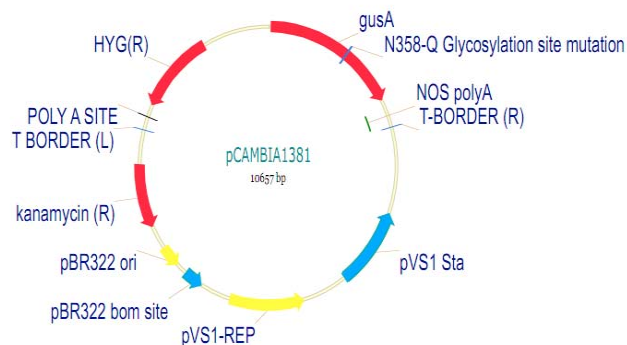
Os promotores clonados da *CaEXPA2* foram inseridos no vetor pCambia 1381 (Figura 6) que permite a fusão do promotor de interesse ao gene repórter *gusA*, codificador da proteína β -glucuronidase. Para isto, foram utilizados procedimentos padrões de clonagem (SAMBROOK et al., 1989). Foram feitas três construções com a sequência regulatória de *CaEXPA2* de diferentes tamanhos, 1000pb, 600pb e 300pb.

Figura 6– Construções gênicas empregadas. A) Estrutura do cassete de transformação utilizados para a análise funcional do promotor B) Mapa de restrição do vetor binário pCAMBIA 1381 contendo o gene repórter GUSA (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/2053/>)

A)

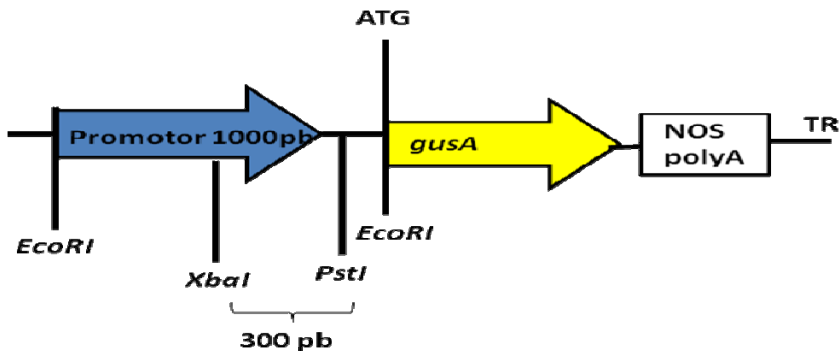


B)



Para inserção dos promotores putativos no vetor, ambos foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (3U) como descrito anteriormente utilizando 10µg de DNA. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X corado com brometo de etídeo 0,1% (v/v). Os fragmentos correspondentes aos promotores putativos foram cortados do gel e mantidos em freezer -80°C por 2 horas. Os fragmentos foram eluidos do gel através de centrifugação a 13 000 rpm por 15 minutos, onde após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e precipitado com 10% de acetato de sódio 3M pH 5,2 (v/v) e 2X volume de etanol 100%. A precipitação foi realizada a -20°C overnight e centrifugado por 30 minutos a 4°C 7500 rpm, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a secagem do DNA adicionou-se 10µL de água miliQ autoclavada. Para ligação dos fragmentos no vetor pCambia 1381 foi utilizado 100ng de vetor, 50 ng do inserto, 3 u de T4 DNA ligase e 1µL do Ligase 10X Buffer (10mM Tris-HCl (pH 7,4), 50mM KCl, 1mM DDT, 0,1mM EDTA e 50% de glicerol) e a reação foi incubada por 4 horas em temperatura ambiente. Em seguida foram utilizados 2 µL de cada ligação para a transformação com células competentes de *E. coli* estirpe DH10B preparadas para transformação via eletroporação (SAMBROOK et al., 1989). As amostras foram plaqueadas em meio LB sólido (SAMBROOK et al., 1989), contendo canamicina (100µg/mL) e incubadas a 37°C durante 18 horas. As colônias que cresceram foram selecionadas, extraído o plasmídeo e digeridos com enzima de restrição *EcoRI* seguindo o protocolo descrito anteriormente para verificar a presença do inserto. A sequência do promotor putativo foi analisada utilizando o programa CLC (Main Workbench 4.1.1) a fim de identificar presença de sítios de restrição no fragmento. Baseado nesta análise é possível, através da digestão com enzimas específicas, saber por meio do tamanho do fragmento digerido a posição do promotor no vetor (Figura 7). Para verificar se o promotor putativo foi inserido na posição correta no vetor, os clones que apresentavam o inserto foram digeridos com as enzimas *PstI* e *XbaI* para verificar o tamanho do fragmento digerido.

Figura 7– Construção gênica mostrando os sítios de digestão e o tamanho do fragmento esperado de fragmento referente à posição correta do promotor.



4.2.9 Inserção dos Vetores em *Agrobacterium tumefaciens*

Para o preparo de células competentes para transformação por choque térmico, uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105) foi isolada da cultura e crescida em meio de cultura YEB líquido com rifampicina 20µg/mL e incubado a 28°C com agitação de 150rpm por 16 horas. Transferida 2 mL da cultura para 50 mL de meio YEB em erlenmeyer de 250 mL e incubada a 28°C com agitação de 150 rpm por 16 horas. Atingida a O.D. necessária ($A_{600} = 0,6$) a cultura foi incubada no gelo por 15 minutos. As bactérias foram transferidas para um tubo de centrifuga de 50 mL e foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas delicadamente as células em 1 mL de CaCl_2 20mM previamente resfriado a 4°C. A suspensão de células foi alíquotada a 0,1 mL.

Foi adicionado então, 1µg de DNA plasmidial por alíquota, misturado delicadamente e deixado no gelo por 30 minutos. As células foram incubadas em nitrogênio líquido até solidificação e transferidas imediatamente para 37°C por 5 minutos. Foi adicionado 1 mL de YEB, homogeneizado e incubado a 28°C por 2 horas. 100µL da suspensão foram plaqueadas em YEB sólido com 20µg/mL de rifampicina e 100µg/mL de canamicina e incubadas a 28°C por 48 horas.

4.2.10 Transformação de *Solanum lycopersicum* cv. Microtom

A construção contendo a sequências regulatórias de 1000 pb de Pro CaEXPA2, fusionadas ao gene repórter *gusA* foi utilizada para experimentos de análise funcional, através de transformação de planta modelo tomate, *Solanum lycopersicum* cv. Microtom. A transformação foi realizada via *A. tumefaciens* utilizando cotilédones germinados *in vitro* de acordo com protocolos descritos (PINO-NUNES et al., 2009 modificado). Sementes de *Solanum lycopersicum* cv. Microtom foram esterilizadas com uma solução 30% de hipoclorito de sódio mais duas gotas de detergente por 15 minutos, seguido de lavagens com água estéril para retirar o excesso da solução. As sementes foram germinadas em uma meio contendo metade da concentração dos macro e micros nutrientes do meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) metade da concentração das vitaminas do meio B5 (GAMBORG et al. 1968), 15g/L de sacarose solidificados com 8g/L de ágar. O pH foi ajustado com KOH 1M para 5,8 antes de autoclavado. Aproximadamente 20 sementes foram colocadas por caixas de cultura magenta™ contendo 50 mL de meio. As culturas foram incubadas a 25°C +/- 1°C sob condições de 16 horas de fotoperíodo por cerca de 10 dias. Os cotilédones foram isolados e as pontas distais e proximais foram removidas e o cotilédone foi dividido em dois explantes. Os explantes foram colocados com a parte abaxial em contato com o meio MS solidificado com ágar 8 g/L suplementado com 100µM de acetoserigona (AS), imediatamente após isolamento, totalizando 100 explantes por tratamento (20 explantes por placa de Petri). Em seguida os explantes foram inoculados com 10µL da suspensão de *A. tumefaciens* 0,4 DO₆₀₀ ressuspensa em MS líquido contendo 1% de AS (v/v). As placas foram incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente. O excesso da suspensão bacteriana foi removido com auxílio de papel filtro estéril. Os explantes foram co-cultivados com *A. tumefaciens* no escuro a 28°C durante 48 horas. Em seguida, os explantes foram então transferidos para 50 ml de meio de regeneração (meio MS suplementado com 150 mg/L Timetina, 1,09 mg/L Zeatina e 5 mg/L Higromicina) e cultivados em fotoperíodo de 16 horas a 25°C +/- 1°C por 3 semanas. Após esse período os explantes foram repicados a cada 10 dias nas mesmas condições descritas acima.

Os brotos regenerados com cerca de 5 mm foram separadas dos explantes e transferidas para frascos magenta contendo meio de alongamento (meio MS suplementado com 150 mg/L Timetina) para o desenvolvimento da parte aérea. Após 4 semanas as plantas que não desenvolveram raiz foram transferidas para frascos magenta contendo meio MS suplementado com 5 mg/L de ácido indolacético (AIA).

4.2.11 Análise Histoquímica

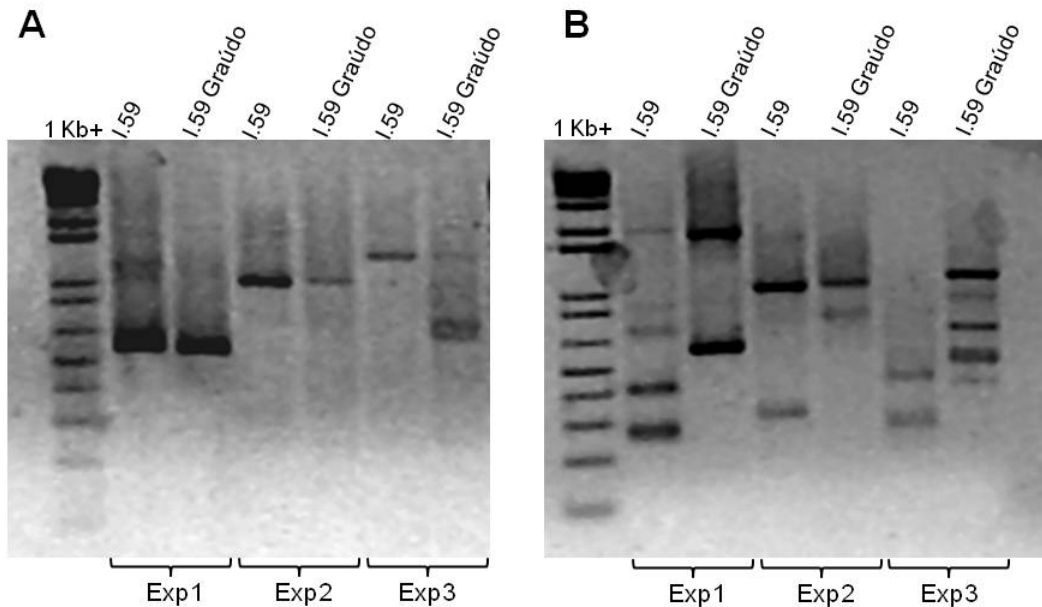
As plantas transformadas foram analisadas histoquimicamente para detectar a atividade do gene *gusA* (JEFFERSON 1987). Amostras de frutos, flores e folhas foram incubados em tampão de reação (McCABE et al., 1988) contendo 100 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,5 Mm de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 10 mM de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1% Triton X-100 e 1mM, de X-Gluc suficiente para cobrir os tecidos. As amostras foram incubadas a 37°C no escuro por 16 horas. Para interromper a reação e retirar a clorofila foi adicionado etanol 70% e após 24 horas as amostras foram lavadas com água destilada e transferidas para solução de glicerol 50% para conservação.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Isolamento e Clonagem da Região Promotora

Para a obtenção da região promotora das expansinas foi utilizado o kit Universal Genome Walker (Clontech). O DNA genômico de café apresentou melhor padrão de digestão quando digerido com as enzimas *DraI* e *EcoRV*. Desta forma os adaptadores foram ligados nasduas bibliotecas para a cultivar *C. arabica* I.59 e para a *C. arabica* I.59 cv. Graúdo. As amplificações foram realizadas para os promotores de *CaExp1*, *CaExp2* e *CaExp3* tanto para a cultivar IAPAR 59 como para IAPAR 59 graúdo. Depois de realizado a 2° PCR foram obtidos fragmentos de diferentes tamanhos para todos os genes (Figura 8 e Tabela 2).

Figura 8– Fragmentos dos promotores dos genes de expansina de *C. arabica* Iapar 59 e *C. arabica* Iapar 59 cv. Graúdo obtidos utilizando o kit Universal Genome Walker (Clontech)TM: A) Amplificação da biblioteca *EcoRV*; B) Amplificação da biblioteca *DraI*.



Os produtos da 2^o PCR foram clonados em vetor TOPO® TA e inseridos em *E.coli* DH10B por eletroporação. Para cultivar IAPAR 59 foram obtidos fragmentos de diferentes tamanhos (cerca de 300pb, 600pb e 1000pb) para o ProCaExp1e com cerca de 1000pb para o ProCaExp2. Para a cultivar Graúdo foram obtidos fragmentos com cerca de 300pb e 600pb para o ProCaExp1e de cerca de 1000pb para o ProCaExp2. A fim de melhor analisar o ProCaExp2 da cultivar *C. arabica* IAPAR 59 foram feitos primers específicosos quais permitiram a obtenção de fragmentos de 600pb e 300pb. Para ProCaExp3foram obtidos fragmentos de 300 e 1000 pb para os cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59 graúdo respectivamente.

Tabela 2– Número de clones e tamanho em pb dos promotores dos genes de expansina e das diferentes cultivares de *C. arabica* analisadas

Promotor Putativo	Nº de Clones	Nº clones Sequenciados	Tamanho Clonado (Aproximado)	Maior fragmento Sequenciado
CaEXPA1 Iapar.59	35	8	300pb 600pb 1000pb	580pb
CaEXPA1 I. 59 Graúdo	15	10	300pb 600pb 880pb	880pb
CaEXPA2 Iapar.59	21	20	300pb 600pb 1081pb	1081pb
CaEXPA2 I.59 Graúdo	10	9	1081pb	1081pb
CaEXPA3 Iapar.59	2	1	300pb	300pb
CaEXPA3 I.59 Graúdo	28	1	600pb 1000pb	1000pb

4.3.2 Análise in silico dos Promotores

Como o *C. arabica* é uma espécie alotetraploide, pelo menos dez clones de cada promotor foram seqüenciados e analisados para verificar a possível amplificação de diferentes haplótipos. Entretanto os promotores dos diferentes clones de um mesmo fragmento não apresentaram diferenças.

Através do alinhamento das seqüências do ProCaExp2foi possível verificar que os promotores das cvsIAPAR 59 e IAPAR 59 cv. Graúdo são idênticos. Entretanto, a análise por alinhamento das seqüências do ProCaExp1 das duas cultivares demonstrou diferenças como observado na Figura 9. O ProCaExp1 da cv. Graúdo apresenta uma inserção na região próxima a -150 e uma deleção na região -300; além de diferenças nas seqüências de bases principalmente entre as regiões -350 e -150 (Figura 9). COLOCAR MOTIVOS

Quando comparadas, as seqüências ProCaExp1 e ProCaExp2e de ProCaExp1 e ProCaExp3apresentaram poucas regiões similares como pode ser observados na Figura 10 e 11 respectivamente.

Figura 9– Alinhamento no programa CLC (Main Workbench 4.1.1) entre as seqüências de ProCaExp1 das cvs lapar 59 (I59) e .Graúdo. Colunas indicam similaridade entre as seqüências.

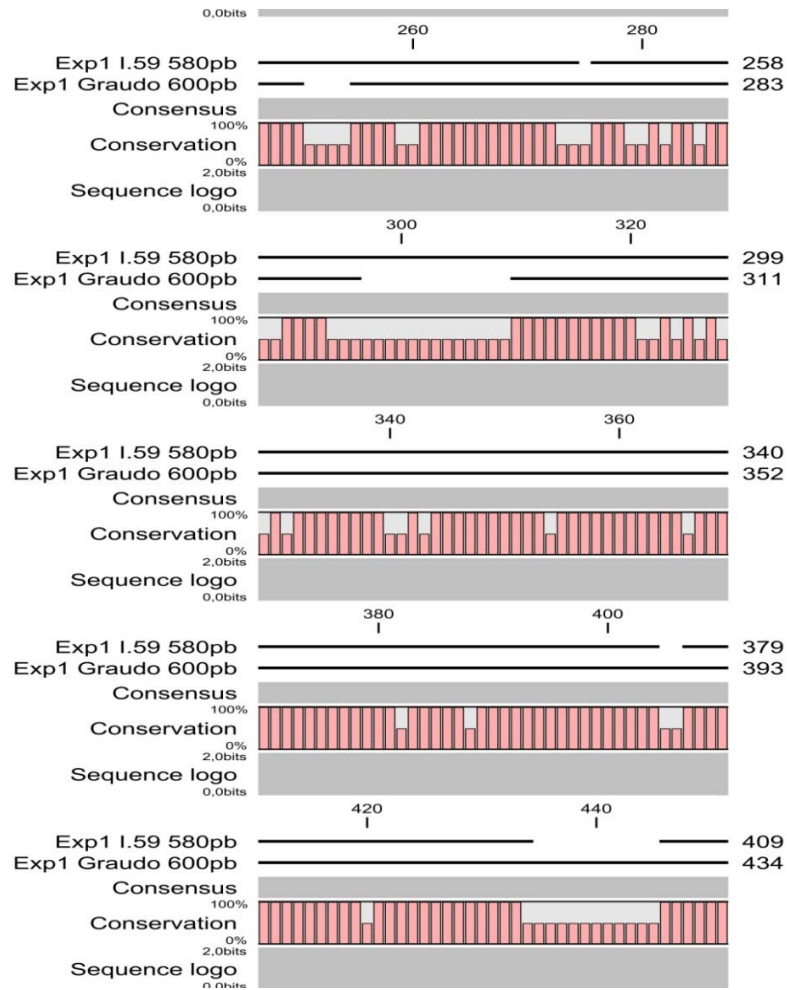


Figura 10– Alinhamento no programa CLC (Main Workbench 4.1.1) entre as sequencia de ProCaExp2 e ProCaExp1. *Colunas indicam similaridade entre as seqüências.*

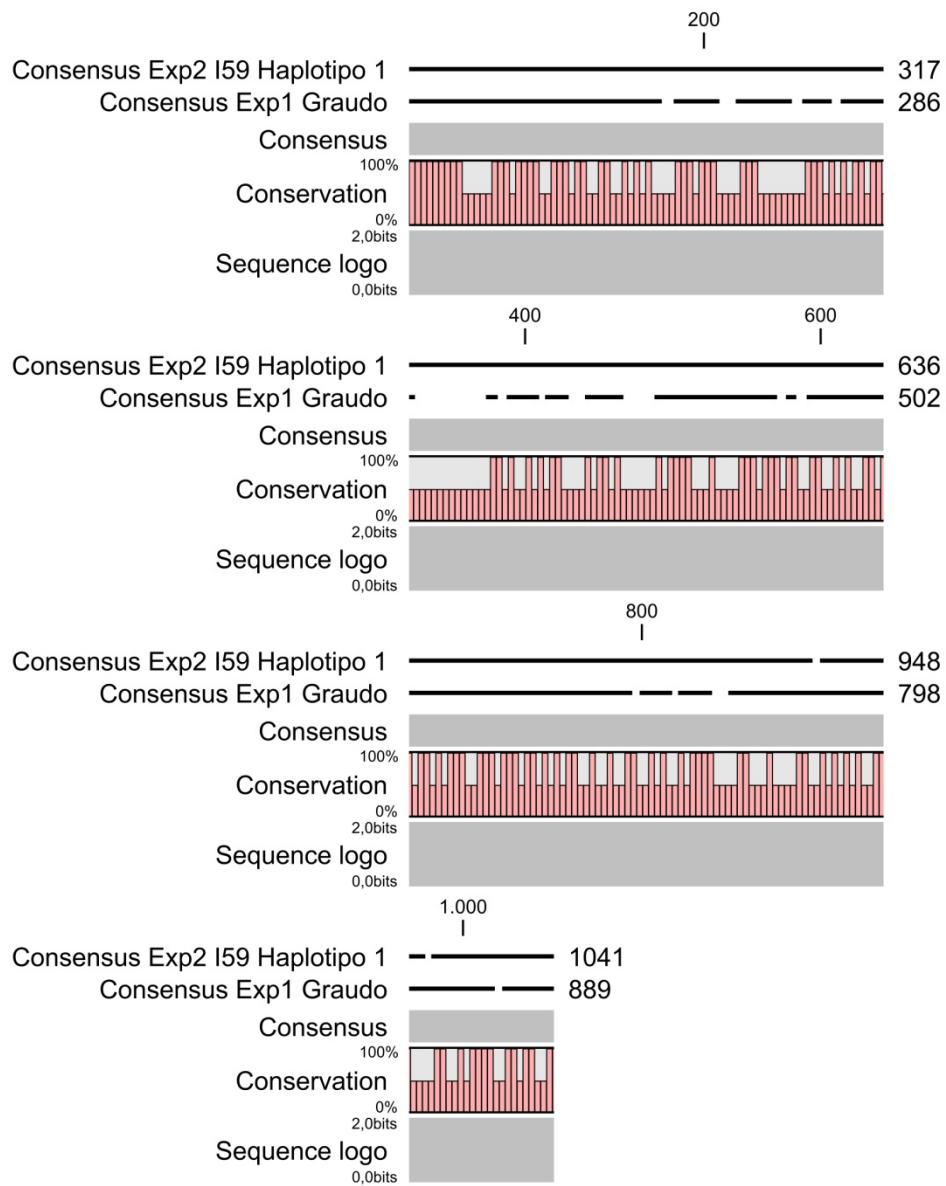
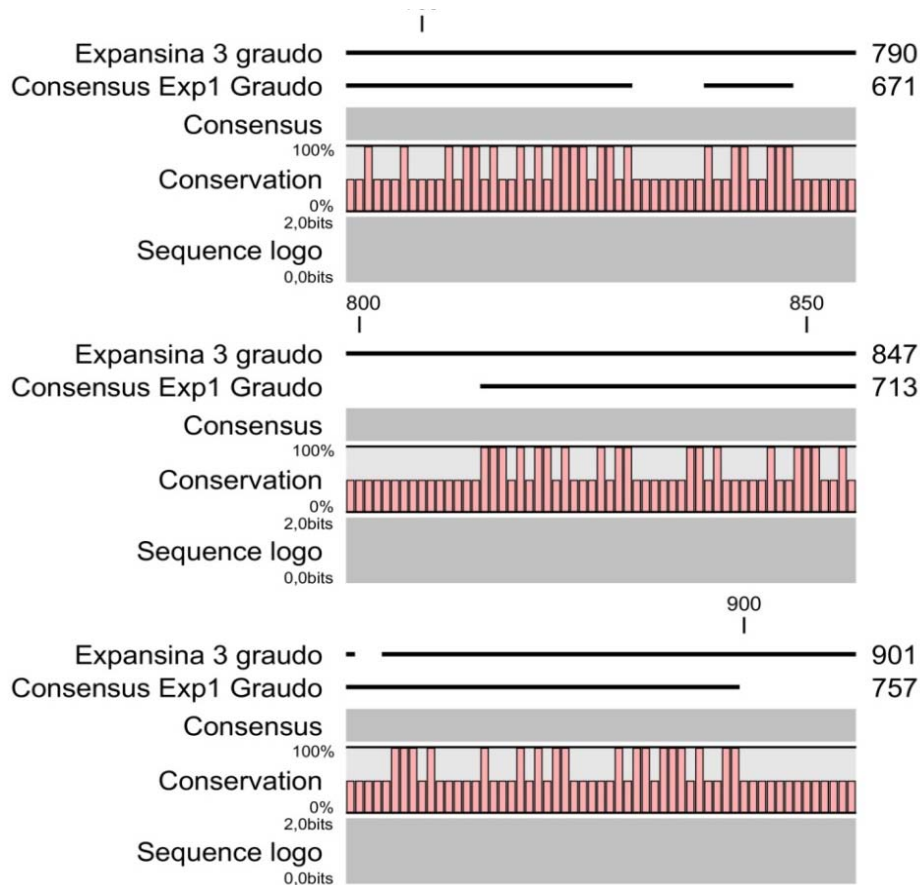


Figura 11– Alinhamento no programa CLC (Main Workbench 4.1.1) entre as seqüências de ProCaExp1 e ProCaExp3. *Colunas indicam similaridade entre as seqüências*



4.3.3 Análise dos Motivos dos Promotores Expansina 1 e 3

As seqüências dos promotores obtidos foram analisadas utilizando quatro bancos de dados disponíveis para esse tipo de análise em plantas. Através destas análises, mais de 300 motivos foram identificados nos dois promotores. Como os genes *CaEXPA1* e *CaEXPA3* apresentam o mesmo padrão de expressão (BUDZINSKI et al. 2011), os promotores foram comparados para melhor visualizar as diferenças e tentar compreender o padrão de resposta destes genes. Entre estes, foram selecionados 20 motivos para o ProCaExp1 da cv. Graúdo, 19 para a cultivar IAPAR 59 e 23 para o ProCaEXP3 (Tabela 3).

Entre os motivos encontrados a maior parte está relacionada à resposta ao hormônio ácido abscísico (ABA) e de resposta à luminosidade. A análise pelo banco de dados Plant Care demonstra que 8 dos 24 motivos encontrados neste banco de dados estão relacionados a resposta a luz. Já com os bancos de dados

Softberry, MatInspector e Place, grande parte dos motivos encontrados estão relacionados ao ABA e a resposta a luz, sugerindo uma importante função destes dois fatores na regulação dos dois genes. Dentre os principais motivos encontrados nos três promotores em resposta a ABA e luz: DPBFCOREDCDC3 (FINKELSTEIN e LYNCH 2000); DRE2COREZMRAB17 (KIZIS e PAGES 2002); EBOXBNNAPA (STALBERG et al., 1996; HARTMANN et al., 2005), também conhecido como elemento de resposta R (RRE) (HARTMANN et al., 2005); SBOXATRBCS (ACEVEDO-HERNANDEZ, LEON e HERRERA-ESTRELLA 2005); MYB (ABE et al., 2003; TRANS et al., 2004) e MYCATRD22 (BUSK e PAGES 1998) são elementos responsivos relacionados a desidratação que respondem ao hormônio ABA; o motivo LTRECOREATCOR15 responde tanto ao hormônio ABA (BUSK e PAGES 1998), como também pode ser responsivo a luz, mediado por um fitocromo (KIN et al., 2002); G-box, CATT-motif; GA-motif e GT1 são alguns dos motivos encontrados responsivos a luz (MONGKOLSIRIWATANA et al., 2009). O motivo G-box se destaca também por apresentar resposta ao fitorregulador etileno e resposta a baixas temperaturas (SESSA, MELLER e FLUHR 1995). O motivo DPBFCOREDCDC3 (FINKELSTEIN e LYNCH 2000) esta ausente no ProCaEXP3.

Outros motivos relacionados à fitorreguladores são CAREOSREP1 e PYRIMIDINEBOXHVEPB1, induzidos por giberelinas (GA) (CERCOS, GOMEZ-CADENAS e HO, 1999; SUTOH e YAMAUCHI 2003). Também foram observados W-box, que são sitios de ligação das proteínas WRKY71 que reprimem GA e são também elementos responsivos a resposta a patógenos e ABA (ZHANG et al., 2000).

Alguns dos motivos encontrados são tecido-específicos como: DOF (YANAGISAWA e SCHMIDT 1999); C-box (GALLUSCI et al., 1994); e EBOXBNNAPA (STALBERG et al., 1996) que estão relacionados com a expressão específica em endosperma. O motivo CAREOSREP1, expresso em células de aleurona de sementes de arroz (SUTOH e YAMAUCHI 2003), também foi encontrado. Um motivo que confere expressão em grãos de pólen: POLLEN1LELAT52, (BATE e TWELL 1998). E CARGCW8GAT, sítio de ligação da proteína AGAMOUS-like 15, do grupo de fatores de transcrição das proteínas MADS-box, relacionada com o florescimento (TANG e PERRY 2003).

O elemento regulatório RHERPATEXP7 encontrado por Cho e Cosgrove (2002) em expansina de *Arabidopsis* (*AtEXP7*) foi identificado nos três promotores analisados (ProCaExp1 nas duas cultivares e ProCaExp3).

Na comparação dos ProCaExp1 foram observados a presença dos mesmos motivos, com exceção do elemento responsivo a brassinosteróides (BR), (que se liga a proteína BZR1) (YIN et al., 2002). Esse motivo foi encontrado somente na cultivar IAPAR 59. Curiosamente o motivo BR foi encontrado no ProCaExp3 da cv. Graúdo.

Os motivos relacionados à fitorreguladores encontrados apenas no ProCaExp3 foram: AuxRR-core relacionado a resposta a auxina, LECPLEACS2 de resposta ao etileno (MATARASSO et al. 2005) e GARE-motif de resposta a giberelina. Outros motivos encontrados somente em ProCaExp3 foram os motivos I-box de resposta a luz (ARGUELLO-ASTORGA e HERRERA-ESTRELLA 1998) e CIACADIANLELHC de resposta a luz e ritmo circadiano (PIECHULLA et al., 1998)

Tabela 3– Análise dos motivos encontrados no ProCaExp1 e ProCaExp3 dos cultivares IAPAR 59 e IAPAR 59 Graúdo

Motivo	Sequência Motivo	ProCaEXP1 IAPAR 59 (580pb)		ProCaEXP1 I 59 Graúdo (880pb)		ProCaEXP3 I 59 Graúdo (1168pb)		Banco de dados
		Fita	Posição de Início	Fita	Posição de Início	Fita	Posição de Início	
AuxRR-core	GGTCCA T		Ausente		Ausente	+	-639	Plant Care
Brassinosteroid response element(BR)	CGTG	+	-235		Ausente	-	-1143	MatInspector
CAAT-BOX	CAAT	+	-303	-	-859	+	-1056	Plant Care
		+	-71	+	-605	+	-642	
		-	-540	-	-690	+	-590	
				+	-389	+	-436	
				-	-823	-	-918	
				+	-391	-	-696	
				-	-667	-	-500	
				-	-64	-	-313	
				-	-858	-	-137	
				+	-601			
				-	-680			
				-	-266			
				-	-726			
				+	-390			
		+	-606					
		-	-59					

CAREOSREP1	CAACTC	-	-241	-	-554	+	-670	Place
C-box (Opaque-2 Like transcriptional Activator)	ATGAGT CAT	-	-326	-	-367	+	-1110	MatInspector
				+	-626			
				-	-627			
				+	-645			
				-	-646			
				-	-718			
CIACADIANLELH C	CAANNN NATC		Ausente		Ausente	+	-782	Place/ Plant Care
DOF	AAAG	+	-294	+	-646	+	-854	Place/ Softberry/ MatInspector
		+	-290	+	-591	+	-721	
		+	-286	+	-587	+	-569	
		-	-443	+	-337	+	-458	
		-	-93	+	-333	+	-407	
		-	-89	-	-760	+	-396	
		-	-64	-	-410	+	-253	
				-	-406	+	-248	
				-	-401	+	-144	
				-	-381	+	-131	
				-	-197	+	-92	
						+	-84	
						-	-984	
						-	-877	
						-	-538	
						-	-488	
				-	-483			
				-	-302			
				-	-287			
				-	-183			
DPBFCOREDCDC 3 (Dc3 promoter binding factors)	ACACNN G	-	-235	-	-554		Ausente	Place/ MatInspector
		+	-24	-	-548			
DRE2 (DRE2COREZMR AB17)	ACCGAC	+	-91	+	-91	+	-467	Place/ Softberry
		+	-417	+	-417	-	-29	
EBOXBNNAPA	CANNTG	+	-384	+	-690	+	-189	Place
		+	-171	+	-545	+	-76	
		+	-165	+	-488	+	-38	
		+	-156	+	-482	-	-189	
		+	-144	+	-473	-	-76	
		+	-115	+	-416	-	-38	
		-	-284	+	-432			
		-	-171	+	-309			
		-	-165	-	-690			
		-	-156	-	-545			
		-	-144	-	-488			
		-	-115	-	-482			
				-	-473			
				-	-461			
		-	-432					
		-	-309					
GARE-motif	TCTGTT G/ AAACAG A		Ausente		Ausente	+	-127	Plant Care
						+	-421	
G-box	CACGTC	+	-321	+	-621	-	-1106	Softberry/ Plant Care
		-	-340	+	-594			
				-	-641			

I-box	GATAA		Ausente		Ausente	+	-325	Place
						+	-19	
						-	-1016	
						-	-299	
LECPLEACS2	TAAAATA		Ausente		Ausente	-	-580	Place
	T							
LTRECOREATCO R15	CCGAC	+	-99	+	-90	+	-470	Place /
		-	-28	+	-416	+	-466	MatInspector
				-	-618	-	-65	
						-	-29	
MADS-box (CARGCW8GAT)	CWWWW	+	-443	+	-54	+	-770	Place/
	WWWWG	-	-443	+	-55	+	-558	MatInspector
				+	-747	+	-48	
				+	-760	-	-770	
						-	-558	
						-	-48	
MYB	WAACCA	-	-475	-	-792	+	-786	Place/
	YAACKG	+	-436	+	-461	-	-1128	MatInspector/
				-	-243	-	-936	Plant Care/
						-	-947	Softberry
						-	-38	
MYCATRD22	CACATG	+	-171	+	-488	-	-76	Place
		+	-115	+	-432			
				-	-545			
				-	-309			
PYRIMIDINEBOX HVEPB1	TTTTTC	-	-434	-	-751	-	-89	Place
	C							
RAV1AAT	CAACA	-	-358	-	-214	+	-950	Place
				-	-207	+	-815	
				-	-192	+	-645	
						-	-418	
						-	-268	
RHERPATEXP7	KCACGW	+	-321	+	-622	-	-1104	Place
						-	-441	
SBOXATRBCS (Coupling element 1 binding factors)	CACCTC			-	-722	+	-910	Place/
	CA			-	-831			MatInspector
TATA box	TATA	+	-54	+	-5	+	-97	Plant Care
TGACG-motif	TGACG	+	-341	+	-642	+	-565	Plant Care/
								Softberry
W-box (WRKY71OS)	TGAC	+	-340	+	-713	+	-564	Place/
		-	-322	+	-641	+	-413	MatInspector/
				+	-189	+	-265	Softberry
				+	-108	-	-677	
				+	-93	-	-653	
				-	-623	-	-970	
				-	-547	-	-559	
				-	-245			

4.3.4 Análise dos Motivos Promotores Expansina 2

Através da análise utilizando os bancos de dados Place, Plant Care, Softberry e MatInspector foi possível encontrar mais de 300 motivos no ProCaExp2. Entre estes foram selecionados 18 motivos putativos para uma análise detalhada (Tabela 4).

Entre os principais motivos encontrados estão os Fatores de Resposta a Auxina (ARFs) (GUILFOYLE e HAGEN 2007). Outro importante motivo encontrado foi o RAV1AAT (AP2/ERF) que é da superfamília AP/ERF que junto com os elementos responsivos ao etileno (ERF) são importantes em diversos processos como desenvolvimento e, defesa a patógenos (KARVOLLA et al., 2011). Além da AP2, um elemento responsivo a etileno (ERELEE4) (MONTGOMERY et al. 1993) e um elemento insensitivo a etileno (EIN3) (GAGNE et al. 2004) também foi encontrado no ProCaExp2.

Os motivos MYB1AT (ABE et al., 1997) e DRE2COREZMRAB17 (KIZIS e PAGES 2002) também foram identificados e ambos estão relacionados à resposta por estresse de deficiência hídrica e resposta ao hormônio ABA (ABE et al., 1997; KIZIS e PAGES 2002). Outro elemento relacionado a estresse foi o LTRECOREATCOR15 que é responsivo ao fitorregulador ABA (BUSK e PAGES 1998), assim como o WRKY (WRKY71OS) que transcrevem fatores de transcrição responsivos a ABA e que inibem a resposta a giberelina (ZHANG et al., 2000).

Elementos tecido específico como EBOXBNNAPA (STALBERG et al., 1996), DOFCOREZM (YANAGISAWA e SCHMIDT 1999), POLLEN1LELAT52 (BATE e TWELL, 1998) foram encontrados. Outros motivos tecido específicos encontrados: CAATBOX1 (SHIRSAT et al., 1989); C-box que é específico de endosperma de milho e é onde o fator de transcrição *Opaque-2 like transcriptional activator* se liga (GALLUSCI et al., 1994).

Assim como para os promotores de *CaEXP1* e *CaEXP3*, o elemento regulatório de expansinas RHERPATEXP7 encontrado por Cho e Cosgrove (2002) também foi encontrado no ProCaEXP2.

Os elementos regulatórios INRNTPSADB (NAKAMURA, TSUNODO e OBOKATA 2002); GT1 (TERZAGHI e CASHMORE 1995) e I-box (ARGUELLO-ASTORGA e HERRERA-ESTRELLA 1998) são responsivos a luminosidade. Além

disso, o elemento INRNTPSADB é encontrado em promotores que não contém TATA box (NAKAMURA, TSUNODO e OBOKATA 2002). O promotor também parece responder ao ritmo circadiano com o motivo CIACADIANLELHC (PIECHULLA et al., 1998).

Tabela 4 – Identificação de 18 motivos encontrados no promotor putativo de *CaEXPA2*

Motivo	Sequência Motivo	Fita	Posição de Início	Banco de dados
CAATBOX1	CAAT	+	-988	Place/ Plant Care/ MatInspector
		+	-734	
		+	-641	
		+	-603	
		+	-596	
		+	-548	
		+	-366	
		+	-343	
		+	-338	
		+	-275	
		+	-268	
		+	-215	
		+	-103	
		+	-54	
		-	-729	
		-	-496	
		-	-506	
		-	-266	
-	-235			
-	-180			
-	-174			
CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	+	-343	Place / Plant Care
C-box (Opaque-2 transcriptional Activator)	ATGAGTCAT	+	-984	SoftBerry/ MatInspector
		+	-139	
DOF	AAAG	+	-974	Place/ Softberry/ MatInspector/ Plant Care
		+	-967	
		+	-888	
		+	-874	
		+	-860	
		+	-645	
		+	-565	
		+	-530	
		+	-521	
		+	-484	
		+	-435	
		+	-253	
		+	-239	
		-	-788	
		-	-701	
		-	-492	
		-	-325	
		-	-204	
-	-15			
DRERTCOREAT	RCCGAC	+	-159	Place / MatInspector
		-	-825	
DR5 (ARF1)	CCTTTTGcCTC	-	-561	SoftBerry

EBOXBNNAPA	CANNTG	+	-993	Place
		+	-748	
		+	-673	
		+	-407	
		+	-266	
		-	-993	
		-	-748	
		-	-673	
		-	-407	
		-	-266	
EIN3 (Ethylene insensitive 3 like factors)	aTGAAgctt	-	-920	MatInspector
ERELEE4	AWTTCAAA	-	-834	Place/ MatInspector
GNC4OSGLUB1	TGAGTCA	+	-154	Place / MatInspector
GT1	GRWAAW	+	-1010	Place / MatInspector
		+	-973	
		+	-894	
		+	-893	
		+	-883	
		+	-867	
		+	-866	
		+	-529	
		+	-528	
		+	-519	
		+	-518	
		+	-490	
		+	-285	
		+	-247	
		-	-665	
		-	-658	
		-	-608	
		-	-322	
		-	-147	
		-	-78	
-	-371			
-	-370			
-	-321			
I-box	GATAGGG	-	-476	MatInspector/Plant Care
INRNTPSADB	YTCANTYY	+	-56	Place / MatInspector / Plant Care
LTRECOREATCOR15	CCGAC	+	-164	Place
MYB1AT	WAACCA	+	-1007	Place/ Softberry/ MatInspector/ Plant Care
		+	-413	
		+	-943	
RAV1AAT (AP2/ERF)	CAACA	+	-943	Place
RHERPATEXP7	KCACGW	+	-946	Place
W box (WRKY71OS)	TGAC	+	-801	Place/ Softberry
		+	-616	
		-	-990	
		-	-736	
		-	-153	

4.3.5 Comparação dos Promotores de Expansina de Cafeeiros

A fim de compreender melhor a presença dos motivos regulatórios nos promotores clonados e sua relação com a atividade transcricional das diferentes isoformas, foi feita uma análise comparando os motivos encontrados nas três isoformas, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5– Comparação dos principais motivos encontrados em quatro promotores de expansina de cafeeiros

Resposta	Motivo	Sequência Motivo	ProCaEX P1 I.59	ProCaEXP 1 Graudo	ProCaEXP 2	ProCaEXP 3 Graudo
ABA	DPBFCOREDCDC3 (Dc3 promoter binding factors)	ACACNNG	+	+	-	+
ABA/Luz/ Frio	LTRECOREATCOR 15	CCGAC	+	+	+	+
ABA/Seca	DRE2-DRE2COREZMRAB 17	ACCGAC	+	+	+	+
	MYB	WAACCA YAACKG	+	+	+	+
	MYCATRD22	CACATG	+	+	-	+
ABA/açúcar	SBOXATRBGS (Coupling element 1 binding factors)	CACCTCC A	+	+	-	+
ABA/ Inibe GA	W-box (WRKY71OS)	TGAC	+	+	+	+
Aumenta Transcriçã o	CAAT-BOX	CAAAT	+	+	+	+
Auxina	AuxRR-core	GGTCCAT	-	-	-	+
	DR5 (ARF1)	CCTTTTG cCTC	-	-	+	-
AP2/Patóg eno	RAV1AAT	CAACA	+	+	+	+
BR	Brassinosteroid (BR) response element	CGTG	-	+	-	+
Ciclo circadiano/ Luz	CIACADIANLELHC	CAANNNN ATC	-	-	+	+
Luz	INRNTPSADB	YTCANTY Y	+	+	+	+
	I-box	GATAGGG	-	-	+	+
	GT1	GRWAAW	+	+	+	+
Luz/Etileno	G-box	CACGTC	+	+	-	+

/ Friu						
Etileno	LECPLEACS2	TAAAATA T	-	-	-	+
	ERELEE4	AWTTCAA A	-	-	+	-
	EIN3	ATGAAgctt	-	-	+	-
GA/ABA	PYRIMIDINEBOXHV EPB1	TTTTTCC	+	+	+	+
GA	GARE-motif	TCTGTTG/ AAACAGA	-	-	-	+
	CAREOSREP1	CAACTC	+	+	-	+
Póllen	POLLEN1LELAT52	AGAAA	+	+	+	+
Flor	MADS-box (CARGCW8GAT)	CWWWW WWWWG	+	+	-	+
Endosperma	GNC4OSGLUB1	TGAGTCA	+	+	+	-
	DOF	AAAG	+	+	+	+
	C-box (Opaque-2 Like transcriptional Activator)	ATGAGTC AT	+	+	+	-
Metil Jasmonato	TGACG-motif	TGACG	+	+	-	+
Expansina	RHERPATEXP7	KCACGW	+	+	+	+
Iniciador	TATA-BOX	TATA	+	+	-	+

Dentre os elementos comuns aos quatro promotores analisados estão os motivos tecido-específico como: DOF e C-box (Opaque-2 Like transcriptional Activator) que são específicos de endosperma e POLLEN1LELAT52 específico de pólen, e GNC4OSGLUB1, que é endosperma-específico e esta presente apenas no promotor de *CaEXPA2*. Também estão presentes nos quatro promotores os motivos RHERPATEXP7 de expansina de *Arabidopsis* (*AtEXP7*); RAV1AAT de resposta a estresse induzido por AP2; GT1 e INRNTPSADB de resposta a luminosidade; LTRECOREATCOR15; DRE2 (DRE2COREZMRAB17); MYB que respondem ao ABA; W-box (WRKY71OS); PYRIMIDINEBOXHV EPB1 relacionado ao GA e CAAT-BOX.

Dos motivos específicos para ProCaExp1 nas duas cultivares e para ProCaExp3 da cv. I.59 Graúdo, destacam-se os motivos relacionados às proteínas MADS box (CARGCW8GAT), que é um sítio de ligação da proteína AGAMOUS-like

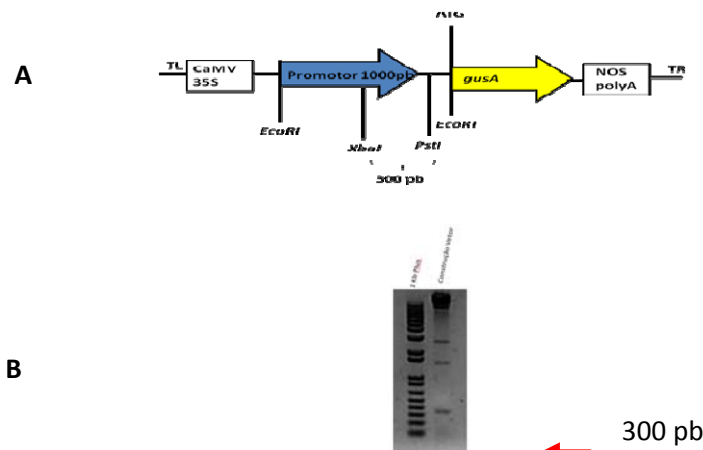
15 específica de sépala; o TATA box; G-box, DPBFCORED CDC3 (Dc3 promoter binding factors), MYCATRD22, SBOXATRBCS (Coupling element 1 binding factors) todos elementos de resposta ao ABA e o CAREOSREP1 um motivo ativado pelo GA. O elemento responsivo a brassinosteróides (BR) foi encontrado apenas na *CaEXPA1* cultivar I.59 e na *CaEXPA3* cultivar I.59 Graúdo.

Dois motivos responsivos a luz, I-box; CIACADIANLELHC, foram encontrados tanto no *ProCaExp2*, como no *ProCaEXP3*. Os motivos de resposta etileno (ERELEE4; EIN3) e auxina (DR5 (ARF1)) foram encontrado apenas na isoforma *CaEXPA2*, e os motivos AuxRR-core, LECPLEACS2 e GARE-motif de resposta a auxina, etileno e giberelina respectivamente foram encontrados apenas no promotor da isoforma *CaEXPA3*.

4.3.6 Validação Funcional do Promotor *CaEXP2* em Planta Modelo

Após a caracterização *in silico*, a região promotora de 1000pb do gene *CaEXPA2* foi inserido no vetor pCambia 1381, a montante do gene GUSA. Para análise da regulação gênica deste gene em plantas modelo transformadas. O vetor pCambia 1381 contendo o promotor foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *PstI* para verificar se a construção estava na direção correta e foi obtido uma banda de 300pb (Figura 12), confirmando a inserção correta do promotor no cassete de expressão.

Figura 12– A. Construção gênica mostrando os sítios de digestão e o tamanho do fragmento esperado de fragmento referente a posição correta do promotor. B. Digestão do cassete de expressão contendo o promotor do gene *CaEXPA2* de *C. arabica* lapar 59 com as enzimas *XbaI* e *PstI*.

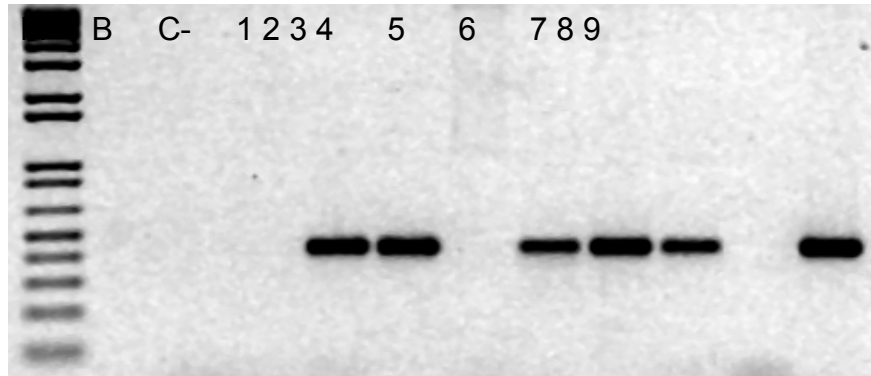


Foram transformados 200 cotilédones de *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom com *A. tumefaciens* contendo a construção com o promotor *CaEXPA2* de 1000pb no vetor fusionado ao gene *GUSA*. Destes, 9 explantes regeneraram brotos resultando em uma eficiência de transformação de 4,5%. As plantas foram transferidas para casa de vegetação em vaso de 3 Kg contendo uma mistura de terra e 20% de vermiculita (Figura 13). As plantas foram protegidas sacos plásticos cobrindo a parte aérea durante uma semana para aclimação. Para confirmar a transformação as 9 plantas foram submetidas a PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de um fragmento do gene *gusA*, sendo que 6 confirmaram a presença do fragmento do gene *gusA* (Figura 14). Das 9 plantas transferidas para casa de vegetação somente 7 plantas sobreviveram a fase de aclimação (Figura 13).

Figura 13 – Transformação do tomateiro. *A*- germinação *in vitro* de sementes de tomate cv. MicroTom; *BC* – regeneração de brotos em meio seletivo contendo higromicina; *D* – desenvolvimento *in vitro* de planta provavelmente transformada; *EF*- Aclimação dos tomateiros em casa-de-vegetação.



Figura 14– Análise molecular dos eventos de tomateiros provavelmente transformados contendo o promotor putativo *CaEXP2* fusionado ao gene *gusA* usado a PCR. *M* – Marcador de peso (1 Kb plus); *B* – branco (mix sem DNA); *C*– Planta de tomate não transformada; 1 - 9 plantas regeneradas.

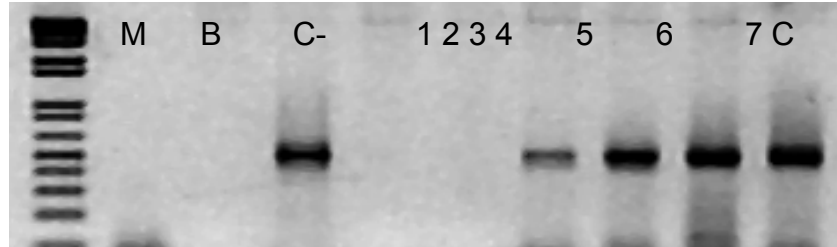


As plantas transgênicas floresceram e frutificaram normalmente (Figura 15) e 14 sementes foram recuperadas para produção da geração T1. Devido a um estresse térmico somente 7 plantas se desenvolveram em casa de vegetação. A análise da segregação do transgene foi realizada pela PCR utilizando os iniciadores específicos para o gene *gusA*, sendo que 5 confirmaram a presença do fragmento (Figura 16).

Figura 15– Produção da geração T1 de tomateiros transgênicos. *A*- florescimento; *B-C* frutificação.



Figura 16– Análise da confirmação das plantas na geração T1 de um evento de transformação usando PCR. *M* – Marcador de peso (1 Kb plus); *B* – branco (mix sem DNA); *C*- (Planta de tomate não transformada); 1 – 7 sementes de 1 evento de transformação.



A análise da funcionalidade do promotor *CaEXPA2* foi realizada em frutos da geração T1. Foram imersos em solução de X-GLUC frutos em diferentes fases de maturação (verde, amarelo, laranja e vermelho) além de folha, flor e raiz. A atividade do gene *gusA* foi detectada em: semente e polpa na fase final de maturação do fruto (fruto vermelho) (Figura 17)

Figura 17 – Ensaio histoquímico de tecidos de (A) plantas controle, (B) plantas transformadas com ProCaExp2-GUSA: (1) folha, (2) flor, (3-6) frutos em diferentes fases de desenvolvimento.



4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Análise dos Motivos Presentes no ProCaEXP1 e 3

Em trabalho realizado por Budzinski et al., (2011) foi observado que os genes das isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA3* apresentam o mesmo padrão de expressão. Ambos têm um acúmulo de transcritos que coincide com o início da rápida expansão dos frutos (60 DAF) e que estas podem atuar no processo de divisão celular, tanto do pericarpo, quanto do perisperma. Em torno de 90 DAF, quando já cessado o período de rápida expansão celular, observa-se queda no número de transcritos tanto de *CaEXPA1* como de *CaEXPA3*, com aumento da expressão nas fases referentes a maturação do pericarpo (BUDZINSKI et al., 2011). Devido ao padrão similar de expressão no desenvolvimento do fruto a sequência promotora destes genes foram comparadas a fim de identificar os motivos que regulam estes genes. Os dois promotores apresentam, principalmente, motivos que sugerem regulação positiva dos fitorreguladores: GA e ABA. Estes dados estão de acordo com os encontrados em tomate onde expansina expressas em sementes tem expressão induzidas por GA (CHEN e BRADFORD, 2000; CHEN et al., 2001). Análise da transcrição de duas expansinas de tomate, *LeEXP2* e *LeEXP4* demonstraram que elas são reguladas positivamente por GA (CHEN e BRADFORD 2000) e por auxina (CATALA, ROSE e BENNETT 2000). Além disso, em *Arabidopsis* as expansinas *AtExp2*, *AtExp9* e *AtExp10*, expressas em semente, tiveram um aumento crescente no número de transcritos quando embebidas em GA por 3, 6 e 9 horas. E quando analisados os motivos destas três expansinas as *AtExp2* e *AtExp10* apresentam o motivo GARE, também encontrado na *CaEXPA3* enquanto *AtExp9* apresenta o motivo CAREOREP1 encontrado em *CaEXPA1* (Anexo1). Srivastava e Handa 2005 descrevem os vários mecanismos de regulação hormonal do desenvolvimento de frutos de tomate. Segundo estes autores há dois picos principais de giberelina no desenvolvimento do fruto de tomate que coincidem com as fases de divisão e expansão celular. Estes mesmos autores ainda destacam que são detectados níveis de ABA cerca de 5 dias após a polinização, com níveis crescentes em semente e pericarpo até 30 a 50 dias após a polinização. O maior acúmulo de ABA coincide com a fase de expansão celular. Em *Arabidopsis*

sementes mutantes para produção de ABA tem menor expressão de *AtExp2* e *AtExp9* quando embebidas em água do que as sementes selvagens, sugerindo que este fitorregulador pode estar relacionada com o controle de sua expressão (Anexo 1). Em tomate, duas expansinas de semente (*LeExp8* e *LeExp10*) quando submetidas a condições de estresse hídrico ou presença de ABA apresentaram aumento no número de transcritos (CHEN, DAHAL e BRADFORD, 2001). Em cafeeiro, foram encontrados motivos de resposta à ABA e GA em ProCaExp1 e ProCaExp3 sugerindo padrão de resposta a estes fitorreguladores similar as expansinas de *Arabidopsis* (*AtExp2*, *AtExp9* e *AtExp10*) e tomateiro (*LeExp8* e *LeExp10*).

Srivastava e Handa (2005) também demonstraram que a expressão do ABA precede a expressão do fitorregulador etileno. Jiang et al., 2000 sugerem que em frutos de banana o hormônio ABA facilita a iniciação e o desenvolvimento nos eventos de maturação mediado pelo etileno, possivelmente aumentando a sensibilidade do fruto de banana ao etileno. Zhang, Yuan e Leng 2009 demonstraram que o fitorregulador ABA induz a expressão de genes relacionados à biossíntese do fitorregulador etileno. As *CaEXPA1* e *CaEXP3* apresentam expressão durante a fase que precede a maturação, e a presença dos motivos responsivos a ABA nos promotores destes genes é uma indicação da regulação da expressão por este fitorregulador.

Segundo Budzinski et al., (2011) 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. Além dos motivos referentes aos fitorreguladores GA e ABA presentes em ambas as isoformas, o aumento da transcrição da *CaEXPA3* durante a fase de maturação pode ser justificado pela presença dos motivos de resposta a AIA e Etileno neste promotor. Estes dois fitorreguladores têm papel importante na fase de maturação de frutos climatéricos (JONES et al., 2002, TRAINOTT et al., 2007).

Outro importante motivo encontrado no ProCaExp1 da cultivar I.59 e ProCaExp3 é o elemento de resposta a brassinosteróides, região que se liga a proteína BZR1, a qual regula positivamente a via dos brassinosteróides (YIN et al. 2002). As expansinas de *Arabidopsis* *AtExp8* e *AtExp17* foram descritas como sendo

reguladas via Brassinosteróides (GODA et al. 2004). Além disso, a expansina AtExp17 foi descrita como sendo regulada por duas vias que se relacionam, auxina e brassinosteróides (GODA et al. 2004).

Além de motivos relacionados à expressão em fruto, alguns elementos regulatórios estão relacionados com o florescimento como: POLLEN1LELAT52 (BATE e TWELL, 1998) e CARGCW8GAT (TANG e PERRY 2003). O motivo CARGCW8GAT é sítio de ligação da proteína AGAMOUS-like 15, do grupo de fatores de transcrição das proteínas MADS-box, proteínas relacionadas ao florescimento (TANG e PERRY 2003). Estes motivos justificam o padrão de expressão de *CaEXPA1* e *CaEXPA3* no botão floral encontradas por Budzinski et al. (2011).

4.4.2 Análise dos Motivos Presentes no ProCaEXP2

O cafeeiro é um fruto climatérico, desta forma a maturação dos frutos é regulada pelo etileno. Dados obtidos por Budzinski et al. (2011) demonstram que *CaEXPA2* tem atuação específica 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 o gene *CaEXPA2* pode ser modulada por etileno (BUDZINSKI et al., 2011). Rose et al. (1997) descrevem uma expansina de tomate (*LeEXP1*) expressa somente nas fases de maturação do fruto que é regulada por etileno. A cascata de transdução de etileno ativa os genes *ethylene insensitive 3-like (EIN3-Like)* que por sua vez ativam genes fatores de resposta ao etileno (ERFs). As ERFs são responsáveis por ativar vários genes relacionados à maturação secundária (JONES et al., 2002; GIOVANNONI 2004). No caso do ProCaExp2, foram encontrados motivos relacionados a ambos os fatores de transcrição (EIN3-like e ERFs), o que indica uma regulação positiva desse promotor nas fases finais de maturação. Além disto, esses fatores não foram encontrados nos promotores de *CaEXPA1* e *CaEXPA3*, sugerindo que estes fatores podem estar diretamente relacionados com o padrão de transcrição observado para *CaEXPA2*.

Os elementos responsivos ao etileno (ERF) junto com (AP2/ERF) pertencem à superfamília AP/ERF (RAV1AAT) e são importantes em

diversos processos como desenvolvimento e defesa a patógenos (KARVOLLA et al., 2011). Karvolla et al. (2011) demonstram que *Apetalla 2a* (*AP2a*) regula a maturação do tomate e está relacionado com a transcrição de uma expansina específica em pericarpo (*LeExp3*). Além dos motivos de resposta ao etileno, também foram encontrados no *ProCaExp2* os motivos de resposta a auxinas (*ARF*). Em frutos climatéricos como tomate (JONES et al., 2002) e pêssigo (TRAINOTT et al., 2007) observa-se que concomitantemente com o etileno, as auxinas também exercem um importante papel na maturação dos frutos (JONES et al., 2002, TRAINOTT et al., 2007). Jones et al. (2002) demonstraram que os fatores de transcrição *ARFs* e *Aux/IAA* são responsivos a etileno em tomate (JONES et al., 2002). Segundo Trainott et al. (2007) a auxina tem papel na regulação de diversos genes durante a maturação de frutos de pêssigo, diversos genes envolvidos na biossíntese e regulação da auxina aumentam a transcrição em mesocarpo durante a maturação dos frutos.

Além do fitorregulador auxina, outro fitorregulador que parece atuar no desenvolvimento do fruto é o GA. Os picos de divisão e expansão celular em tomate coincidem com os picos de GA (SRIVASTAVA e HANDA 2005). E a concentração de giberelina diminui quando o fruto começa o processo de maturação (SRIVASTAVA e HANDA 2005). Em café a fase de divisão e expansão celular se dá até 150 DAF, quando começa a maturação do fruto (DE CASTRO e MARRACINI 2006), sugerindo que no início da maturação a concentração de GA começa a diminuir.

O motivo *WRKY71OS* é um sítio de ligação das proteínas *WRKY*, que são fatores de transcrição que respondem positivamente ao ácido abscísico e negativamente as giberelinas. A atividade deste fator de transcrição foi descrita em frutos de cafeeiro entre 120 a 150 DAF (LIN et al. 2005), período que coincide com a fase onde os três genes de expansinas não apresentam transcritos (BUDZINSKI et al., 2011). Tendo em vista que este motivo foi encontrado nos quatro promotores analisados, sugere-se que este fator de transcrição possa ser responsável por impedir a transcrição destes genes durante esta fase do desenvolvimento do fruto em cafeeiro.

Alguns elementos tecido específico foram identificados em todos os promotores analisados tais como: *EBOXBNNAPA* (STALBERG et al., 1996),

DOFCOREZM (YANAGISAWA e SCHMIDT 1999), POLLEN1LELAT52 (BATE e TWELL, 1998) os quais foram também identificados em uma expansina de *Brassica juncea* L. (*BJEXP1*) (SUN, ZHANG E CHAI 2011).

Outros motivos presentes em todos os promotores analisados foram: o elemento regulatório RHERPATEXP7 relacionado à expressão de expansinas (CHO E COSGROVE 2007) e o fator de transcrição MYB relacionado ao desenvolvimento do fruto em *Arabidopsis* e tomate (MACHEMER et al., 2011). Ambos os motivos também foram descritos em um promotor de expansina de cereja (Karaaslan e Hrazdina 2010).

Além disto, os quatro promotores analisados apresentaram vários motivos responsivos à luz. Já foi demonstrado que a luz induz a acidificação da parede celular de ervilha e que este é um passo essencial para a expansão celular (ELZENGA et al. 2000). A atividade das expansinas é dependente do pH da parede celular, que deve estar ácido para que haja atividade da proteína (COSGROVE 1997).

4.4.3 Validação Funcional do Promotor CaExp2 em Tomateiro

A região promotora de 1000pb do gene *CaEXPA2* foi inserido no vetor pCambia 1381, amontante do gene *GusA* e usado para transformação utilizando tomateiro como planta modelo. Este promotor foi utilizado para transformação, pois no trabalho realizado por Budzinski et al., (2011) foi demonstrado que *CaEXPA2* tem atuação específica em pericarpo nas fases finais de maturação do fruto de café, e esta especificidade desperta interesse do ponto de vista biotecnológico pois permite o direcionamento da expressão de genes nesta fase.

As análises realizadas em tomateiro deste promotor apresentaram expressão em semente durante a fase desenvolvimento do fruto, enquanto que no final da maturação houve expressão tanto em semente quanto em pericarpo (Figura 17). Estes dados estão de acordo com alguns dos motivos encontrados, como GNC4OSGLUB1, DOF eC-box (*Opaque-2 Like transcriptional Activator*) que conferem expressão em endosperma. Resultados semelhantes também foram encontrados por Karaaslan e Hrazdina (2010) que avaliaram a atividade de um

promotor de expansina de cereja específico para pericarpo através da transformação de tomateiro. Os resultados deste autor mostram que na fase de fruto verde as expansinas de cereja apresentaram expressão apenas em endosperma (semente) e nas fases finais do desenvolvimento do fruto o padrão de expressão passa a ser específico de pericarpo. Estudos em andamento da atividade deste promotor em outros eventos e em fases finais de maturação dos frutos estão em andamento para finalização desta etapa do trabalho.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através deste trabalho foi possível caracterizar três promotores de genes de expansinas de cafeeiro (*CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*). Entre os principais elementos regulatórios destes promotores foi observada que a luminosidade atua na regulação destes genes. Como a luminosidade induz a acidificação da parede celular e que a atividade das expansinas é dependente do pH ácido (ELZENGA et al. 2000; COSGROVE 1996) sugere-se que a luz é um fator determinante para a expressão destes genes. Além disto, fitorreguladores também parecem determinar a expressão destes genes. Foram encontrados motivos de resposta a ABA e GA para os promotores de *CaEXPA1* e *CaEXPA3*. Foi sugerido que estas expansinas estão relacionadas com o alongamento e expansão inicial dos frutos de cafeeiro (BUDZINSKI et al., 2011) e o pico de produção deste hormônio em outros frutos climatéricos coincide com esta fase de desenvolvimento do fruto (SRIVASTAVA e HANDA 2005). Já o ProCaExp2 apresenta motivos de resposta aos fitorreguladores etileno e auxina e estes hormônios ativam genes na fase de maturação (JONES et al., 2002; TRAINOTT et al., 2007). A análise das plantas transformadas mostra que o ProCaExp2 apresenta expressão em endosperma durante toda a fase de desenvolvimento do fruto e na polpa durante a fase de maturação. A presença de transcritos em endosperma é explicada por motivos específicos presentes no promotor de *CaEXPA2*. Para compreender quais motivos estão atuando na regulação destes genes seria importante o desenvolvimento de plantas transgênicas contendo diferentes tamanhos dos promotores estudados. Além disto, para determinar como este promotor está funcionando em cafeeiros seria interessante a transformação de ProCaExp2: *GUS* em plantas de café.

Como o processo de maturação de frutos de café está relacionado diretamente com a qualidade da bebida, a clonagem do promotor não tem somente importância acadêmica no estudo da regulação e função de genes, mas também poderá ter implicações comerciais, através da geração de um produto biotecnológico. Promotores fruto-específico são importantes ferramentas biotecnológicas, pois permitem o correto direcionamento da expressão dos genes de interesse evitando os efeitos indesejáveis derivados da expressão constitutiva, e por serem promotores específicos para frutos podem também ser utilizados em outras

dicotiledôneas e espécies frutíferas. O melhoramento do cafeeiro utilizando genes com promotor fruto-específico permite um padrão de expressão desejável do ponto de vista da biossegurança.

REFERÊNCIAS

- ABE H, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO T, IWASAKI T, HOSOKAWA D, SHINOZAKI K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **Plant Cell** v.9, p.1859-1868, 1997.
- ABE H, URAO T, ITO T, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **Plant Cell** v.15, p. 63-78, 2003.
- ACEVEDO-HERNANDEZ GJ, LEON P, HERRERA-ESTRELLA LR. Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. **Plant Journal**. v.43, p.506-519, 2005.
- ACUÑA, R. BASSÜNER, R. ; BEILINSON, V. ; CORTINA, H. ; CADENA-GÓMEZ, G.; MONTES, V. ; NIELSEN, N. C. Coffee seeds contain 11S storage proteins. **Physiologia Plantarum** v. 105, p.122-131, 1999.
- ADAMS, J. The complexity of gene expression, protein interaction, and cell differentiation. **Nature Education** v.1 n.1, 2008.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. New York, Garland Science p.375-466, 2002.
- AMARAL, J F T, MARTINEZ H E P, LAVIOLA B G, FILHO E I F, CRUZ . Eficiência de utilização de nutrientes por cultivares de cafeeiro. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 4, p. 621- 629 2011.
- ANTHONY F. ; COMBES M. C.; ASTORGA C.; BERTRAND B.; GRAZIOSI G. ; LASHERMES P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical Applied Genetics** v. 104, p. 894–900, 2002.
- ARGÜELLO-ASTORGA G AND HERRERA-ESTRELLA L. Evolution of light-regulated plant promoters. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v. 49, p.525-555, 1998.
- BATE N, TWELL D. Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. **Plant Mol Biol** v.37, p.859-869, 1998.
- BORÉM FM, et al. **Pós-colheita do café**. Ed. UFPA p. 631, 2008
- BRANDALISE M., SEVERINO F.E., MALUF M.P. AND MAIA I.G. The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves. **Plant Cell Reports**. v. 28, p. 1699-1708, 2009.
- BRUMMEL, D.A.; HARPSTER, M.H.; CIVELLO, P.M.; PALYS, J.M.; BENNETT, A.B.; DUNSMUIR, P. 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.

BUDZINSKI I G F.; SANTOS T B.; SERA T.; POT D.; VIEIRA L G E.; PEREIRA L F P. Expression patterns of three α -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. **Plant Biology**. v. 13, n. 3, p. 462-471, 2011.

BUSK PK, PAGES M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. **Plant Mol Biol Review** v.37, p.425-435, 1998.

CADERAS, D.; MUSTER, M.; VOGLER, H.; MANDEL, T.; ROSE, J.K.C.; MCQUEEN-MANSON, S.; KUHLEMEIER, C. Limited Correlation between Expansin Gene Expression and Elongation Growth Rate. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1399–1413, 2000.

CARTHARIUS K, FRECH K, GROTE K, KLOCKE B, HALMEIER M, KLINGENHOFF A, FRISH M, BAVERLEIN M, WERNER T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. **Bioinformatics**. v.21, p. 2933-2942, 2005.

CARVALHO A., MEDINA FILHO H.P. ; FAZUOLI L.C.; GUERREIRO FILHO O. AND LIMA M.M.A. Genetic Aspects of the Coffee tree. Brazil. **Journal of Genetics**. v. 14, n. 1, p. 135- 183, 1991.

CATALA C, ROSE J K C., AND BENNETT A B. Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins Are Expressed during Early Tomato Fruit Growth. **Plant Physiology**, v. 122, p. 527–534, 2000.

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

CAVALLARI C.F.B. **Identificação e Caracterização de Promotores de Genes de Café (*Coffea arabica*)**. Teses (Doutorado Ciências Biológicas (Genética)- Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu (SP), 2009.

CERCOS M, GOMEZ-CADENAS A, HO THD. Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. **Plant J** v.19, p.107-118, 1999.

CHEN F AND BRADFORD K J. Expression of an Expansin Is Associated with Endosperm Weakening during Tomato Seed Germination. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1265–1274, 2000.

CHEN F, DAHAL P, AND 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.; KENDE, H. Expression of Expansin Genes is Correlated with Growth in Deepwater Rice. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1661-1671, 1997.

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

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

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

CONAB Safra - 2010/2011 Disponível em:
<<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4cafe11.pdf>> Acesso em 20 de setembro de 2011.

COSGROVE D J. Relaxation in a high-stress environment: The molecular basis of extensible walls and cell enlargement. **Plant Cell**. v. 9. n.7, p. 1031-1041, 1997.

COSGROVE D J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. Review. v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

DE CASTRO, R.D.; ESTANISLAU, W.T.; CARVALHO, L.M.M.; HILHORST, H.W.M. 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 2005.

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.

DEDECCA, D.M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. Typica Cramer. **Bragantia**, v.16, p. 315-355, 1957.

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.

ELZENGA J T M, STAAL M, PRINS H B A. Modulation by phytochrome of the blue light-induced extracellular acidification by leaf epidermal cells of pea (*Pisum sativum* L.): a kinetic analysis. **The Plant Journal**. V. 22, n. 5, p. 377-389, 2000.

EMERSON J.J., HSIEH L-C., SUNG H-M., et al. Natural selection on *cis* and *trans* regulation in yeasts. **Genome Research**, v. 20, p. 826-836, 2010.

FIGUEROA C.R., PIMENTEL P., DOTTO M C., CIVELLO P M., MARTÍNEZ G A., HERRERA R, MOYA-LÉON A. Expression of five expansin genes during softening of

Fragaria chiloensis fruit: Effect of auxin treatment. **Postharvest Biology and Technology**. v.53, n.1-2, p. 51–57, 2009.

FINKELSTEIN RR, LYNCH TJ . The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. **Plant Cell**. v.12, p. 599-609, 2000.

FROMM M., TAYLOR. L. P. AND WALBOT V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p.5824-5828, 1985.

GAETE-EASTMAN C., FIGUEROA C R., BALBONTÍN C., MOYA M., ATKINSON R G., Expression of an ethylene-related expansin gene during softening of mountain papaya fruit (*Vasconcellea pubescens*). **Postharvest Biology and Technology**.v.53, n. 1-2, p. 58-65, 2009.

GAGNE, J.M., SMALLE, J., GINGERICH, D.J., WALKER, J.M., YOO, S.D., YANAGISAWA, S., AND VIERSTRA, R.D. *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** v.101, p. 6803–6808, 2004.

GALLUSCI P, SALAMINI F, THOMPSON RD. Differences in cell type-specific expression of the gene Opaque 2 in maize and transgenic tobacco. **Molecular and General Genetics**.; v. 244, n. 4, p. 391-400, 1994.

GAMBORG O L., MILLER R A., OJIMA K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**. V.50, N.1, P.151-158, 1968.

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

GIOVANNONI J J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell** v.16, p.170–180, 2004.

GODA H, SAWA S, ASAMI T, FUJIOKA S, SHIMADA Y , AND YOSHIDA S. Comprehensive Comparison of Auxin-Regulated and Brassinosteroid-Regulated Genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**. V. 134, p. 1555-1573, 2004.

GRAY-MITSUMUNE, M.; MELLEROWICZ, E.J.; ABE, H.; SCHRADER, J.; WINZÉLL, A.; STERKY, F.; BLOMQUIST, K.; MCQUEEN-MASON, S.; TEERI, T.T.; SUNDBERG, B. Expansins Abundant in Secondary Xylem Belong to Subgroup A of the α -Expansin Gene Family. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1–13, 2004.

GUILFOYLE TJ, HAGEN G. Auxin response factors. **Current Opinion in Plant Biology**. Review. v.10, n.5, p.453-60, 2007.

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.

HARTMANN U, SAGASSER M, MEHRTENS F, STRACKE R, WEISSHAAR B. Differential combinatorial interactions of *cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. **Plant Molecular Biology**. V.57, p.155-171, 2005.

HAYAMA H., ITO A., MORIGUCHI T., KASHIMURA Y. Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening. **Postharvest Biology and Technology** v.29, n. p. 1 -10, 2003.

HIGO K., UGAWA Y., IWAMOTO M. AND KORENAGA T. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. **Nucleic Acids Research**, v.27 N.1 p. 297-300, 1999.

HINNIGER, C. *et al.* Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. **Annals of Botany**, v. 97, p.755-765, 2006.

HIWASA K., ROSE J K., NAKANO R., INABA A., KUBO Y. . Differential expression of seven α -expansin genes during growth and ripening of pear fruit. **Physiologia Plantarum** V.117, n.4, p. 564–572, 2003.

HOCHHEIMER A., TIJAN R. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. **Genes & Development**, v.17, p.1309-1320, 2003.

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.; KOBAYASHI, S. Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1675-1682, 2007.

JEFFERSON R A., KAVANAGH T A., BEVAN M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. **EMBO Journal**. V. 6, p. 3901-3907, 1987.

JIANG Y, DARYL C. JOYCE DC, AND MACNISH AJ. Effect of Abscisic Acid on Banana Fruit Ripening in Relation to the Role of Ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**. v.19, p.106–111, 2000.

JONES B, FRASSE P, OLMOS E, ZEGZOUTI H, LI ZG, LATCHÉ A, PECH JC, BOUZAYEN M. Down-regulation of an ARF-like gene in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark-green and blotchy ripening fruit. **Plant Journal** v.32, p.603–614, 2002.

- JUVEN-GERSHON T. AND KADONAGA J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. **Developmental Biology**, 2009.
- KARLOVA R., ROSIN F M, BUSSCHER-LANGE J, PARAPUNOVA V, DO P T, FERNIE A R., FRASER P D, BAXTER C, ANGENENT G C, AND DEMAAGD R A. Transcriptome and Metabolite Profiling Show That APETALA2a Is a Major Regulator of Tomato Fruit Ripening. **The Plant Cell**, v. 23, p. 923–941, 2011.
- KARAASLAN M AND GEZA HRAZDINA G. Characterization of an expansin gene and its ripening-specific promoter fragments from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 32, p. 1073-1084, 2010.
- KIM HJ, KIM YK, PARK JY, KIM J. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** v.29, p.693-704, 2002
- KY C.L, LOUARN J, DUSSERT S, GUYOT B, HAMON, NOIROT M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**.V. 75, n. 2, p. 223-230, 2001.
- KIZIS D, PAGES M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in ABA-dependent pathway. **Plant Journal**. v.30, p.679-689, 2002.
- LASHERMES, P., COMBES, M.C., ROBERT, J., TROUSLOT, P., D'HONT, A., ANTHONY, F., AND CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular General Genetics*, v. 261, p. 259–266, 1999.
- LEE Y., CHOI D AND KENDE H. Expansins: ever-expanding numbers and functions. **Current opinion in Plant biology**, v.4, p. 527-532, 2001.
- LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZE P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **NucleicAcids Research**v.30, n.1, p.325-327, 2002.
- LEVINE M. & TIJAN R. transcription regulation and animal diversity. **Nature Reviews**, v. 424, p.147-151, 2003.
- LEWIN, B. **Genes IX**. Porto Alegre: Artmed Editora 955p., 2009.
- LI, Y.; JONES, L.; MCQUEEN-MASON, S. Expansins and cell growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 603–610, 2003.
- LIN C, MUELLER L A, Mc CARTHY J, CROUZILLAT D, PETIARD V, TANKSLEY S D. Coffe and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**. v 112, n. 1, p. 114-130, 2005.

LIZANNA X C., RIEGEL R, GOMES L D, HERRERA J, ISLA A, McQUEEN-MANSON S J., CALDERINI D F. Expansins expression is associated with grain size dynamics in wheat (*Triticum aestivum* L.) **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 4, p. 1147–1157, 2010.

MACHEMER K, SHAIMAN O, SALTS Y, SHABITAI S, SOBOLEV I, BELAUSOV E, GROTENWOLD E, BARG R. Interplay of MYB factors in differential cell expansion, and consequences for tomato fruit development. **The Plant Journal**. v.58, n.2, p. 337-350, 2011.

MANIATIS, T., GOODBOURN S., FISCHER J A. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. **Science**, v. 236, p.1237-1245, 1987.

MARRACCINI, P.; COURJAULT, C.; CAILLET, V.; LAUSANNE, F.; LEPAGE, B.; ROGERS; W. J.; TESSERAU, S.; DESHAYES, A. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p. 17-25. 2003.

MATARASSO N, SCHUSTER S, AVNI A. A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase gene expression. **Plant Cell**. v.17, p.1205-1216, 2005.

McCABE D E., SWAIN W F., MARTINELLI B J., CHISTOU P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. **Biotechnology**, v.6, p. 923-926, 1988.

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. Expansin mode of action on cell walls. **Plant Physiology**, v. 107, p. 87-100, 1995.

MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ D., GOUBLE B., GOMES R-M., AUDERGON J-M., ALBAGNAC G., FILS-LYCAON B. Two expansin cDNAs from *Prunus armeniaca* expressed during fruit ripening are differently regulated by ethylene. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.40, n.5, p.445–452, 2002.

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

MONGKOLSIRIWATANA C, PONGTONGKAM P, PEYACHOKNAGUL S. *In silico* Promoter Analysis of Photoperiod-Responsive Genes Identified by DNA Microarray in Rice (*Oryza sativa* L.) **Kasetsart Journal (Natural Science)** v. 43 : p. 164 – 177, 2009.

MONTGOMERY, J., GOLDMAN, S., DEIKMAN, J., MARGOSSIAN, L. AND FISCHER, R. L. Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** v.90, p.5939-5943, 1993.

MULLER, B.; BOURDAIS, G.; REIDY, B.; BENCIVENNI, C.; MASSONNEAU, A.; CONDAMINE, P.; ROLLAND, G.; CONÉJÉRO, G.; ROGOWSKY, P.; TARDIEU, F. 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.

MURASHIGE T, SKOOG F A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. V.15, p. 473-497, 1962

NAKAMURA M, TSUNODA T, OBOKATA J. Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. **Plant Journal** v.29, p.1-10, 2002.

NEUTEBOOM L.W., KUNIMITSU W.Y., WEBB D., CHRISTOPHER D.A. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**, v.163, p.1021-1035, 2002.

OMONDI, W.O.; NAKANO, R.; KUBO, Y.; INABA, A. 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.

OW, D.W., JACOBS J B., HOWELL S H. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 84, p. 4870 – 4874, 1987.

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

PETRASOVITS L.A., PURNELL M P., NIELSEN L K., BRUMBLEY S M. Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 162-172, 2007.

PIECHULLA B, MERFORTH N, RUDOLPH B. Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. **Plant Molecular Biology** v. 38, n. 4, p. 655-662, 1998.

PIEN, S.; WYRZYKOWSKA, J.; SMART, C.; FLEMING, A. 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.

POWELL, A.L.T.; KALAMAKI, M.S.; KURIEN, P.A.; GURRIERI, S.; BENNET. A.B. 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.

PRIEST H.D., FILICHLIN S.A. AND MOCKLER T.C. *cis*-Regulatory elements in plant cell signaling. **Current opinion in Plant Biology**, v.12, p. 643-649, 2009.

PINTO- MAGLIO CAF, CRUZ ND. Pachytene chromossome morphology in *Coffea* L. II. *C.arabica* L. complement. **Caryologia**. V.51, p. 19-35, 1998.

PINO-NUNES. **Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Microtom)**. Tese Doutorado em Biologia na Agricultura Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

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

RIBAS, A. F. ; KOBAYASHI, A. K. ; PEREIRA, L. F. P. ; VIEIRA, L. G. E. . Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 4, p. 493-497, 2005.

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.

RIBAS, A F ; DECHAMP, E ; CHAMPION, A ; BERTRAND, B ; COMBES, M-C ; VERDEIL, J-L ; LAPEYRE, F ; LASHERMES, P ; ETIENNE, H. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 92, 2011.

RICK, C.M. Some cytogenetic features of the genome in diploid species. **Stadler Sym**, v.1, p. 153-174,1971.

RO S., KAUI C T., RENO N V., EWING N., LA PALOMA C T., DAVIS C A. Promoter of the tomato expansin gene LEEXP-1. **United States Patents**. No. US 6,340, 748 B1. 2002.

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.

SALGADO, L.R. Clonagem e análise da região promotora do gene Cr1tp1, uma proteína de transferência de lipídeos de frutos de *Coffea racemosa*. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia**. Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica, Londrina, PR, 2009.

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.

SANDELIN A., CARNINCI P., LENHARD B., PONJAVIC J., HAYASHIZAKI Y., HUME D.A. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. **Nature Reviews Genetics**, v.8, p. 424-436, 2007.

SATYANARAYANA, K.V. *et al.* Isolation of promoter for *N-methyltransferase* gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p.20-25, 2005

SCHERBAN, T.Y., SHI, J.; DURACHKO, D.M.; GUILTINANT, M.J.; MCQUEEN-MASON, S.J.; SHIEH, M.; COSGROVE, D.J. 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.

SESSA G, MELLER Y, FLUHR R. A GCC element and a G-box motif participate in ethylene-induced expression of the PRB-1b gene. **Plant Molecular Biology** v.28, p.145–15, 1995.

SHIRSAT A, WILFORD N, CROY R, BOULTER D. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. **Molecular and General Genetics**. v.215, p. 326-331, 1989.

SINGH K. B. transcriptional Regulation in Plants: The Importance of Combinatorial Control. **Plant Physiology**, v.118, p. 1111-1120, 1998.

SRIVASTAVA A AND HANDA AK. Hormonal Regulation of Tomato Fruit Development: A Molecular Perspective. **Journal of Plant Growth Regulation**. V. 24, p.67–82, 2005.

STEPHEN, T.S. & JAMES, T. The RNA polymerase II core promoter. **Annual Review of Biochemistry**, v.72, p.449–479, 2003.

STALBERG K, ELLERSTOM M, EZCURRA I, ABLOV S, RASK L. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. **Planta** v.199, p.515-519, 1996.

STALKER D M., PIER J R. Provided is a cotton (*Gossypium hirsutum*) promoter region from an expansin gene expressed in developing fiber. **United States Patent**. NO. US 6,566,586. 2003.

SUN T., ZHANG Y., CHAI T. Cloning, characterization, and expression of the *BjEXPA1* gene and its promoter region from *Brassica juncea* L. **Plant Growth Regulation**. v.64, n. 1, p. 39- 51, 2011.

SUTOH K, YAMAUCHI D. Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. **Plant Journal**. v.34, p. 635-645, 2003.

TANG W, PERRY SE. Binding site selection for the plant MADS domain protein AGL15:an in vitro and in vivo study. **Journal of Biological Chemistry**.v. 278, p.28154-28159, 2003.

TERZAGHI WB, CASHMORE AR. Light-regulated transcription. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Review. v.46, p.445-474, 1995.

- TRAINOTTI L, TADIELLO A AND CASADORO G. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 12, p. 3299–3308, 2007.
- TRAN L S, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, SIMPSON S D, FUJITA Y, MARUYAMA K, FUJITA M, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Isolation and functional analysis of arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. **Plant Cell**. V.16, p.2481-2498, 2004.
- TRIVEDI, K. P. ; NATH P. *MaExp1*, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit. **Plant Science**, v. 167, p.1351-1358. 2004.
- VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J.J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M. 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, 2006.
- VAN DER HOEVEN R., RONNING C., GIOVANNONI J., MARTIN G., TANKSLEY S. Deductions about the Number, Organization, and Evolution of Genes in the Tomato Genome Based on Analysis of a Large Expressed Sequence Tag Collection and Selective Genomic Sequencing. **The Plant Cell**. v.14, p. 1441-1456, 2002.
- 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.
- YANAGISAWA S, SCHMIDT RJ. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. **Plant Journal**. v.17, p. 209-214, 1999.
- YIN Y, WANG Z Y, MORA-GARCIA S, LI J, YOSHIDA S, ASAMI T, CHORY J. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. **Cell**. v.109, n. 2, p.181-91, 2002.
- YUAN S, WU Y, COSGROVE DJ. A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. **Plant Physiology**. V.127, n.1, p.324-333. 2001.
- ZHANG, N.; HASENSTEIN, K.H. Distribution of Expansins in Gravidresponding Maize Roots. **Plant Cell Physiology**, v. 41, p. 1305-1312, 2000.
- ZHANG M, YUAN B AND LENG P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, V. 60, N. 6, p. 1579–1588, 2009.
- ZHENG D. AND HRAZDINA G. Cloning and characterization of an expansin gene, RiEXP1, and a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene, RiACS1 in ripening fruit of raspberry (*Rubus idaeus* L.) **Plant Science**. v.179, n 1-2. p. 133–139, 2010.

6 ANEXO 1: ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA OMICS: A JOURNAL OF INTEGRATIVE BIOLOGY

Análise *in silico* de alpha expansinas durante a germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* – comparação da expressão gênica e análise de promotores

Abstract: Expansins are encoded by multigene families that are divided into four groups based on sequence similarity. The α -expansins compose the major subfamily and are involved on cell wall elongation, fruit softening, abscission, germination and pollination. Expansin expression during germination is associated with tissues where intense cell division occurs. Based on the global gene expression profiling datasets available for *Arabidopsis thaliana*, we discuss the regulation of five EXPA genes with preferential expression in germination. We also made an *in silico* promoter analysis of these genes based on public plant promoters datasets.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*. Germination. α -expansions. Promoters

6.1 INTRODUÇÃO

As expansinas são proteínas capazes de induzir a extensão de células isoladas, atuando como mediadoras em resposta ao pH ácido, catalisando a expansão da parede celular vegetal (McQUEEN-MANSON; DURACHKO; COSGROVE, 1992). Acredita-se que as expansinas atuem na quebra das ligações não covalentes de polissacarídeos entre paredes celulares (COSGROVE, 2005) estendendo de maneira irreversível a parede celular sem que ocorram modificações estruturais na parede, e alterações na sua plasticidade e elasticidade (YUAN; WU; COSGROVE, 2001).

A expansão celular é impulsionada pela captação de água no vacúolo central. Várias evidências mostram que o fluxo de água dentro da célula e o conseqüente alongamento da célula são iniciados pelo relaxamento induzido por estresse da parede celular. Aparentemente, as expansinas endógenas facilitam o acesso de enzimas hidrolíticas aos polímeros da parede celular (LEE et al., 2001).

As expansinas são uma superfamília de proteínas de vegetais composta por quatro famílias: α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), expansina-like A (EXLA) e expansina-like B (EXLB). A ação na extensão da parede celular só foi demonstrada experimentalmente para as proteínas das famílias EXPA

e EXPB. Até o momento para as outras duas famílias, EXLA e EXLB, são conhecidas somente as sequências gênicas, nenhum aspecto funcional foi ainda determinado para estas proteínas (SAMPEDRO e COSGROVE, 2005; COSGROVE 2005). As α -expansinas são responsáveis por controlar a extensão da parede celular e processos de desenvolvimento incluindo a dissociação e separação da célula (McQUEEN-MANSON, DURACHKO; COSGROVE, 1992; CHO; KENDE, 1997). As β -expansinas, que compõem a segunda maior família, promovem intensa degradação da parede celular dos grãos de pólen (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005) e estão envolvidas no crescimento e afrouxamento da parede celular que é associada com a invasão de tecidos maternos pelo tubo polínico (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005).

A atuação das expansinas no alongamento e expansão celular já foi observada em diferentes tecidos durante o crescimento tais como: hipocótilos (SCHERBAN et al., 1995; CADERAS et al., 2000) raiz e pêlos radiculares (ZHANG; HASENSTEIN, 2000; CHO; COSGROVE, 2002), xilema (COSGROVE; JONES, 2000; GRAY-MITSUMUNE et al., 2004) e folhas (PIEN et al., 2001; MULLER et al., 2006). Elas também se expressam em fases de desenvolvimento como maturação de frutos (ROSE et al., 1997; BRUMMELL et al., 1999, BUDZINSKI et al., 2011). O estudo da expansina *OsExp4* em arroz sugere que esta expansina pode estar relacionada ao tamanho do grão (CHOI, LEE e KENDI, 2003). Em trigo a análise transcricional de uma expansina de trigo (*Triticum aestivum* L.) detectou transcritos principalmente no pericarpo durante o início do desenvolvimento do grão e posteriormente em ambos, endosperma e pericarpo, sugerindo também que esta expansina pode estar associada ao tamanho final do grão (LIZANA et al., 2010). Em recente trabalho realizado por BUDZINSKI et al. (2011) o padrão de transcrição de três isoformas de α -expansinas (EXPA) foi identificado e caracterizado, em frutos do cafeeiro: *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*. As isoformas *CaEXPA1* e *CaEXPA3* mostraram mesmo padrão de transcrição no perisperma (tecido responsável pela definição do tamanho do grão do café). Já a isoforma *CaEXPA2* apresenta expressão específica no final da maturação em pericarpo.

Resultados preliminares utilizando promotores de expansinas de *Arabidopsis* fusionados ao gene reporter GUSA também indicam expressão específica de genes de expansinas durante a germinação de sementes, em

associação com zonas de abscisão da raiz ou tecidos onde ocorra divisão celular (COSGROVE et al., 1998). Desta forma, as expansinas destacam-se como proteínas responsáveis por promoverem o relaxamento da parede celular envolvidas em processos que requerem expansão celular como: organogênese, germinação de sementes, solubilização da parede, desenvolvimento e maturação dos frutos (COSGROVE, 1997).

A disponibilidade de centenas de trabalhos de expressão gênica da planta modelo *Arabidopsis thaliana* permite uma visão abrangente do perfil transcricional de vários genes nesta espécie. Grande parte destes estudos foram compilados nos bancos de dados Genevestigator (www.genevestigator.com) (ZIMMERMANN et al. 2004) e Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics (BAR; WINTER et al. 2007), que incluem uma série de estádios de desenvolvimento da planta e diversas condições ambientais.

A compreensão do padrão de expressão das expansinas durante a germinação das sementes em *A. thaliana*, pode servir de base para auxiliar futuros trabalhos com plantas dicotiledôneas de interesse agrônômico que possuam frutos e sementes, como é o caso do tomate (*Solanum lycopersicum*), café (*Coffea* sp.) e uva (*Vitis* sp.). Portanto, este trabalho tem por objetivo ampliar o conhecimento sobre o padrão de expressão de α -expansinas abundantes durante a germinação das sementes de *A. thaliana* através da comparação entre o padrão de expressão durante a germinação e da sequencia da região promotora, a partir das bases de dados disponíveis.

6.2 METODOLOGIA

6.2.1 Comparação do Perfil de Expressão de α -expansinas

Foram selecionadas todas as α -expansinas de *A. thaliana* presentes no bancos de dados Genevestigator (www.genevestigator.com) (ZIMMERMANN et al. 2004). Destas, apenas as que apresentaram nível expressão maior ou igual a 5 foram selecionadas para análises subsequentes. A partir destes dados foram selecionadas cinco α -expansinas (*AtExp2*- AT5G05290, *AtExp8*- AT2G40610, *AtExp9*- AT5G02260, *AtExp10*- AT1G26770, *AtExp20*- AT4G38210), que

apresentaram expressão preferencial em sementes. Estas cinco expansinas tiveram seu perfil de expressão analisado no banco de dados Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics (BAR - <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; WINTER et al. 2007).

6.2.2 Análise das Sequências Promotoras e Comparação Genômica in silico entre as Cinco α -expansinas

Para melhor compreender o padrão de expressão das cinco expansinas preferencialmente expressas durante a germinação, foram analisadas as seqüências 1000pb a montante da ORF em três bancos de dados específicos para a identificação de regiões promotoras: RegSite (<http://softberry.com>), PlantCare (LESCOT et al., 2002; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) e PLACE (HIGO et al., 1999; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>). Esta caracterização foi feita visando à busca de regiões regulatórias por comparação genômica entre os promotores.

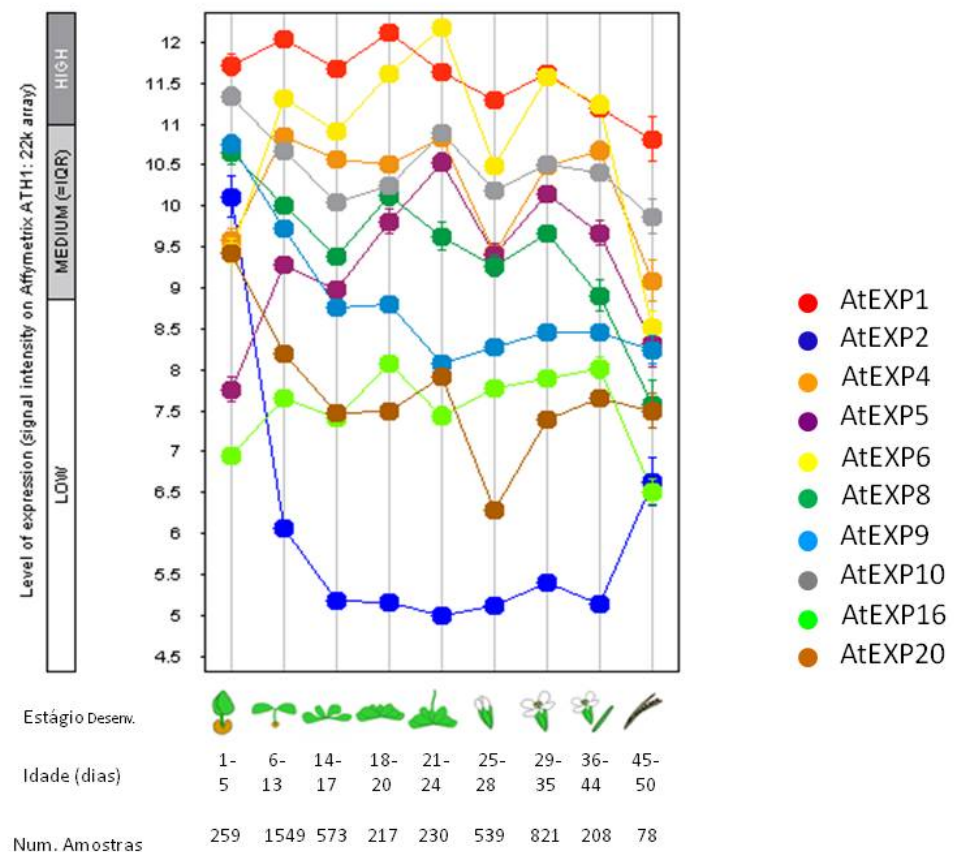
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Comparação do Perfil de Expressão de α -expansinas

O banco de dados Genevestigator (www.genevestigator.com) (ZIMMERMANN et al. 2004) foi utilizado para selecionar as α -expansinas de *A. thaliana* com maior expressão durante a fase de germinação de sementes. Foram analisadas 10 α -expansinas de *Arabidopsis* e destas, foram selecionadas cinco isoformas de EXPA (*AtExp2*, *AtExp8*, *AtExp9*, *AtExp10*, *AtExp20*) por apresentarem padrões de expressão predominante na germinação (1-5 dias). No caso da *AtExp1* apesar de apresentar alta expressão durante a fase de germinação, apresenta perfil de expressão constante para as demais fases de desenvolvimento vegetal. Já *AtExp4*, *AtExp5*, *AtExp6* e *AtExp16* apesar de apresentarem expressão durante a fase de germinação, apresentam maior pico de expressão após a germinação, entre 6-24 dias depois da germinação (DDG). Análises no banco de dados *Genevestigator* mostraram que as cinco *AtExp*s selecionadas também são co-

expressas em vários tecidos dentro os nove diferentes estádios de desenvolvimento com distintos padrões de expressão, porém apresentam aumento expressivo dos perfis transcricionais nas sementes (Figura 1).

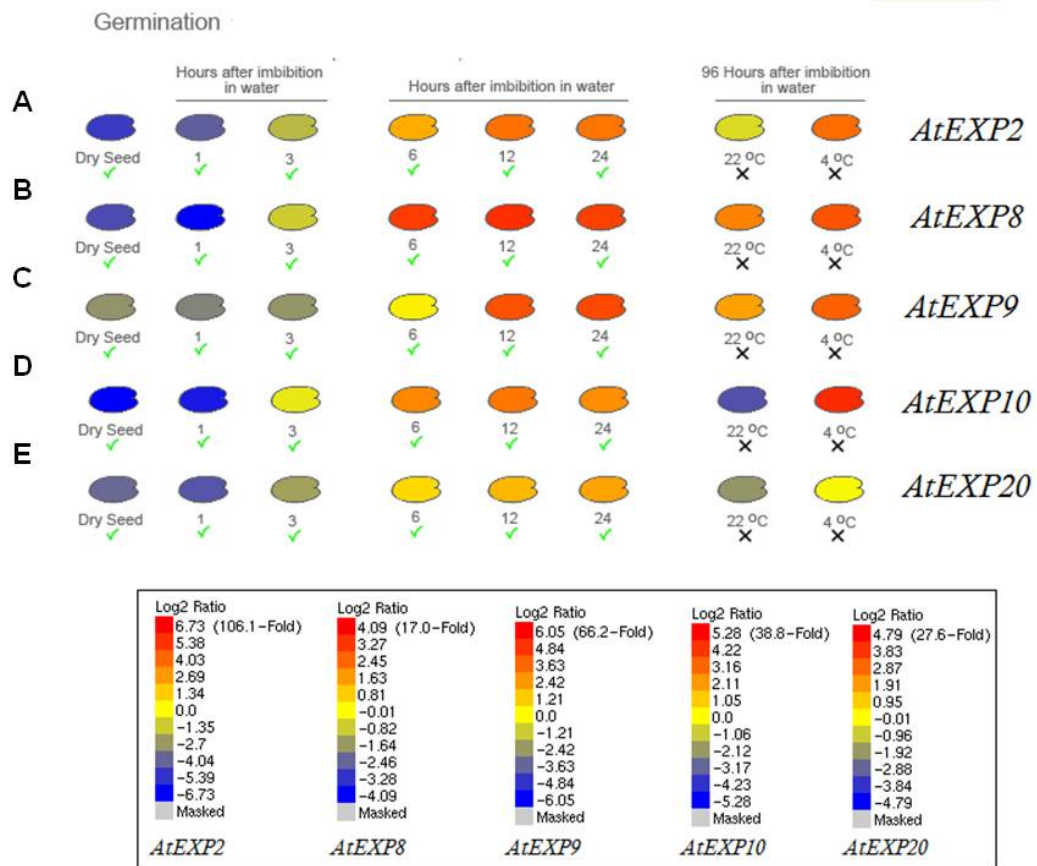
Figura 1 – Mapa de expressão gerado pelo *Genevestigator* que descreve o padrão de expressão de α -expansinas nas fases de desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*. As fases de desenvolvimento desde a germinação de semente até a senescência são agrupadas arbitrariamente baseado em BOYES et al. 2001. Cada etapa do desenvolvimento da planta é relacionada com a idade da planta e encontra-se na parte inferior do gráfico. Assim como o número de amostras em cada fase. Estes dados foram obtidos a partir do banco de dados: <https://www.genevestigator.com>



No caso de plantas com sementes a germinação inicia-se com a absorção de água pela semente e termina com o início do alongamento da raiz (BEWLEY & BLACK, 1994). Em sementes de *Arabidopsis* o embrião é rodeado por uma única camada de células do endosperma e tegumento, e esta camada de endosperma é responsável por regular o potencial de germinação (HOLDSWORTH

et al.,2008). A germinação em *Arabidopsis* consiste em duas fases sequenciais, a ruptura da testa e do endosperma. Uma das principais características relacionadas com a ruptura do endosperma pela expansão da radícula é o enfraquecimento do endosperma, e isto tem sido associado à indução por enzimas da parede celular, como a expansina (KUCERA et al., 2005). Com base no banco de dados BAR (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp> -WINTER et al., 2007) foram analisados os perfis de expressão de *AtExp2*, *AtExp8*, *AtExp9*, *AtExp10*, *AtExp20* em diferentes fases de desenvolvimento da sementes sob diferentes condições e tratamentos. Baseado no perfil transcricional observado na plataforma NASCArray (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays>), e no GeneChip ATH1 Affymetrix de NAKABAYSHI et al., (2005) todas as *AtExps* estudadas apresentaram maior expressão em sementes embebidas em água por 24 horas do que em sementes secas. As expansinas *AtExp2*, *AtExp9*, apresentaram transcritos em sementes embebidas em água a partir de 12 horas e as expansinas *AtExp8*, *AtExp10* e *AtExp20* começaram a se expressar em sementes embebidas em água a partir de 6 horas (NAKABAYSHI et al., 2005) (Figura 2). A expressão das cinco *AtExp* aumenta gradativamente até o pico máximo quando a semente esta 12 horas embebida em água, com diminuição da expressão com 24 horas (Figura 2 A-E), com exceção de *AtExp8* que mantém um grande numero de transcritos até 24 horas. As *AtExp10* e *AtExp20* apresentam menores diferenças de expressão entre as diferentes condições, o que sugere que estas isoformas têm menor influência da imersão em água em sua expressão (*AtExp10* com valores de 3,8; 4,5 e 3,52 sob 6, 12 e 24 horas; e *AtExp20* 1,64; 2,54 e 3,28 respectivamente) (Figura 2D-E). Baseado nos dados de Yamaguich et al. (2003) foi possível comparar a expressão das expansinas em sementes embebidas em água por 96 horas sob temperaturas de 22°C e 4°C. Todas as cinco expansinas apresentaram maior expressão a 4°C e a *AtExp20*, seguida por *AtExp2* apresentaram um maior diferencial na regulação da transcrição (Figura 2 A-E). Estes dados sugerem que a baixa temperatura tem influência na expressão das cinco α -expansinas.

Figura 2 – Perfis transcricionais de 5 isoformas de expansinas (A. *AtEXP2*; B. *AtEXP8*; C. *AtEXP9*; D. *AtEXP10*; E. *AtEXP20*) ao longo da germinação da semente. Nos gráficos em \log_2 o vermelho indica o nível de expressão mais alto e o azul o menor nível de expressão. Os dados foram gerados no banco de dados <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp> - WINTER et al., 2007.

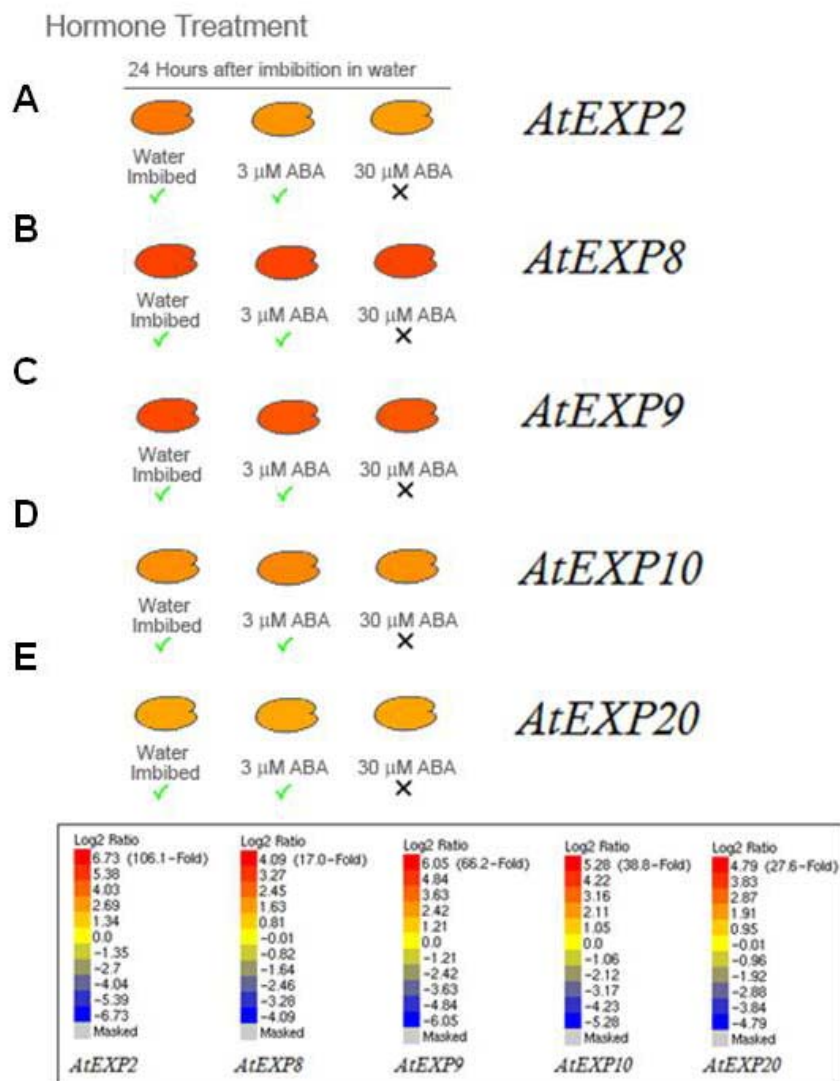


Além de dados referente à semente embebida ou não em água o banco de dados BAR eFP Browser também possibilita analisar a expressão dos genes sob diferentes tratamentos de hormônios como ABA e GA. A expressão de enzimas relacionadas ao afrouxamento da parede celular como a expansina no endosperma é regulada por dois fitorreguladores principais: giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA) (GROOT et al., 1987; TOOROP et al., 2000).

Após 24 horas embebidas em água, sementes foram tratadas com duas concentrações diferentes do hormônio ABA 3 μ M e 30 μ M (dados de NAMBARA - <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>). As *AtExp2*, *AtExp8* e *AtExp9* apresentaram redução na expressão quando tratadas com 3 μ M ABA (Figura 3 A-C). Já as *AtExp10* e *AtExp20* não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Figura 3 D-E) sugerindo que o ABA tem pouca influência no padrão transcricional

destas expansinas. Com relação à regulação pelo fitorregulador ABA, as proteínas de parede celular, como as expansinas, normalmente são reguladas negativamente (PENFIELD et al.,2006).

Figura 3 – Perfis transcricionais das 5 isoformas de expansinas (A. *AtEXP2*; B. *AtEXP8*; C. *AtEXP9*; D. *AtEXP10*; E. *AtEXP20*) em sementes tratadas com o hormônio ABA nas concentrações 3 μM e 30 μM . Nos gráficos em \log_2 o vermelho indica o nível de expressão mais alto e o azul o menor nível de expressão. Os dados foram gerados no banco de dados <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp> - WINTER et al., 2007.

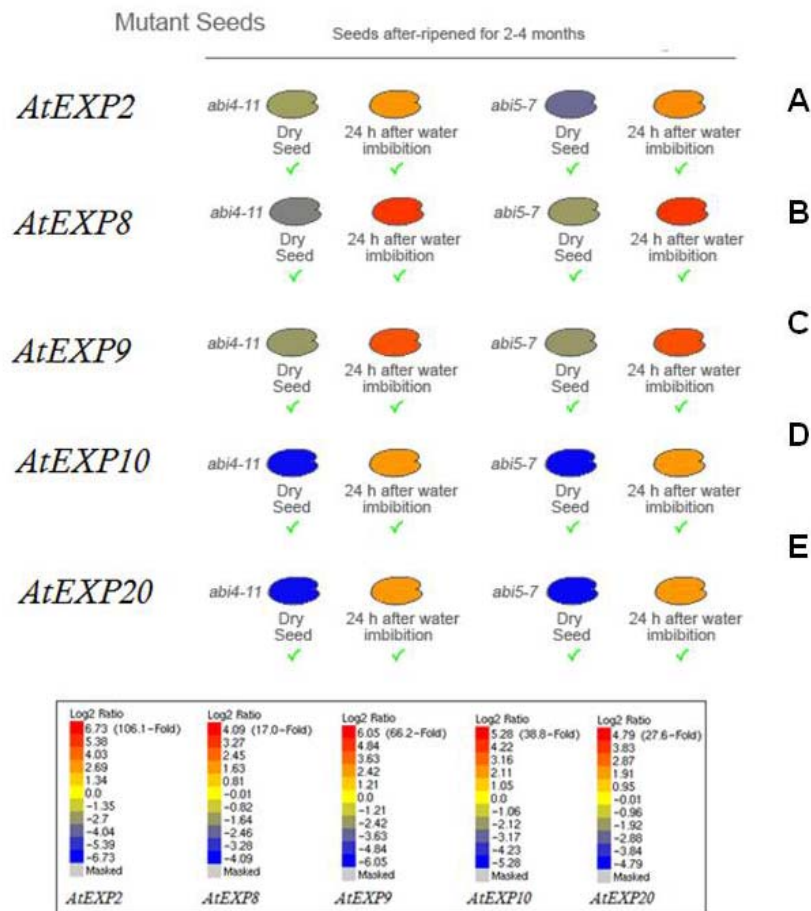


PENFIELD et al., (2006) investigaram o papel do endosperma no controle da germinação em *Arabidopsis* e demonstraram que o gene *ABI4* é determinante na sensibilidade de lipídios para mobilização do ABA durante a

germinação e que *ABI5* é um marcador para expressão na região micropilar do endosperma.

Quando plantas mutantes insensíveis ao fitorregulador ABA, *abi4-11* (deficiente na produção de ABI4) e *abi5-7* (deficiente na produção de ABI5), foram testadas sob condições de seca e embebidas em água por 24 hrs (NAKABAYSHI et al., 2005), as cinco expansinas tiveram maior expressão quando embebidas em água do que quando secas (Figura 4 A-E).

Figura 4 – Perfis transcricionais das 5 isoformas de expansinas (A. *AtEXP2*; B. *AtEXP8*; C. *AtEXP9*; D. *AtEXP10*; E. *AtEXP20*) em mutantes *abi4-11* e *abi5-7* insensíveis a ABA em sementes submetidas a seca e embebidas em água durante 24 horas. Nos gráficos em \log_2 o vermelho indica o nível de expressão mais alto e o azul o menor nível de expressão. Os dados foram gerados no banco de dados <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp> - WINTER et al., 2007.

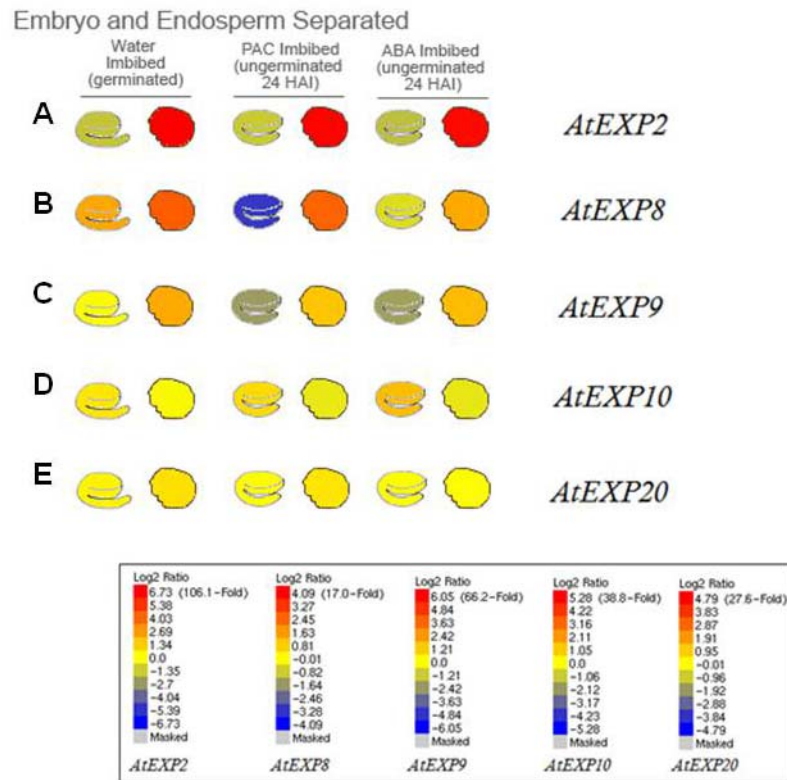


Em análise de embrião e endosperma sob três tratamentos, embebidos em água (controle), PAC (paclobutrazol – um inibidor de GA) e ABA por 24 horas (PENFIELD et al., 2006), *AtExp2* apresentou alta expressão e específica no

endosperma(Figura 6 A).Dentre os genes que são altamente expressos em endosperma de *Arabidopsis*, destaca-se a enzima de parede celular *AtExp2*. A fusão do promotor *AtExp2* com o gene repórter GUSA e análises *in silico* utilizando o Genevestigator mostraram que este gene é endosperma-específico e pode ser usado como marcador em sementes não dormentes embebidas ou com germinação de sementes (PENFIELD et al.,2006).

A *AtExp8* apresentou expressão em endosperma e em embrião em plantas embebidas em água. Para tratamento com ABA houve menor expressão da *AtExp8* do que o controle e no tratamento com PAC a expressão foi muito próxima a do controle (Figura 5 B). Em *AtExp9* a expressão no embrião é baixa e menor do que no endosperma, nos tratamentos houve diminuição da expressão em ambos os tecidos (Figura 5 C). *AtExp10* e *AtExp20* tiveram uma leve diminuição na expressão em endosperma nos dois tratamentos sendo que, *AtExp10* teve um leve aumento de expressão no tratamento com ABA enquanto a *AtExp20* uma leve diminuição (Figura 5 D e E) e o endosperma é menos sensível do que o embrião ao fitorregulador ABA (PENFIELD et al.,2004).

Figura 5 – Perfis transcricionais das 5 isoformas de expansinas (A. *AtEXP2*; B. *AtEXP8*; C. *AtEXP9*; D. *AtEXP10*; E. *AtEXP20*) analisadas em embrião e endosperma de sementes submetidas a 3 diferentes tratamentos (água, PAC e ABA). Nos gráficos em \log_2 o vermelho indica o nível de expressão mais alto e o azul o menor nível de expressão. Os dados foram gerados no banco de dados [http://bbc.botany.utoronto.ca/efp - WINTER et al., 2007](http://bbc.botany.utoronto.ca/efp-WINTER%20et%20al.,%202007).

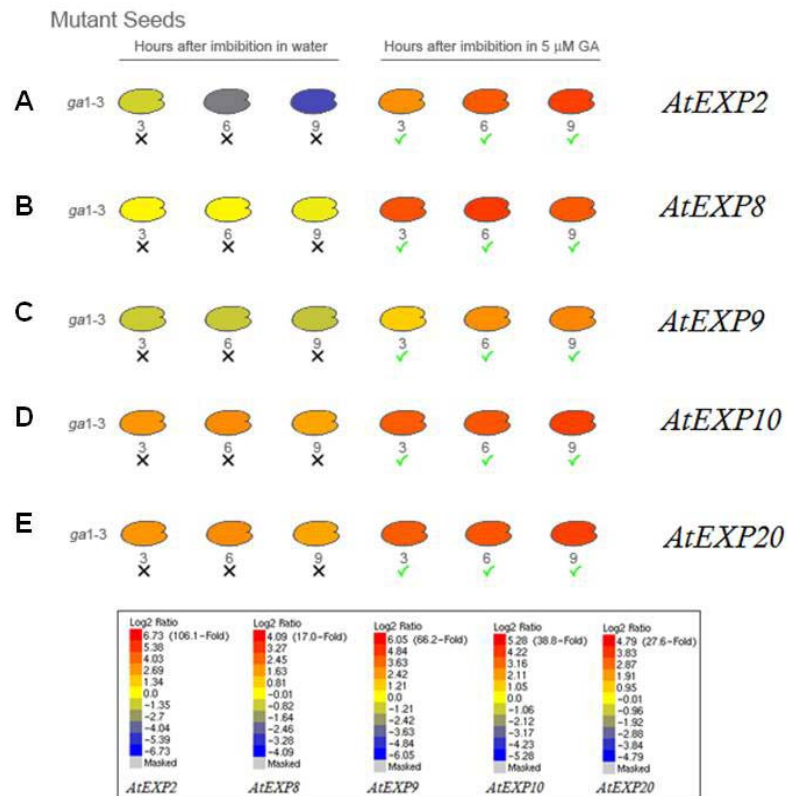


Em sementes mutantes (*ga1-3*) deficientes na síntese de GA (OGAWA et al., 2003). As expansinas *AtExp2*, *AtExp9* e *AtExp10* tiveram um aumento crescente no número de transcritos quando embebidas em GA por 3, 6 e 9 horas (Figura 6 A, C e D). O gene *AtExp2* teve diminuição no número de transcritos quando embebida por 3, 6 e 9 horas, sendo 9 horas com menor número de transcritos (Figura 6 A). Em *AtExp9* e *AtExp10* observa-se um número muito baixo de transcritos nos três tratamentos com água (Figura 6 C e D). O gene *AtExp8* não apresentou expressão quando embebida em água e teve um aumento crescente da expressão quando embebida por 3 e 6 horas com decréscimo em 9 horas (Figura 7 B). A expansina *AtExp20* apresentou aumento crescente da expressão nos dois tratamentos por 3, 6 e 9 horas (Figura 6 E).

Em tomate, expansinas expressas em sementes que são induzidas por GA já foram descritas (CHEN e BRADFORD, 2000; CHEN et al., 2001). Proteínas

de afrouxamento de parede celular, como expansinas e PME, foram descritas como sendo induzidas por GA durante a germinação, e a atividade destas proteínas pode estar associada ao enfraquecimento do tecido que envolve o embrião para facilitar o seu crescimento (OGAWA et al., 2003). Estes dados sugerem que todas as *AtExp* analisadas têm regulação dependente de GA, entretante a *AtExp2* parece ser diretamente influenciada por este hormônio.

Figura 6 – Perfis transcricionais das 5 isoformas de expansinas (A. *AtEXP2*; B. *AtEXP8*; C. *AtEXP9*; D. *AtEXP10*; E. *AtEXP20*) em sementes mutantes *ga1-3* durante tratamento com água e GA (hormônio giberelina). Nos gráficos em \log_2 o vermelho indica o nível de expressão mais alto e o azul o menor nível de expressão. Os dados foram gerados no banco de dados <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp> - WINTER et al., 2007.



6.3.2 Análise de Promotores

A fim de compreender o padrão de expressão das diferentes expansinas durante a germinação, foram analisadas seqüências dos promotores das α -expansinas (ProAtExps) (1000pb) utilizando três banco de dados disponíveis: Plant Care, Softberry e Place. A partir destes bancos, mais de 300 motivos foram

identificados nos cinco promotores. Entre estes, foram selecionados motivos mais relevante para a germinação de sementes.

Entre os motivos encontrados a maior parte esta relacionada à resposta a fitorreguladores, resposta a luz e semente específicos (Tabela 1). A análise pelo banco de dados Plant Care demonstra que 24 dos 46 motivos encontrados estão relacionados à resposta a luz e que ProAtExp2 e ProAtExp20 apresentam a maior quantidade destes motivos com 16 e 12, respectivamente.

O elemento regulatório RHERPATEXP7 encontrado por Cho e Cosgrove (2002) em ProAtExp7 de expansina de *Arabidopsis* foi identificado em todos os promotores com exceção do ProAtExp2.

Foram encontrados nos cinco promotores motivos relacionados ao fitorregulador giberelina, incluindo: o CAREOSREP1 que é expresso em células de aleurona de sementes de arroz (SUTOH e YAMAUCHI 2003) e que é encontrado apenas na ProAtExp9. Já o motivo GARE (GARE1OSREP1, SUTOH e YAMAUCHI, 2003) identificado previamente em um promotor de cisteína proteinase de arroz foi encontrado somente no ProAtExp2. O motivo GAREAT descrito por Ogawa et al., (2003) foi encontrado nos ProAtExp 2, 10 e 20. O elemento MYBGAHV também foi encontrado nos ProAtExp 2, 10 e 20. Este elemento já foi encontrado no gene de alfa amilase de cevada, ele é um componente central no complexo de resposta a giberelina GARC e está relacionado à resposta ao GA (GLUBER et al., 1999; OLSZEWSKI et al., 2002). O elemento TATCCA box, também relacionado ao complexo GARC (CHEN et al., 2006), está presente nos ProAtExp 8, 9, 10 e 20. Os elementos PYRIMIDINE box (CERCOS, GOMEZ-CADENAS e HO, 1999; SUTOH e YAMAUCHI 2003) e W box (ZHANG et al., 2000) estão relacionados com a coordenação da regulação dos hormônios ABA (ativada) e GA (reprimida) e estão presentes nos cinco promotores. Os dados de análise de expressão demonstram que as cinco expansinas analisadas têm expressão dependente de GA, sugerindo que os motivos de GA presentes nos promotores das cinco expansinas assim como o PYRIMIDINE box (CERCOS, GOMEZ-CADENAS e HO, 1999; SUTOH e YAMAUCHI 2003), que tem presença em todos os promotores, devem ter um papel relevante na regulação destes genes.

Dentre os elementos relacionados ao fitorregulador ABA (Tabela 1) destacam-se: ACGTABREMOTIFA2OSEM (HATTORI et al., 2002), DPBFCOREDCDC3 (FINKELSTEIN e LYNCH 2000), MYB (ABE et al., 2003; TRAN et al., 2004), RYREPEATBNNAPA (EZCURRA ET AL., 1999, 2000) e o CE1-like element (YANG et al. 2011). Os alvos destes fatores de transcrição são: 1) as sequências do motivo elemento RY para ABI3; 2) o elemento CE1-like para ABI4; e 3) ACGT- contendo ABRE para ABI5 (CARLES et al., 2002; KIM et al., 2002). EMBP1TAEM é sítio de ligação dos fatores transcrição EMBP-1 (GUILTINAN, MARCOTTE E QUATRANO 1990). O elemento ABRE (ABREZMRAB28), também identificado, foi descrito no gene *rab28* que é induzido por ABA em embriões e tecidos vegetativos de milho (PLA et al., 1993), em *Arabidopsis* este motivo responde ao ABA e também está relacionado a tolerância ao frio (BUSK e PAGES 1998; BENEDICT et al., 2006). O motivo LTRECOREATCOR15 responde tanto ao hormônio ABA (BUSK e PAGES 1998), como também pode ser responsiva a luz, mediado por um fitocromo (KIN et al., 2002a). O fator de transcrição MYB101 foi encontrado em endosperme de *Arabidopsis* (PENSFIELD et al., 2006). Três *locus* de insensibilidade ao fitorregulador ABA (ABI3, ABI4 e ABI5) foram identificados como codificando B3, AP2 e o fator de transcrição bZIP respectivamente (FINKELSTEIN e LYNCH, 2000; FINKELSTEIN et al., 1998; GIRAUDAT et al., 1992; LOPEZ-MOLINA e CHUA, 2000). Em sementes secas o elemento ABRE está relacionado com genes altamente expressos, entretanto, em sementes embebidas a partir de 6 horas não há relação entre o ABRE e a expressão dos genes, mostrando que houve uma mudança no perfil de mRNA. Apesar da presença de motivos de resposta ao fitorregulador ABA em todos os promotores, as *AtExp* analisadas parecem ter pouca influência deste hormônio em sua expressão, sugerindo que estes motivos estão relacionados a respostas secundárias como luz, frio e estresse hídrico.

Outros motivos relacionados à fitorreguladores formam os de resposta a etileno como: AGCBOXNPGLB (SATO et al. 1996), ERE (elemento responsivo ao etileno, RAWAT et al. 2005) e LECPLEACS2 (MATARASSO et al. 2005). Os motivos AGCBOXNPGLB e ERE foram encontrados no *ProAtExp2* sugerindo que além do GA atuar na regulação do gene *AtExp2*, o etileno também pode atuar regulando sua expressão. O *ProAtExp8* apesar de apresentar o elemento LECPLEACS2, um elemento de resposta positiva ao etileno, é reprimido por etileno

(NEMHAUSER , HONG e CHORY 2006). Esta observação sugere que ou este motivo pode atuar como repressor ou ele não está atuando na regulação deste gene. Dentre os promotores analisados ProAtExp 10 e 20 não apresentam nenhum motivo de resposta a etileno, entretanto apenas estes dois promotores apresentam o motivo ARFAT de resposta a auxina. Os motivos AUXREPSIAA4 e AUXRETGA1GMGH3 (TGA-box) também de resposta a auxina estão presentes nos ProAtExp9, 10 e 20.

Motivos relacionados com resposta a estresses abióticos como MYCCONSENSUSAT (BUSK e PAGES 1998) e CBFHV (XUE 2002) respondem principalmente a desidratação e ABA e RAV1AAT (AP2/ERF) são importantes em diversos processos como desenvolvimento e defesa a patógenos (KARVOLLA et al., 2011).

Nos promotores analisados foram encontrados 10 motivos responsivos a luz Os motivos GATA (GILMARTIN et al., 1990); I-box (ARGUELLO-ASTORGA e HERRERA-ESTRELLA 1998); GT1 (TERZAGHI e CASHMORE 1995) e SORLIP1AT (JIAO et al. 2005) estão presentes em todos os promotores. CATT-motif (CHANDRASHEKARA et al., 2006), G-box (CHANDRASHEKARA et al., 2006), GTGGC-motif (MONGKOLSIRIWATANA et al. 2009), GA-motif (MONGKOLSIRIWATANA et al.2009), e SP1 (MONGKOLSIRIWATANA et al. 2009). O motivo G-box além apresentar resposta a luz também responde ao fitorregulador etileno (SESSA, MELLER e FLUHR 1995) e não esta presente apenas no ProAtEXP8. O ProAtEXP20 parece responder ao ritmo circadiano com o motivo CIACADIANLELHC (PIECHULLA et al., 1998). ProAtExp2 e ProAtExp20 apresentam maior número de motivos relacionados a luz (Tabela1). A luz atua acidificando a parede celular (ELZENGA et al. 2000), e a acidificação celular é uma condição fundamental para a atividade das expansinas (COSGROVE 1996).

Alguns dos elementos tecido específico que conferem expressão em semente como: EBOXBNNAPA (STALBERG et al., 1996), DOFCOREZM (YANAGISAWA e SCHMIDT 1999), A-box (ACGTABOX) (TOYOFUKU , UMEMURA e YAMAGUCHI, 1998) e POLASIG1 (O'NEILL et al. 1990) estão presentes em todos os promotores.

Tabela1– Comparação dos principais motivos encontrados em cinco promotores de expansina de *Arabidopsis*

Função	Motivo	Sequência	ProExp2	ProExp8	ProExp9	ProExp10	ProExp20
Iniciador Expansina GA	TATA-box	TATA	+	+	+	+	+
	RHERPATEXPA7	KCACGW	-	+	+	+	+
	CAREOSREP1	CAACTC	-	-	+	-	-
	(CAACTC) http://www.dna.affrc.go.jp/sigscan/disp.cgi?S000497	TAACAGA	+	-	-	-	-
		TAACAAR	+	-	-	+	+
			-	+	+	+	+
			-	-	-	-	+
	GARE-motif (GARE1OSREP1)	TATCCA	+	+	+	+	+
	MYBGAHV (GARC)	CCTTTTG					
	TATCCA box	TTTTTTCC					
ABA	P-box						
	PYRIMIDINE BOX						
	ABREZMRAB28	CCACGTGG	+	-	-	-	+
	ACGTABREMOTIFA		+	-	+	-	-
	2OSEM	ACGTGKC	+	+	+	+	+
	CE1-like element	ACACNNG	-	+	+	-	+
	DPBFCOREDCDC3		+	-	-	+	+
	EMBP1TAEM	GCCACCG	-	-	+	-	-
	LTRECOREATCOR15		+	+	+	+	+
	MYB	CACGTGGC	+	+	+	+	+
Etileno	WBOX	CCGAC					
		TAACTG					
		TGAC					
	AGCBOXNPGLB	AGCCGCC	+	-	+	-	-
Auxina	ERE (ERELEE4)	AWTTCAAA	+	+	-	-	-
	LECPLEACS2	TAAAATAT					
	ARFAT		-	-	-	+	+
Luz	AUXREPSIAA4		-	-	-	-	+
	AUXRETGA1GMGH3 (TGA-box)	TGACGTAA	-	-	+	+	-
	CATT-motif	GCATTC	+	-	+	-	+
	CIACADIANLELHC	CAANNNNAT	-	-	-	-	+
	GA-motif	C	+	-	-	-	-
	GATA-motif	ATAGATAA	+	+	+	+	+
	G-box	AAGATAAGA					
	GTGGC-motif	TT	+	-	+	+	+
	GT1	CTTCCACGT	-	-	-	-	+
	IBOX	GGCA	+	+	+	+	+
Estresse abiótico	SORLIP1AT	GATTCTGTG					
	Sp1	GC	+	+	+	+	+
		GGTTAA	+	+	+	+	+
		aAGATAAGA	-	-	-	+	-
		/CTCTTATG					
		CT					
		GCCACC					
		C(G/A)CCC					
	CBFHV	RYCGAC	-	-	+	-	+
	MYCCONSENSUSAT	CANNTG	+	+	+	+	+
Semente	T	CAACA	-	+	+	+	+
	RAV1AAT						
	2SSEEDPROTBANA		-	-	-	-	+
	PA	TGHAARK	+	-	+	+	+
	-300ELEMENT	AACAAAC	+	-	-	+	-
	AACACOREOSGLUB1	ACGTA	+	+	+	+	+
	A box (ACGTABOX)	TAACARA	+	-	-	+	+
AMYBOX1	CAAT	-	-	-	-	+	
		+	+	+	+	+	

AMYBOX2		-	-	-	-	+
CAATBOX	CGACG	-	-	+	-	+
CANBNNAPA	AAAG	+	+	+	+	+
CGACGOSAMY3	CANNTG	+	+	+	+	+
DOF	AATAAA	+	+	+	+	+
EBOXBNNAPA	CATGCY	+	+	+	-	-
POLASIG1	ATATTTAW	-	+	+	+	-
RYREPEAT (RY-box)	W	+	+	+	+	-
SEF1MOTIF	RTTTTTTR	+	-	+	-	-
SEF4MOTIFGM7S	TATCCA					
TGACGTVMAMY						

6.4 REFERÊNCIAS

ABE H, URAO T, ITO T, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.

Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **Plant Cell** v.15, p. 63-78, 2003.

ARGÜELLO-ASTORGA G AND HERRERA-ESTRELLA L. Evolution of light-regulated plant promoters. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v. 49, p.525-555, 1998.

BENEDICT C, SKINNER JS, MENG R, CHANG Y, BHALERAO R, HUNER NPA, FINN CE, CHEN THH, HURRY V. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. **Plant, Cell and Environment** v.29, p.1259-1272,2006.

BRUMMEL, D.A.; HARPSTER, M.H.; CIVELLO, P.M.; PALYS, J.M.; BENNETT, A.B.; DUNSMUIR, P. 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.

BUDZINSKI I G F.; SANTOS T B.; SERA T.; POT D.; VIEIRA L G E.; PEREIRA L F P. Expression patterns of three α -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. **Plant Biology**. V. 13, n. 3, p. 462-471, 2011.

BUSK PK, PAGES M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. **Plant Mol Biol Review** v.37, p.425-435, 1998.

CADERAS, D.; MUSTER, M.; VOGLER, H.; MANDEL, T.; ROSE, J.K.C.; MCQUEEN-MANSON, S.; KUHLEMEIER, C. Limited Correlation between Expansin Gene Expression and Elongation Growth Rate. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1399–1413, 2000.

CARLES C, BIES-ETHEVE N, ASPART L, LÉON-KLOOSTERZIEL K, KOORNNEEF M, ECHEVERRIA M, DELSENY M. Regulation of *Arabidopsis thaliana* *Em* genes: role of ABI5. **The Plant Journal**. V.30, n.3, p.373-383, 2002.

CERCOS M, GOMEZ-CADENAS A, HO THD. Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements

involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. **Plant J** v.19, p.107-118, 1999.

CHANDRA-SHEKARA A. C., GUPTA M, NAVARRE D, RAINA S, RAINA R, KLESSIG D AND KACHRO P. Light-dependent hypersensitive response and resistance signaling against Turnip Crinkle Virus in Arabidopsis. **The Plant Journal** v.45, p.320–334, 2006.

CHENG WH, ENDO A, ZHOU L, PENNEY J, CHEN HC, ARROYO, A, LEON P, NAMBARA E, ASAMI T, SEO M, KOSHIBA T, SHEEN J. A unique short-chain dehydrogenase-reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. **Plant Cell**. v.14, p.2723-43, 2002.

CHEN F, DAHAL P, AND 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.

CHEN F AND BRADFORD K J. Expression of an Expansin Is Associated with Endosperm Weakening during Tomato Seed Germination. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1265–1274, 2000.

CHEN P-G, CHIANG C-M, TSENG T-H AND YU S-M. Interaction between Rice MYBGA and the Gibberellin Response Element Controls Tissue-Specific Sugar Sensitivity of α -Amylase Genes. **The Plant Cell**. v.18, p.2326-2340 , 2006.

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

COSGROVE D J. Relaxation in a high-stress environment: The molecular basis of extensible walls and cell enlargement. **Plant Cell**. v. 9. n.7, p. 1031-1041, 1997.

COSGROVE, D.J. Cell wall loosening by expansins. **Plant Physiology**, v. 118, p. 333–339, 1998.

COSGROVE D J. Growth of the plant cell wall. **Nat Rev Mol Cell Biol**. Review. v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

ELZENGA J T M, STAAL M, PRINS H B A. Modulation by phytochrome of the blue light-induced extracellular acidification by leaf epidermal cells of pea (*Pisum sativum* L.): a kinetic analysis. **The Plant Journal**. V. 22, n. 5, p. 377-389, 2000.

EZCURRA I, ELLERSTROM M, WYCLIFFE P, STALBERG K, RASK L. Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. **Plant Mol Biol** v. 40, p.699-709, 1999.

EZCURRA I, WYCLIFFE P, NEHLIN L, ELLERSTROM M, RASK L. Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved

B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. **Plant J** v.24, p.57-66, 2000.

FINKELSTEIN, R.R., WANG, M.L., LYNCH, T.J., RAO, S. AND GOODMAN, H. The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. **Plant Cell**, 10, 1043– 1054, 1998.

FINKELSTEIN RR, LYNCH TJ . The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. **Plant Cell**. v.12, p. 599-609, 2000.

GILMARTIN PM, SAROKIN L, MEMELINK J, CHUA N-H. Molecular light switches for plant genes. **Plant Cell** v.2, p.369-378, 1990.

GIRAUDAT, J., HAUGE, B.M., VALON, C., SMALLE, J., PARCY, F. AND GOODMAN, H.M. Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. **Plant Cell**, v.4, p. 1251–1261, 1992.

GUBLER, F., RAVENTOS, D., KEYS, M., WATTS, R., MUNDY, J., AND JACOBSEN, J.V. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. **Plant J**. v.17, p.1–9, 1999.

GUILTINAN M J, MARCOTTE JR W R, QUATRANO R S. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. **Science**. V.250, n. 4978, p. 267-271, 1990.

GROOT, S.P.C. AND KARSSSEN, C.M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**, v.171,p. 525–531, 1987.

HATTORI T, TOTSUKA M, HOBO T, KAGAYA Y, YAMAMOTO-TOYODA A Experimentally Determined Sequence Requirement of ACGT-Containing Abscisic Acid Response Element. **Plant Cell Physiol** v.43, p. 136-140, 2002.

HIGO K., UGAWA Y., IWAMOTO M. AND KORENAGA T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. **Nucleic Acids Research**, v.27 N.1 p. 297-300, 1999.

HOLDSWORTH MJ, FINCH-SAVAGE WE, GRAPPIN P, JOB D. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. **Trends In Plant Science**.13, p. 7–13, 2008.

JIAO Y, MA L, STRICKLAND E, DENG XW. Conservation and Divergence of Light-Regulated Genome Expression Patterns during Seedling Development in Rice and Arabidopsis. **Plant Cell**. v.17, p. 3239-3256, 2005.

KARLOVA R., ROSIN F M, BUSSCHER-LANGE J, PARAPUNOVA V, DO P T, FERNIE A R., FRASER P D, BAXTER C, ANGENENT G C, AND DEMAAGD R A. Transcriptome and Metabolite Profiling Show That APETALA2a Is a Major Regulator of Tomato Fruit Ripening. **The Plant Cell**, v. 23, p. 923–941, 2011.

KIM SY, MA J, PERRET P, LI Z, THOMAS T L. Arabidopsis ABI5 Subfamily members Have Distinct DNA-Binding and Transcriptional Activities. **Plant Physiology**. V. 130, n. 2, p. 688-697, 2002.

KIM H-J, KIM Y-K, PARK J-Y AND KIM J. Light signalling mediated by phytochrome plays a important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal** v29, n.6, p.693-704, 2002^a.

KERMODE AR. Role of abscisic acid in seed dormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**. V. 24, p.319-344, 2005.

KUCERA B, COHN MA, LEUBNER-METZGER G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research** v.15, p. 281–307, 2005.

LEE Y., CHOI D AND KENDE H. Expansins: ever-expanding numbers and functions. **Current opinion in Plant biology**, v.4, p. 527-532, 2001.

LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZE P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic Acids Res** v.30, n.1, p.325-327, 2002.

LIZANNA X C., RIEGEL R, GOMES L D, HERRERA J, ISLA A, McQUEEN-MANSON S J., CALDERINI D F. Expansins expression is associated with grain size dynamics in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 4, p. 1147–1157, 2010.

LOPEZ-MOLINA, L. AND CHUA, N.-H. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in Arabidopsis thaliana. **Plant Cell Physiol**. V.41, p. 541–547, 2000.

MATARASSO N, SCHUSTER S, AVNI A. A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase gene expression. **Plant Cell**. v.17, p.1205-1216, 2005.

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.

MONGKOLSIRIWATANA C, PONGTONGKAM P, PEYACHOKNAGUL S. *In silico* Promoter Analysis of Photoperiod-Responsive Genes Identified by DNA Microarray in Rice (*Oryza sativa* L.) **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** v.43 : p. 164 – 177, 2009.

NAKABAYASHI K, OKAMOTO M, KOSHIBA T, KAMIYA Y, NAMBARA E. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **Plant Journal** v.41, p. 697–709, 2005.

NEMHAUSER J L, HONG F, AND CHORY J. Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. **Cell**. v.126, p.467-475, 2006.

OGAWA M, HANADA A, YAMAUCHI Y, KUWALHARA A, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. **Plant Cell**. v.15, p.1591–1604, 2003.

OLSZEWSKI N, TAI-PING SUN T-P AND GUBLER F. Gibberellin Signaling. **The Plant Cell**. v.14, p.561-580, 2002.

PENFIELD S, RYLOTT EL, GILDAY AD, GRAHAM S, LARSON TR, GRAHAM IA. Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyls elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1. **Plant Cell** v.16, p.2705–2718, 2004.

PENFIELD, S., LI, Y., GILDAY, A. D., GRAHAM, S. & GRAHAM, I. A. Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. **Plant Cell**. v.18, p.1887–1899, 2006.

PIECHULLA B, MERFORTH N, RUDOLPH B. Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. **Plant Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 655-662, 1998.

PLA M, VILARDELL J, GUILTINAN MJ, MARCOTTE WR, NIOGRET MF, QUATRANO RS, PAGÈS M. The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene rab28. **Plant Mol Biol**. v.21, n.2, p.259-66, 1993.

RAWAT R, XU ZF, YAO KM, CHYE ML. Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the Solanum melongena gene encoding cysteine proteinase. **Plant Mol Biol**. V. 57, p. 629-643, 2005.

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.

SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D.J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, v. 6, p. 242.1-241.11, 2005.

SATO F, KITAJIMA S, KOYAMA T, YAMADA Y. Ethylene-induced gene expression of osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC cis-sequence. **Plant Cell Physiol** v.37, p. 249-255, 1996.

SCHERBAN, T.Y., SHI, J.; DURACHKO, D.M.; GUILTINANT, M.J.; MCQUEEN-MASON, S.J.; SHIEH, M.; COSGROVE, D.J. 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.

SESSA G, MELLER Y, FLUHR R. A GCC element and a G-box motif participate in ethylene-induced expression of the PRB-1b gene. **Plant Mol Biol** v.28, p.145–15, 1995.

SUTOH K, YAMAUCHI D. Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. **Plant J.** v.34, p. 635-645, 2003.

TERZAGHI WB, CASHMORE AR. Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Review. v.46, p.445-474, 1995.

TOOROP, P.E., VAN AELST, A.C., AND HILHORST, H.W. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. **J. Exp. Bot.** v.51, p.1371–1379, 2000.

TOYOFUKU K, UMEMURA T, YAMAGUCHI J. Promoter elements required for sugar-repression of the RAm3D gene for alpha-amylase in rice. **FEBS Lett** v. 428, p.275-280, 1998.

TRAN L S, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, SIMPSON S D, FUJITA Y, MARUYAMA K, FUJITA M, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Isolation and functional analysis of arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. **Plant Cell.** V.16, p.2481-2498, 2004.

YANAGISAWA S, SCHMIDT RJ. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. **Plant J.** v.17, p. 209-214, 1999.

YANG Y, YU X, SONG L, AN C. ABI4 Activates *DGAT1* Expression in *Arabidopsis* seedlings during Nitrogen Deficiency. **Plant Physiology.** V.156, p. 873-883, 2011.

YUAN S, WU Y, COSGROVE DJ. A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. **Plant Physiol.** V.127, n.1, p.324-333. 2001.

XUE GP. Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. **Nucleic Acids Res.** V 30, e77, 2002.

ZIMMERMANN P, HIRSCH-HOFFMANN M, HENNIG L, GRUISSEM W. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox **Plant Physiol** v.136, p.2621–2632, 2004.

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

WINTER D, VINEGAR B, NAHAL H, AMMAR R, WILSON GV, PROVART NJ. An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. **PLoS ONE** v. 2, e718, 2007.