

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Fernanda Lattario Ribeiro**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE cDNAs  
EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE DURANTE A  
MATURAÇÃO DOS FRUTOS DE *Coffea arabica* L.**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do título de  
mestre em Biologia Celular e Estrutural  
na área de Biologia Celular.

**Orientadora: Dra. Laura Maria Marical Ottoboni**

**Co-orientadora: Dra. Mirian Perez Maluf**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Ribeiro, Fernanda Lattario**

**R354i**

Identificação e caracterização de cDNAs expressos diferencialmente durante a maturação dos frutos de *Coffea arabica* L. / Fernanda Lattario Ribeiro. -- Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni

Co-orientadora: Mirian Perez Maluf

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Café. 2. Maturação. 3. Biologia Molecular. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Maluf, Mirian Perez. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 24 de março de 2004.

**Banca Examinadora**

Profª. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (Orientadora)

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Profª. Dra. Marília Gaspar Maïs

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Prof. Dr. José Camillo Novello

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Prof. Dr. Oliveiro Guerreiro Filho

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ser realizado sem a contribuição de algumas pessoas e fé em Deus. Muito obrigada...

À Dra. Laura pela orientação e pela oportunidade.

À Dra. Mirian Perez Maluf pela co-orientação, pela ajuda e pelas sugestões.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos Drs. Oliveiro Guerreiro Filho, Angelo Cortelazzo e Marília Gaspar pelas sugestões e críticas ao trabalho.

Aos Drs. José Camillo Novelo, Marília Gaspar e Oliveiro Guerreiro Filho por fazerem parte da banca examinadora deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular pela atenção e boa vontade com que sempre me atenderam.

Aos companheiros de bancada Fabio, Wagner, Tânia, Rogério, Renato, Renata, Maíra, Aline e Juarez pela ajuda durante os experimentos e pela convivência no dia a dia do laboratório.

Aos meus pais, Marco e Angela, pela amizade, por acreditarem em mim, me apoiarem e não me deixarem desanimar nunca por pior que a situação parecesse. Eu amo vocês!

Aos meus irmãos, Flavia e Marco, pelo carinho, amizade e por abrir mão do computador. Amo vocês também!

À Mônica pela amizade, pelo companheirismo nas horas difíceis e nas horas alegres, por aturar meu mau humor na correria da tese e por torcer por mim sempre.

À Luciana pela amizade e pelo apoio em todas as horas.

À Ana pela amizade, pelo apoio nas horas difíceis e pelas longas conversas.

À Kelly, Liliana, Samantha e Mônica por fazerem dos almoços de sextas-feiras algo para ser lembrado.

Ao Fabio pelas conversas e discussões.

Ao Wagner por testar diariamente minha paciência e bom humor.

Aos amigos que estão longes, mas que nunca deixaram de se importar.

**Aos meus amores,  
Pai, Mãe, Fá  
e Nem.**

## ÍNDICE

RESUMO .....	9
SUMMARY .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
1. Origem e histórico do café .....	11
2. <i>Coffea arabica</i> L. ....	12
3. O fruto do café .....	14
4. Expressão gênica durante o desenvolvimento e maturação do fruto .....	16
5. Utilização de <i>display</i> diferencial de mRNA para a identificação de genes específicos .....	19
OBJETIVOS .....	22
MATERIAL E MÉTODOS .....	23
1. Coleta do material biológico .....	23
2. Isolamento de RNA total .....	23
3. <i>Display</i> diferencial de mRNA .....	25
3.1. Síntese de cDNA .....	25
3.2. PCR a partir do cDNA e eletroforese das amostras amplificadas .....	25
3.3. Isolamento, eluição e reamplificação dos cDNAs diferenciais .....	26
4. Confirmação da expressão diferencial através de experimentos de <i>slot blot</i> .....	27
4.1. Transferência dos cDNAs isolados dos géis de <i>display</i> diferencial de mRNA para membranas de nylon .....	27
4.2. Obtenção de sondas radioativas e hibridização das membranas .....	27
4.3. Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de <i>slot blot</i> .....	28

<b>5. Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs diferenciais .....</b>	<b>28</b>
5.1. Reação de ligação .....	28
5.2. Transformação bacteriana .....	29
5.3. Isolamento de DNA plasmidial .....	29
5.4. Seqüenciamento .....	30
5.5. Análise das seqüências .....	30
<b>6. Caracterização dos cDNAs diferenciais através de <i>slot blot</i> de RNA .....</b>	<b>31</b>
6.1. Transferência do RNA total dos frutos para membranas de nylon .....	31
6.2. Obtenção de sondas radioativas e hibridização das membranas .....	31
 <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	 <b>33</b>
 <b>1. Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente através de <i>display</i> diferencial de mRNA .....</b>	 <b>33</b>
<b>2. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados dos géis de <i>display</i> diferencial de mRNA através de <i>slot blot</i> .....</b>	<b>35</b>
2.1. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os <i>primers</i> T <sub>12</sub> VC-OPJ10 .....	36
2.2. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os <i>primers</i> T <sub>12</sub> VC-OPJ08 .....	38
2.3. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os <i>primers</i> T <sub>12</sub> VG-OPJ10 .....	40
<b>3. Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs que tiveram expressão diferencial confirmada .....</b>	<b>42</b>
<b>4. Análise das seqüências e caracterização através de <i>slot blot</i> de RNA dos cDNAs com expressão mais acentuada no estágio verde .....</b>	<b>44</b>
<b>5. Análise das seqüências e caracterização através de <i>slot blot</i> de RNA dos cDNAs com expressão mais acentuada no estágio amarelo .....</b>	<b>60</b>
<b>6. Análise das seqüências e caracterização através de <i>slot blot</i> de RNA dos cDNAs com expressão mais acentuada no estágio vermelho .....</b>	<b>64</b>

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>



## RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de café sendo Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo os Estados com maior produção. Setenta e quatro por cento da área utilizada para o cultivo do café no Brasil é ocupada por lavouras de *Coffea arabica* L., sendo que os cultivares predominantes são Catuaí e Mundo Novo. O cafeeiro é uma planta de porte arbustivo, podendo atingir até 4 m de altura. O fruto apresenta uma casca lisa e brilhante que passa do verde para o vermelho de acordo com as diferentes fases da maturação. Apesar da sua importância econômica, pouco se sabe sobre os genes envolvidos no desenvolvimento e maturação do fruto do café. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo a identificação de cDNAs expressos diferencialmente durante a maturação dos frutos de *Coffea arabica* L., cultivar Mundo Novo IAC 501-5, através de *display* diferencial de mRNA. Foram isolados 94 cDNAs utilizando 3 combinações de *primers*: T<sub>12</sub>VC-OPJ10, T<sub>12</sub>VC-OPJ08 e T<sub>12</sub>VG-OPJ10. Setenta e três dos 94 cDNAs isolados tiveram a expressão diferencial confirmada: 57 com expressão mais acentuada em frutos no estágio verde, 2 no estágio amarelo e 14 no estágio vermelho. Os 33 cDNAs que apresentaram os maiores coeficientes de expressão foram clonados e seqüenciados. Alguns destes cDNAs apresentaram seqüências repetidas, restando assim, 19 seqüências. O alinhamento das seqüências foi feito com o auxílio do programa Clustal W (V. 1.82). As seqüências foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados com o auxílio do programa BLASTX (V. 2.2.6). As seqüências de 10 cDNAs (5 com expressão mais acentuada no estágio verde, 2 no estágio amarelo e 3 no vermelho) apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados. Os cDNAs com expressão mais acentuada no estágio verde apresentaram similaridade com globulina, nodulina, proteína de ligação a GTP – Rab7, ATP sintase e proteína carreadora de ubiquitina. Os cDNAs com expressão mais acentuada no estágio amarelo apresentaram similaridade com proteína do tipo bZIP que responde ao ácido abscísico e ubiquitina. Os cDNAs com maior expressão no estágio vermelho apresentaram similaridade com proteína de ligação a GTP – Ras, transposase e oxidoreductase. O padrão de expressão destes cDNAs durante o desenvolvimento e maturação do fruto foi analisado através de experimentos de *slot blot* de RNA.

## SUMMARY

Brazil is the major world coffee producer country, and Minas Gerais, Espírito Santo and São Paulo are the States with the largest production. *Coffea arabica* L. plantations occupy seventy four percent of the agricultural area used for coffee production in Brazil. The most cultivated varieties are Catuaí and Mundo Novo. The coffee tree can reach a height of approximately 4 m. The fruit contains two seeds and a green color when is young. This color changes to yellow and then to red, when the fruit ripens. Despite its economic importance, the knowledge regarding the development and ripening of coffee fruits is very restrict. Therefore, the purpose of this work was to identify differentially expressed cDNAs during *Coffea arabica* L., cultivar Mundo Novo IAC 501-5, fruit ripening. For this, the mRNA differential display technique was performed using different primers combinations: T<sub>12</sub>VC-OPJ10, T<sub>12</sub>VC-OPJ08 and T<sub>12</sub>VG-OPJ10. A total of ninety four differentially expressed cDNAs were isolated and 73 had their differential expression confirmed by slot blot experiments. Among these, 57 exhibited higher expression in green fruits, 2 in yellow and 14 in red fruits. Thirty-three cDNAs were cloned and sequenced. Sequences were aligned with Clustal W (V. 1.82) and then compared with Gen Bank sequences using BLASTX (V. 2.2.6). Only sequences of 10 cDNAs (5 with higher expression in the green fruit, 2 in the yellow and 3 in the red) showed similarity with Gen Bank sequences. The cDNAs with higher expression in the green fruit showed similarity to globulin, nodulin, small GTP-binding protein – Rab7, ATP synthase and ubiquitin carrier protein. The cDNAs with higher expression in the yellow fruit showed similarity to a bZIP protein responsive to ABA and ubiquitin. The ones with higher expression in the red fruit showed similarity to a Ras-like small GTP-binding protein, a transposase and a oxidoreductase. The pattern of expression of these cDNAs during coffee fruit development and ripening was analyzed by RNA slot blot experiments.

# INTRODUÇÃO

## 1. Origem e histórico do café

Acredita-se que o Oriente Médio, especialmente a região de Kaffa, na Etiópia, conhece o café há cerca de mil anos. No século XV os povos árabes já faziam uso do café e foram eles que iniciaram o cultivo do café, por isso o nome *Coffea arabica*, e em vão tentaram guardar tal privilégio. Os árabes também iniciaram o consumo do café através da bebida ao invés de mascar ou comer como faziam os etíopes e este hábito rapidamente se propagou na Europa (Carvalho, 1993).

Por volta de 1700, as primeiras mudas de café chegaram a Europa, sendo plantadas no Jardim Botânico de Amsterdã e no Jardim Botânico de Paris. Em 1714 os holandeses trouxeram sementes e mudas dessa planta para a Guiana Holandesa, com o intuito de aproveitar o clima favorável ao cultivo (Joly e Hemógenes, 1979). As primeiras mudas chegaram ao Brasil em 1727 trazidas por Francisco Mello Palheta, atingindo o Rio de Janeiro em 1774 (Carvalho, 1993).

A penetração no Estado de São Paulo se deu pelo Vale do Paraíba (Joly e Hemógenes, 1979) por volta de 1790. Neste mesmo ano o café alcançou também o Estado de Minas Gerais. Pouco tempo depois, o café passou a ser o produto base da economia brasileira, sendo o responsável pela modernização do país. Em 1850, o Brasil já era o maior produtor mundial (Graner e Godoy-Júnior, 1967). Sua produção aumentou continuamente até 1929 – 1930 quando uma crise econômica foi desencadeada devido a uma oferta do produto muito maior do que a procura (Thomaziello *et al.*, 2000).

Atualmente, o Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial de café, integrando importante complexo agro-industrial-exportador. Segundo estimativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção de café para a safra 2003/2004 aponta para um volume em torno de 35,7 milhões de sacas, volume muito inferior ao de 2002/2003 de 47 milhões de sacas. Baseado nos dados da safra 2002/2003, o Estado de Minas Gerais é o maior produtor de café do Brasil, com a colheita de 24 milhões de sacas. Em segundo lugar vem o Espírito Santo com 9 milhões de sacas, seguido por São Paulo com 5 milhões de sacas ([www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)). No Estado de São Paulo, a cultura do

café movimenta aproximadamente 5 bilhões de reais por ano gerando em torno de 5 mil empregos diretos ou indiretos (Thomaziello *et al.*, 2000).

Atualmente, a área utilizada para o cultivo de café está em torno de 2,4 milhões de hectares, sendo 26% dessa área utilizada para o cultivo de *Coffea canephora*, principalmente o cultivar Conilon, e os 74% restantes são para o cultivo de *Coffea arabica* com um grande número de cultivares. As principais são a Catuaí, com cerca de 60% do total, e Mundo Novo com aproximadamente 35% (www.coffeebreak.com.br). Tanto a variedade Mundo Novo quanto a Catuaí possuem boa capacidade de adaptação, gerando grandes produções na maior parte das regiões brasileiras (Thomaziello *et al.*, 2000).

## **2. *Coffea arabica* L.**

*Coffea arabica* L., genericamente conhecido por café arábica, é uma planta perene, de porte arbustivo, pertencente à família Rubiaceae (Thomaziello *et al.*, 2000). É a espécie mais importante do gênero *Coffea*, compreendendo grande número de cultivares (Graner e Godoy-Júnior, 1967). A espécie é autocompatível, multiplicando-se predominantemente por autofecundação, e é a única espécie tetraplóide ( $2n = 44$ ) do gênero (Lashermes *et al.*, 1999).

O cafeeiro pode atingir até 4 m de altura, sendo a raiz do tipo pivotante profunda e amplamente ramificada nas primeiras camadas do solo (Graner e Godoy-Júnior, 1967). Apresenta ramos ortotrópicos (crescimento vertical), dos quais se originam os ramos plagiotrópicos (crescimento lateral). As folhas possuem pecíolo curto, formato oval e alongado e cor verde escura. Nos ramos laterais são encontradas as gemas florais. As flores do cafeeiro são brancas e de aroma agradável (Rena e Maestri, 1986). O fruto é uma drupa elipsóide, contendo geralmente duas sementes. A casca é lisa e brilhante passando do verde ao vermelho de acordo com as fases da maturação (Deddeca, 1957).

Um único ciclo de frutificação anual é observado no cafeeiro. No início da primavera ocorre a abertura dos botões florais. Com a entrada do período seco, as taxas de crescimento da parte aérea começam a decrescer e a iniciação floral é acelerada. A fertilização ocorre 24 horas após a polinização, sendo que a primeira divisão da célula do endosperma ocorre 21-27 dias depois da polinização e a primeira divisão do embrião 60-70

dias depois da polinização. Os frutos se desenvolvem durante o verão e atingem a maturação no início da estação fria e seca (Thomaziello *et al.*, 2000).

Os cafeeiros exibem ciclo fenológico (fases fisiológicas da frutificação do cafeeiro) bem caracterizado: florescimento na primavera, frutificação no verão, maturação no outono e “repouso” no inverno. Camargo *et al.* (2001) dividiram a vegetação e a frutificação dos cafeeiros em seis fases fenológicas distintas, em dois anos seguidos. A primeira fase é a de vegetação e formação das gemas foliares. Esta fase ocorre em dias longos nos meses que vão de setembro a março. A indução, desenvolvimento, maturação e dormências das gemas florais ocorrem em dias curtos, entre os meses de abril a agosto, e caracterizam a segunda fase. Ao final dessa fase as gemas dormentes produzem um par de folhas pequenas, separando o primeiro e o segundo ano fenológico.

O segundo ano fenológico inicia-se com a terceira fase – florada e expansão dos frutos. Nesta fase, que vai de setembro a dezembro, as gemas maduras originam os botões florais. Cerca de uma semana depois os botões florescem, aparecem os chumbinhos e ocorre a expansão dos frutos. A quarta fase é a de granação dos frutos. Ocorre de janeiro a março e caracteriza-se pela formação dos grãos. A maturação é a quinta fase. Normalmente acontece de abril a junho dependendo da precocidade do cultivar e da região de cultivo. A sexta fase ocorre entre julho e agosto, é a fase de senescência. Nesta fase acontece a autopoda que é caracterizada pela morte dos ramos produtivos, limitando, assim, o crescimento do arbusto.

O café arábica é uma planta de clima tropical e úmido, portanto não tolera variações muito amplas de temperatura. As temperaturas médias anuais ideais para o cultivo do café ficam entre 19°C e 21°C. Temperaturas elevadas (acima de 23°C) podem bloquear várias funções biológicas de desenvolvimento e temperaturas baixas podem causar geadas que são prejudiciais aos cafeeiros. A pluviosidade e a altitude também são fatores de extrema importância. No que se refere a pluviosidade as regiões consideradas boas para o cultivo apresentam médias anuais entre 1.200 a 1.800 mm. Vale ressaltar que a distribuição das chuvas ao longo do ano é um fator que deve ser considerado uma vez que a deficiência hídrica nos meses de frutificação pode gerar perdas na produtividade. Com relação à altitude, limites ideais encontram-se entre 400 e 1.200 metros (Thomaziello *et al.*, 2000).

### 3. O fruto do café

Após a florada (antese) os frutos do café denominados “chumbinhos” não apresentam crescimento por aproximadamente 5-6 semanas. Esta dormência está associada ao nível endógeno elevado de ácido abscísico e baixo de ácido giberélico (Thomaziello *et al.*, 2000). A seguir, ocorre o crescimento dos frutos até o fruto verde atingir seu tamanho final. O crescimento cessa até a maturação, quando se inicia a expansão do fruto e este aumenta rapidamente de tamanho. Desde a antese até o fruto atingir seu tamanho máximo, decorre um período de 4-6 meses. A maturação leva em torno de 2 meses. Neste período, o pericarpo aumenta de volume e o endosperma torna-se mais denso (Rena e Maestri, 1986), a clorofila é substituída por pigmentos vermelhos (flavonóides) acarretando uma mudança visível na cor da casca. Assim sendo, a cor da casca é um excelente marcador de maturação (Montavon *et al.*, 2003).

Apesar da importância econômica, trabalhos a nível molecular sobre o desenvolvimento e maturação dos frutos do café são escassos. Existem algumas análises acerca dos componentes que ocorrem nos frutos maduros de café. Em geral, esses estudos priorizam compostos relacionados com a qualidade da bebida como os compostos fenólicos, a polifenoloxidase, aminoácidos, entre outros (Mazzafera e Robinson, 2000; Fernandes *et al.*, 2001; Montavon *et al.*, 2003).

A maturação atua sobre vários aspectos críticos do fruto, incluindo sua composição e seu metabolismo (Giovannoni, 2001). No entanto, poucas são as informações sobre o acúmulo de compostos durante o processo de maturação do fruto do café. Pimenta e Vilela (2001) estudaram o teor de compostos fenólicos totais e de ácido clorogênico e a atividade da polifenoloxidase em diferentes estágios da maturação dos frutos do café. Estes autores observaram que os compostos fenólicos e o ácido clorogênico estão presentes em quantidades elevadas nos frutos verdes e, à medida que ocorre a maturação, o teor desses compostos vai diminuindo. Por outro lado, a atividade da polifenoloxidase aumenta durante o processo de maturação (Pimenta e Vilela, 2001).

Com o objetivo de estudar os mecanismos bioquímicos relacionados ao transporte e ao acúmulo de uma variedade de compostos, Rogers *et al.* (1999a) analisaram as mudanças no conteúdo de açúcares, mioinositol, ácidos carboxílicos e íons inorgânicos durante a

maturação dos frutos de café. Estes autores observaram que no início da maturação, os açúcares livres são em sua maioria frutose e glicose. No entanto, nos frutos maduros a sacarose representa quase 100% do conteúdo total de açúcares livres. No que se refere à quantidade de mioinositol, ocorre uma diminuição da sua concentração durante a maturação do fruto. Entre os ácidos carboxílicos estudados, o ácido cítrico é o mais abundante seguido pelo ácido málico. A concentração do ácido cítrico aumenta continuamente durante a maturação, por outro lado, a concentração do ácido málico aumenta até a metade da maturação e depois diminui. Quanto ao ácido oxálico e o ácido acético, ambos tem a concentração diminuída durante a maturação sendo que, ao final desse processo, os níveis destes ácidos são muito baixos. O ácido fórmico se mantém constante durante toda a maturação. Quanto aos íons inorgânicos, as concentrações de cloreto, sulfato e nitrato diminuem durante a maturação do fruto (Rogers *et al.*, 1999a).

As proteínas são precursoras dos compostos nitrogenados envolvidos no sabor dos frutos e têm sido alvo de alguns estudos. O conteúdo protéico foi analisado através de experimentos envolvendo eletroforese em duas dimensões e seqüenciamento do N-terminal das proteínas. Esses experimentos mostraram que as proteínas de reserva 11S são as mais abundantes no fruto do café, representando cerca de 50% do conteúdo total de proteínas (Montavon *et al.*, 2003), e acumulam-se gradativamente no endosperma durante o desenvolvimento dos frutos (Rogers *et al.*, 1999b; Marraccini *et al.*, 1999).

O conteúdo de cafeína também foi estudado durante o desenvolvimento e maturação do fruto do café. A concentração de cafeína aumenta continuamente no endosperma enquanto que no pericarpo sua concentração diminui. Este fato pode ser explicado pelo transporte da cafeína dos tecidos clorofilados para o endosperma (Marraccini *et al.*, 2001). Estudos recentes mostraram que quanto maior o tempo de frutificação, ou seja, o tempo que o fruto leva para crescer e maturar, maior o teor de cafeína e também de ácido clorogênico (Akaffou *et al.*, 2003). Conseqüentemente, quanto maior o tempo de frutificação, melhor a qualidade da bebida obtida.

O entendimento dos pontos gerais e específicos do desenvolvimento e da maturação dos frutos do café permitirá a manipulação das características associadas a esses processos.

#### 4. Expressão gênica durante o desenvolvimento e maturação do fruto

O desenvolvimento e a maturação dos frutos são processos controlados direta ou indiretamente por mudanças na expressão gênica (Goldberg *et al.*, 1989; Thomas, 1993; Ferrándiz *et al.*, 1999; Wobus e Weber, 1999; Girke *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2002). Os padrões de expressão temporal e espacial de genes durante o desenvolvimento e maturação dos frutos vêm sendo amplamente estudado em diversas espécies de plantas (Ferrándiz *et al.*, 1999; Girke *et al.*, 2000; Aharoni e O'Connell, 2002; Bramley, 2002; Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002; Marín-Rodríguez *et al.*, 2003; Benítez-Burraco *et al.*, 2003; Kumar e Ellis, 2003). Entretanto, estudos sobre genes expressos durante esses processos nos frutos do café são inexistentes.

A expressão gênica durante o desenvolvimento do fruto de *Arabidopsis thaliana* tem sido bastante estudada. Em 1997, Percy *et al.* analisaram fenótipos mutantes de *A. thaliana* e constataram que três genes reguladores - *ABA-INSENSITIVE3 (ABI3)*, *FUSCA3 (FUS3)* E *LEAFY COTYLEDON (LEC1)* - são de extrema importância no processo de desenvolvimento da semente. O gene *ABI3* é sensível ao ácido abscísico (ABA) e controla processos elementares durante o desenvolvimento da semente como, por exemplo, o acúmulo de proteínas de reserva, aquisição da dormência e tolerância à dessecação. Além disso, o gene *ABI3* está envolvido na substituição da clorofila por antocianina, que é a responsável pela coloração dos frutos maduros. Os genes *LEC (LEC1 e LEC2)* e *FUS3*, apresentam papel chave no controle do desenvolvimento do embrião (Stone *et al.*, 2001). Ao contrário da maioria dos genes reguladores do desenvolvimento do embrião, que funcionam apenas durante estágios específicos do desenvolvimento, os genes *LEC* são requeridos para o desenvolvimento normal tanto durante a fase de morfogênese quanto durante a fase de maturação. No início da embriogênese, os genes *LEC* são necessários para especificar a identidade do cotilédone. Estes genes são necessários também, durante a fase de maturação para a aquisição da tolerância a dissecação e para a expressão de vários genes específicos da maturação. A proteína codificada pelo gene *FUS3* se acumula fundamentalmente durante o desenvolvimento da semente (Stone *et al.*, 2001).

Os genes - *ATSI* e *ATS3* - foram identificados, através de *display* diferencial de mRNA, em *Arabidopsis thaliana*. A análise desses genes revelou que o gene *ATSI* é



similar ao gene *EFA27*, identificado como um gene de resposta ao ABA em arroz, enquanto que o gene *ATS3* não apresentou similaridade significativa em banco de dados. A expressão temporal e espacial desses genes foi determinada por *Northern blot* e hibridização *in situ*, respectivamente. Ambos *ATSI* e *ATS3* são especificamente expressos no embrião durante a maturação do fruto (Nucio e Thomas, 1999).

Com o objetivo de analisar um grande número de genes expressos durante o desenvolvimento da semente de *A. thaliana*, foram produzidos *microarrays* que resultaram na identificação de aproximadamente 2.600 genes com expressão mais acentuada na semente. Entre os genes mais expressos, destacam-se os genes que codificam as proteínas de reserva, oleosinas, lipoxigenase, entre outros (Girke *et al.*, 2000). Cerca de 28 cDNAs mostraram expressão específica em sementes e apresentaram similaridade com fatores de transcrição, quinases e fosfatases. Mais de 23% dos cDNAs com expressão específica em sementes não apresentaram similaridade significativa em banco de dados e foram incluídos na categoria de proteínas com função desconhecida. Segundo os autores, como a grande maioria dos genes estruturais são conhecidos, é provável que essas seqüências sejam de genes reguladores (Girke *et al.*, 2000).

Utilizando *microarray*, vários genes associados à maturação do fruto foram identificados em morango (Aharoni e O'Connell, 2002). Neste trabalho, 1701 cDNAs de morango foram analisados em 3 estágios de maturação do fruto e em dois tecidos, pseudocarpo (receptáculo) e semente. Destes, 441 cDNAs mostraram expressão diferencial, sendo 259 com expressão mais acentuada em sementes e 182 no pseudocarpo. Os cDNAs foram seqüenciados e agrupados de acordo com suas categorias funcionais. Assim sendo, foi observado que os cDNAs com expressão mais acentuada na semente representam fatores de transcrição, fosfatases, quinases, proteínas de reserva, proteínas envolvidas na tolerância a estresse oxidativo e na dessecação. No receptáculo os cDNAs com expressão mais acentuada representam proteínas relacionadas ao metabolismo primário, modificações na parede celular e pigmentação (Aharoni e O'Connell, 2002).

Cinco cDNAs com expressão acentuada no final da maturação foram isolados, através de *display* diferencial de mRNA, em morangos. A expressão tecido específica desses cDNAs foi verificada através de *Northern blot* e 3 dos 5 cDNAs mostraram expressão específica em frutos. Quatro cDNAs apresentaram similaridade com proteínas da

família anexina e com a enzima chalcone sintase. As anexinas são proteínas de ligação a fosfolipídeos, dependentes de íon cálcio, que apresentam importante papel na exocitose, sinalização celular e na interação membrana-citoesqueleto. Na maturação do fruto, os autores especulam que a anexina deva estar envolvida com a exocitose de enzimas que degradam a parede celular ou servindo de molécula sinalizadora. A chalcone sintase atua como catalisadora de uma reação química chave no processo de síntese de flavonóides, entre eles as antocianinas que se acumulam no fruto maduro tornando-os vermelhos (Wilkinson *et al.*, 1995).

O desenvolvimento e a maturação dos frutos do tomate também têm sido bastante estudados. A maturação do fruto envolve o acúmulo de açúcar e de outros compostos relacionados ao sabor, síntese de pigmentos que promovem a mudança na coloração do fruto maduro e mudanças na composição da parede celular tornando os frutos macios. Os genes responsáveis pela alteração da cor estão envolvidos na biossíntese de carotenóides e têm a expressão mais acentuada no início da maturação (Bramley, 2002). Moore *et al.* (2002) utilizaram *microarray* para comparar 10 estágios diferentes de desenvolvimento e maturação do tomate. Foram encontrados cDNAs diferenciais para os 10 estágios analisados, sendo que a maioria dos cDNAs diferenciais foi encontrada nos estágios iniciais da maturação. A análise das seqüências dos cDNAs com expressão acentuada no início da maturação mostrou que estes cDNAs apresentavam similaridade com genes envolvidos na biosíntese do etileno, no acúmulo de carotenóides, e em modificações da parede celular (Moore *et al.*, 2002).

Em banana, foram identificados dois genes que têm a expressão acentuada durante a maturação do fruto. Os dois genes codificam a enzima pectato liase e foram denominados *Pel I* e *Pel II*. Embora *Pel I* apresente maior nível de expressão em relação a *Pel II*, ambos apresentam o mesmo padrão de expressão. Os mRNAs destes genes não foram detectados em folhas, raízes ou frutos verdes e foram encontrados tanto na polpa quanto na casca de frutos maduros (Marín-Rodríguez *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram obtidos por Benítez-Burraco *et al.* (2003). Três genes da enzima pectato liase foram isolados de uma biblioteca genômica de morango e denominados *plA*, *plB* e *plC*. Os 3 genes apresentam o mesmo padrão de expressão, ou seja, são expressos durante todos os estágios da maturação,

atingindo seu pico no fruto maduro, e não são expressos em tecidos vegetativos como raiz, folhas ou flores.

Em café, Rojas-Herrera *et al.* (2002) estudaram a expressão gênica diferencial durante a embriogênese somática através de *display* diferencial de mRNA. Com isso, foi possível identificar genes com similaridade a fosfoglicerato quinase, a oxigenase, a ubiquitina, e a proteínas de choque-térmico, todos com alta expressão nos primeiros estágios do desenvolvimento.

O gene correspondente à proteína de reserva 11S do café, *csp1*, foi clonado e analisado quanto ao seu padrão de expressão. Transcritos deste gene foram detectados em níveis elevados nos estágios iniciais do desenvolvimento do endosperma. Não foram detectados transcritos em folhas, caule, raízes ou flores (Marraccini *et al.*, 1999).

Recentemente, foram identificados genes envolvidos no metabolismo de cafeína em café. Esses genes correspondem a enzimas da via biosintética da cafeína e apesar de expressos em folhas e flores, estes genes são mais expressos em frutos (Mizuno *et al.*, 2003).

Informações sobre os genes envolvidos no desenvolvimento e maturação do fruto são essenciais para a elucidação dos mecanismos de transporte e metabolismo do fruto, os quais poderão fornecer subsídios para o melhoramento de algumas características agrônomicas importantes, bem como para a solução de vários problemas que a cafeicultura enfrenta como, por exemplo, a desigualdade de maturação dos frutos.

## **5. Utilização de *display* diferencial de mRNA para a identificação de genes específicos**

A técnica de *display* diferencial de mRNA, descrita por Liang e Pardee (1992), consiste na separação de cDNAs parciais em uma matriz. É um método baseado em PCR composto por quatro etapas. A primeira etapa consiste na síntese de cDNA a partir do mRNA, utilizando *primers* ancoradores (oligos dT). Dessa forma, os cDNAs obtidos correspondem, geralmente, a extremidade 3' do mRNA. O passo seguinte é a amplificação do cDNA com *primers* ancoradores e arbitrários. A eletroforese em gel de poliacrilamida é o terceiro passo. O quarto passo é o isolamento dos fragmentos de interesse do gel, seguido por amplificação e seqüenciamento (Donson *et al.*, 2002).

A grande vantagem dessa técnica é permitir a análise comparativa entre duas ou mais amostras. Além disso, o baixo custo, a simplicidade da técnica e a necessidade de pouco RNA para a análise fazem do *display* diferencial de mRNA uma alternativa atrativa para estudos de expressão gênica, mesmo após o surgimento de metodologias que permitem a análise de um grande número de genes ao mesmo tempo como o *microarray* (Appel *et al.*, 1999; Donson *et al.*, 2002; Stein e Liang, 2002).

Em função dessas características, o *display* diferencial de mRNA tem sido utilizado para o isolamento de genes diferencialmente expressos em diversos organismos e em diversas condições (Lim *et al.*, 2002; Zeppa *et al.*, 2002; Rubinelli *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003).

Em plantas, o *display* diferencial tem sido amplamente utilizado. Company e González-Bosch (2003) isolaram um gene reprimido durante infecção por fungo (*Botrytis cinerea*). Este gene apresentou similaridade com chaperoninas de diversas plantas. Genes com expressão aumentada em resposta a luz foram isolados de *Arabidopsis thaliana* (Dunaeva e Adamska, 2001). Esses genes apresentaram similaridade com *ERD15* (*early response to dehydration*), actina-2, *LEA14* (*late embryogenesis abundant*), proteína de ligação a metal e uma ORF localizada no cromossomo V.

A técnica de *display* diferencial também tem sido utilizada para estudo de genes regulados pelo desenvolvimento. Em brotos de *Quercus robur*, um cDNA com similaridade a proteínas ricas em glicina e histidina foi isolado e seu padrão de expressão analisado detalhadamente. Foi observada uma maior expressão em embriões somáticos, raízes e brotos originados de embriões somáticos (Gil *et al.*, 2003). Em trigo, o *display* diferencial de mRNA foi utilizado no estudo da expressão gênica durante a embriogênese zigótica. Um cDNA com expressão no início da embriogênese foi isolado. A análise de sua sequência mostrou similaridade com uma fitocistatina. Experimentos de *Northern blot* e *Western blot* mostraram padrão temporal e espacial de expressão do gene da cistatina durante o desenvolvimento do embrião, sendo mais expresso nos estágios iniciais do desenvolvimento (Corre-Menguy *et al.*, 2002).

Em café, o *display* diferencial de mRNA foi utilizado para a comparação do padrão de expressão gênica durante a embriogênese somática. Com isso foi possível identificar

genes com similaridade a oxigenase, fosfoglicerato quinase, ubiquitina e proteína de choque térmico (Rojas-Herrera *et al.*, 2002).

## OBJETIVOS

### Objetivo geral:

O trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização de cDNAs expressos diferencialmente durante a maturação dos frutos de *Coffea arabica* L.

### Objetivos específicos:

- Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente nos diferentes estágios de maturação do fruto (verde, amarelo e vermelho);
- Confirmação da expressão dos cDNAs isolados;
- Amplificação, clonagem e seqüenciamento dos cDNAs com expressão diferencial confirmada;
- Comparação das seqüências obtidas com seqüências disponíveis em bancos de dados;
- Caracterização através de *slot blot* de RNA dos cDNAs que apresentaram similaridade com seqüências presentes em banco de dados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Coleta do material biológico

Foram coletados frutos de *Coffea arabica* L. cultivar Mundo Novo IAC 501-5 em diferentes estágios de desenvolvimento e maturação (Figura 1), com amostragem representativa de plantas sendo os frutos coletados de diferentes ramos de diferentes plantas. As coletas foram realizadas no Instituto Agronômico de Campinas. Os frutos foram congelados em nitrogênio líquido e transportados, em gelo seco, para UNICAMP, onde foram armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . As coletas foram realizadas em março e abril de 2002, e de novembro de 2002 a março de 2003.

### 2. Isolamento de RNA total

Foi isolado RNA total de frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento e maturação (Figura 1). Para isto, cerca de 100 mg do fruto inteiro foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1 mL de solução contendo: Guanidina-HCl 8 M; Tris-HCl 50 mM, pH 9,0; EDTA 20 mM, pH 8,0; PVP 2% e 2-mercaptoetanol 50 mM. Em seguida, foram realizadas duas extrações com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1, v/v/v) e uma extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1, v/v). O RNA foi precipitado através da adição de 0,2 volumes de ácido acético 1 M e 1 volume de etanol absoluto gelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 16 h. Após centrifugação a 10.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , o precipitado foi lavado duas vezes com acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e uma vez com etanol 70%. Depois de seco, o precipitado (RNA) foi ressuscitado em aproximadamente 40  $\mu\text{L}$  de água DEPC autoclavada e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

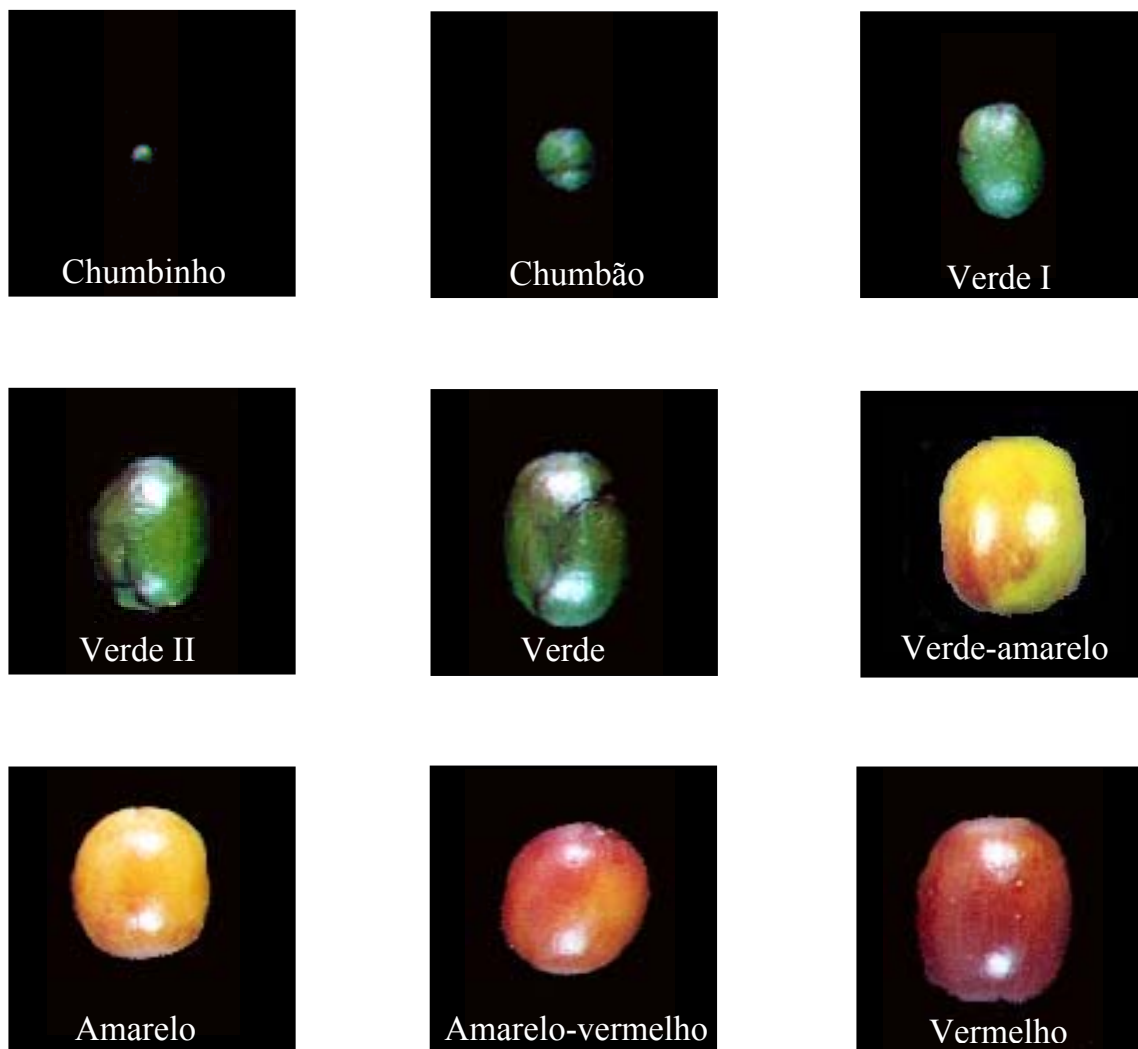


Figura 1: Diferentes estágios do desenvolvimento e maturação de *Coffea arabica* L., cultivar Mundo Novo IAC 501-5.



### 3. *Display* diferencial de mRNA

O RNA total, isolado nos estágios verde, amarelo e vermelho da maturação, foi utilizado em experimentos de *display* diferencial de mRNA (Liang e Pardee 1992). Os padrões dos cDNAs obtidos nos géis de *display* foram comparados e os cDNAs com expressão diferencial foram isolados dos géis.

#### 3.1. Síntese de cDNA

O RNA total (80µL) foi tratado com DNase através da adição de: 0,5 µL de RNA guard (37,8 U/µL; Gibco BRL); 5 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,3; 5 µL de KCl 0,5 M; 5 µL de MgCl<sub>2</sub> 15 mM; 1 µL de DNase (10 U/µl; Gibco BRL) e água q.s.p. 100 µL. A reação foi incubada por 1 h a 37°C. Em seguida, foi acrescentado 100 µL de água DEPC e foi realizada uma extração com fenol: clorofórmio (3:1, v/v). O RNA, livre de DNA, foi precipitado através da adição de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e etanol absoluto. Após centrifugação, o RNA foi ressuscitado em água DEPC e quantificado em gel. A concentração do RNA foi ajustada para 1 µg/µL.

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit *ready-to-go* RT-PCR *beads* (Amersham Biosciences). Para isto, foram adicionados a cada *bead* 44 µL de água DEPC. Após 5 min foram acrescentados: 5 µL de *primer* T<sub>12</sub>VN (T<sub>12</sub>VC ou T<sub>12</sub>VG) 10 µM e 1 µL de RNA (1 µg/µL) tratado com DNase. A reação foi incubada por 30 min a 42°C. A enzima foi inativada a 95°C por 5 min e os cDNAs foram armazenados a -20°C.

#### 3.2. PCR a partir do cDNA e eletroforese das amostras amplificadas

Os cDNAs foram amplificados em um termociclador Perkin Elmer 2400 utilizando-se *primers* ancoradores (T<sub>12</sub>VC ou T<sub>12</sub>VG) e os *primers* arbitrários OPJ10 (AAGCCCGAGG) e OPJ08 (CATACCGTGG) (Operon Technologies Inc.). As reações, feitas em duplicata, foram compostas por: 2 µL de cDNA; 2 µL de *primer* ancorador (10 µM); 2 µL de *primer* arbitrário (10 µM) e 14 µL de uma mistura constituída por: 2 µL de tampão de amplificação 10 X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50

mM; 2  $\mu$ L de dNTP 20  $\mu$ M (de cada um); 0,5  $\mu$ L de [ $\alpha$ - $^{33}$ P]dATP, 8,7  $\mu$ L de água e 0,3  $\mu$ L de *Taq* polimerase (5 U/ $\mu$ L; Amersham Biosciences). As condições de amplificação foram: 94°C (3 min), seguido de 40 ciclos de 94°C (30 s), 40°C (2 min) e 72°C (30 s). A extensão final foi feita a 72°C por 20 min.

Após a amplificação, 7  $\mu$ L do produto de cada reação de PCR foram misturados com 5  $\mu$ L de tampão contendo: 880  $\mu$ L de formamida deionizada; 20  $\mu$ L de EDTA 0,5 M, pH 8,0 e 400  $\mu$ L de uma solução contendo xilenocianol 0,1% e azul de bromofenol 0,1% (Xu *et al.*, 1997). As amostras foram desnaturadas a 80°C por 4 min e em seguida, 10  $\mu$ L foram submetidos à eletroforese em gel de 5% de acrilamida e 50% de uréia. A eletroforese foi realizada em tampão TBE (Sambrook *et al.*, 1989) a 1320 V–35 mA, até a frente de xilenocianol sair do gel. O gel foi colocado sobre uma folha de papel Whatman 3 MM e seco a vácuo. Os produtos de amplificação foram detectados através de exposição a filme de raio-X (Fujifilm).

### 3.3. Isolamento, eluição e reamplificação dos cDNAs diferenciais

O filme de raio-X foi posicionado sobre o gel de *display*, na mesma posição em que foi exposto, e as regiões contendo os cDNAs de interesse foram cortadas. O cDNA foi eluído do gel em 200  $\mu$ L de água após incubação por 15 min a 95°C. O cDNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto durante a noite a –20°C. O DNA foi centrifugado e ressuspendido em 10  $\mu$ L de água autoclavada. Quatro  $\mu$ L do DNA foram amplificados em reações (40  $\mu$ L) contendo: tampão de amplificação 10 X (Tris-HCl 2 mM, pH 8,3; KCl 5 mM); MgCl<sub>2</sub> 4 mM; *primer* arbitrário 1  $\mu$ M; *primer* ancorador 1  $\mu$ M; 0,8  $\mu$ L de dNTP (concentração final 20  $\mu$ M de cada um); 2,5 U de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). As condições de amplificação foram as mesmas empregadas na reação de *display*. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 2% em tampão TAE 1 X (Sambrook *et al.*, 1989) para confirmação do tamanho e quantificação dos cDNAs. Como padrão de massa e peso molecular foram utilizados nos géis o *Ladder* 1 Kb (Promega) e o  $\phi$  $\chi$ 174/*Hae* III (Invitrogen). Os cDNAs que apresentaram contaminação com fragmentos de tamanho aproximado ao esperado foram cortados do gel e purificados com o kit *Concert Rapid Gel*

*Extraction System* (Gibco BRL).

#### **4. Confirmação da expressão diferencial através de experimentos de *slot blot* de DNA**

A expressão diferencial dos cDNAs isolados dos géis de *display* foi confirmada através de experimentos de *slot blot* de DNA (Xu *et al.*, 1997).

##### **4.1. Transferência dos cDNAs isolados dos géis de *display* diferencial de mRNA para membranas de nylon**

Dez ng de DNA de cada cDNA, em um volume final de 200 µL, foram desnaturados por 10 min a 95°C. Em seguida, foram adicionados 200 µL de SSC 20 X filtrado. As amostras foram transferidas para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences) com o auxílio de um *slot blot* (Hybri-Slot, Gibco BRL). Antes da transferência das amostras, as membranas foram umedecidas em SSC 10 X. Após a transferência das amostras, os *slots* foram lavados com 500 µL de SSC 10 X filtrado. As membranas foram secas a temperatura ambiente e o DNA foi fixado a 80°C por 2 h. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

##### **4.2. Obtenção de sondas radioativas e hibridização das membranas**

Os cDNAs sintetizados a partir do RNA isolado no item 2 foram amplificados, quantificados e utilizados como sonda nos experimentos de *slot blot* para confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados. A quantificação foi feita em gel de 2% de agarose através de comparação com o padrão de massa e peso molecular  $\phi\chi 174/Hae$  III. Aproximadamente 30 ng dos cDNAs foram marcados com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP utilizando-se o kit *Megaprimer DNA labelling system* (Amersham Biosciences).

As membranas foram pré-hibridizadas a 42°C por 6 h em: formamida deionizada 50%; SSC 5 X; Denhardt's 10 X (Sambrook *et al.*, 1989); Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; SDS 1% e DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/mL. As membranas foram hibridizadas durante a noite a 42°C em: formamida deionizada 50%; SSC 5 X; SDS 1%;

sulfato de dextran 5%; Denhardt's 2 X; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/mL e  $10^7$ - $10^8$  cpm/mL da sonda previamente desnaturada a 98-100°C por 5 min. As membranas foram lavadas a temperatura ambiente por 2 vezes, 15 min cada vez, em solução contendo SSC 2 X e SDS 0,1%. A seguir, as membranas foram lavadas por 2 vezes a 60°C, 30 min cada lavagem, em solução contendo SSC 0,1 X e SDS 0,1%. As membranas foram expostas pelo tempo necessário a filmes de raio-X (Fujifilm).

#### **4.3. Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de *slot blot***

Os sinais de hibridização dos cDNAs foram quantificados através da utilização do programa *Digital Science 1D V. 2.0.3* da Kodak. A análise dos dados da quantificação foi baseada em Gill *et al.* (1999). Após a quantificação, foi feita a média da intensidade do sinal das repetições de cada amostra hibridizada. A partir das médias obtidas foi calculado o coeficiente de expressão (CE). Para o cálculo do CE, o valor de intensidade do cDNA hibridizado com uma sonda específica foi dividido pela média dos sinais do cDNA hibridizado com as diferentes sondas. Esta análise foi feita para todos os cDNAs analisados nos experimentos de *slot blot*.

### **5. Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs diferenciais**

Após a quantificação da intensidade do sinal dos cDNAs, e análise dos dados, foram selecionados para clonagem e seqüenciamento, os cDNAs que apresentaram maiores coeficientes de expressão.

#### **5.1. Reação de ligação**

Os cDNAs selecionados foram clonados em pGEM-T *Easy* (Promega), seguindo-se as especificações do fabricante. Na reação, foram utilizados 3 µL de inserto, 5 µL de tampão de ligação 10 X, 1 µL de vetor pGEM-T (Promega) e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação foi incubada a temperatura ambiente por um período de 3 h.

## 5.2. Transformação bacteriana

A reação de ligação foi misturada com 100 µL de células competentes (DH5α), em um fluxo laminar. A mistura foi incubada em gelo por 30 min e em seguida, à 42°C por 90 s. Após esse período, a mistura foi colocada imediatamente no gelo. Foram adicionados 700 µL de meio LB (Sambrook *et al.*, 1989) e incubou-se a 37°C por 1 h. As amostras foram plaqueadas em meio LB sólido contendo X-Gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, (0,8 mg/placa) e ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Dessas placas foram isoladas 12 colônias (brancas) para cada fragmento clonado. As colônias foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL). Foi feita cultura permanente das colônias selecionadas (750 µL de inóculo e 250 µL de glicerol estéril). As culturas permanentes foram armazenadas a -70°C.

## 5.3. Isolamento de DNA plasmidial

Para cada fragmento, 12 colônias foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina para isolamento de DNA plasmidial. Após incubação a 37°C durante a noite, 1,5 mL das culturas foram transferidos para tubos eppendorf, e centrifugados por 1 min em uma microcentrífuga a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de solução P1 (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4; EDTA 10 mM e Glicose 50 mM). Foram adicionados 200 µL de solução P2 (NaOH 0,2 M e SDS 1%) e as amostras foram agitadas por inversão. O DNA genômico foi precipitado através da adição de 150 µL de solução P3 (acetato de potássio 3 M, pH 5,2). As amostras foram centrifugadas por 3 min, e o sobrenadante (400 µL) foi transferido para um tubo novo. O DNA plasmidial foi precipitado através da adição de 720 µL de etanol. Após incubação por 5 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 2 min em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 800 µL de etanol 70%. O DNA plasmidial foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 0,1 mM, pH 8,0) contendo 1 µL de RNase (10 mg/mL) (Sigma).

A verificação da clonagem foi feita através de digestão do DNA plasmidial com a enzima de restrição *EcoR* I. Na reação de digestão foram utilizados 3 µL de DNA plasmidial, 10,2 µL de água milli-Q autoclavada, 1,5 µL de tampão da enzima 10 X (Amersham Biosciences) e 0,3 µL de *EcoR* I (Amersham Biosciences). As reações foram incubadas a 37°C por 2 h. Após incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de 1% de agarose em tampão TAE 1 X. Os fragmentos utilizados na clonagem foram submetidos à eletroforese junto com os clones, para confirmação do tamanho.

Três clones de cada fragmento foram selecionados para seqüenciamento. O DNA plasmidial destes clones foi isolado com o kit GFX™ *Micro Plasmid Prep* (Amersham Biosciences) ou WIZARD® *Plus SV Minipreps – DNA purification System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

#### **5.4. Seqüenciamento**

Nas reações de seqüenciamento foi utilizado o kit DNA *Sequencing Big Dye*™ (Perkin Elmer). As reações foram constituídas de 400 ng de DNA, 2 µL de *mix Big Dye* e 1 µL de *primer* (direto ou reverso). As condições de amplificação foram: 96°C (10 s), 50°C (5 s) e 60°C (4 min) em um total de 25 ciclos. Após a amplificação, as amostras foram precipitadas através da adição de 80 µL de isopropanol 75% (preparado na hora). As amostras foram centrifugadas por 20 min em uma microcentrífuga a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 180 µL de etanol 70% e as amostras foram centrifugadas por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente. As amostras foram mantidas a –20°C até o momento do seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer).

#### **5.5. Análise das seqüências**

O alinhamento da seqüência dos clones de um mesmo cDNA foi feito com o auxílio do programa Clustal W (V. 1.82). A seguir, as seqüências foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados através da utilização do programa BLASTX V.

2.2.6 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). O programa BLASTX deduz a seqüência de aminoácidos a partir da seqüência nucleotídica, e compara com seqüências de aminoácidos disponíveis em bancos de dados.

## **6. Caracterização dos cDNAs diferencias através de *slot blot* de RNA**

Os cDNAs isolados dos experimentos de *display* diferencial que tiveram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados foram selecionados para caracterização da expressão durante o desenvolvimento e maturação do fruto.

### **6.1. Transferência do RNA total dos frutos para membranas de nylon**

Cinco µg de RNA de fruto em diferentes estágios de desenvolvimento e maturação foram diluídos em TE para um volume final de 12,5 µL. A essa diluição foram adicionados 3 volumes de tampão contendo 500 µL de formamida, 100 µL de MOPS 10 X e 162 µL formaldeído 37% (preparado na hora) (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras foram aquecidas a 65°C por 5 min e 50 µL de SSC 20 X foram adicionados. As amostras foram transferidas para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences), previamente umedecidas em SSC 10 X, com o auxílio de um *slot blot* (Hybri-Slot, Gibco BRL). Após a transferência, o RNA foi fixado na membrana através de incubação a 80°C por 2 h.

### **6.2. Obtenção de sondas radioativas e hibridização das membranas**

Para obtenção das sondas, os vetores de clonagem contendo os cDNAs foram digeridos com *EcoR* I (Amersham Biosciences). Após a digestão foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% e os insertos (cDNAs) foram purificados com o kit WIZARD<sup>®</sup> SV *gel and PCR clean-up system* (Promega). Depois de purificados os insertos foram quantificados em gel de agarose 2% através da comparação com o padrão de massa e peso molecular  $\phi\chi 174/Hae$  III e 20-30 ng foram marcados com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP utilizando-se o kit *Megaprimer DNA labeling system* (Amersham Biosciences) ou *Random primer DNA*

*labelling system* (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. A hibridização foi feita como descrito no item 4.2.

As membranas foram expostas a filmes de raio-X (Hiperfilm<sup>TM</sup> MP – Amersham Biosciences) para a visualização dos resultados. Os sinais de hibridização obtidos foram digitalizados e a intensidade do sinal de cada amostra foi quantificada utilizando-se o programa *Digital Science* 1D V. 2.0.3 da Kodak. A normalização da quantidade de RNA nas membranas foi realizada através de hibridização com o rDNA 26S de milho.



## RESULTADO E DISCUSSÃO

### 1. Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente através de *display* diferencial de mRNA

Neste trabalho, a técnica de *display* diferencial foi utilizada com o objetivo de isolar cDNAs com expressão diferencial durante a maturação do fruto do café. Nos experimentos de *display* diferencial, cDNAs foram sintetizados a partir de RNA isolado de frutos de café em diferentes estágios de maturação: verde, amarelo e vermelho (Figura 1). A comparação entre os padrões de cDNAs dos frutos verde, amarelo e vermelho nos géis de *display*, permitiu o isolamento de cDNAs com expressão diferencial nos 3 estágios de maturação.

A técnica de *display* diferencial de mRNA (Liang e Pardee, 1992) vem sendo amplamente utilizada no isolamento de genes expressos diferencialmente em diversos organismos (Lim *et al.*, 2002; Zeppa *et al.*, 2002; Rubinelli *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003; Company e González-Bosch, 2003; Assmann *et al.*, 2003). Em plantas, esta técnica já foi utilizada com sucesso na identificação de genes envolvidos na resposta a estresse biótico e abiótico (Takemoto *et al.*, 2000; Collinge e Boller, 2001; Dunaeva e Adamska, 2001; Kim *et al.*, 2002; Evers *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2003), na embriogênese (Nucio e Thomas, 1999; Yasuda *et al.*, 2001; Corre-Menguy *et al.*, 2002; Rojas-Herrera *et al.*, 2002), no desenvolvimento da flor (Sablowski e Meyerowitz, 1998); no desenvolvimento e maturação do fruto (Wilkinson *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 2000), e outros.

Para a realização dos experimentos de *display* diferencial foram utilizados os *primers* ancoradores T<sub>12</sub>VC e T<sub>12</sub>VG e os *primers* arbitrários OPJ10 e OPJ08 (Operon Technologies Inc.) em 3 combinações: T<sub>12</sub>VC-OPJ10, T<sub>12</sub>VC-OPJ08 e T<sub>12</sub>VG-OPJ10. Os experimentos de *display* diferencial de mRNA com as diferentes combinações de *primers* são mostrados na Figura 2. Alguns dos cDNAs diferenciais estão indicados por setas na figura. Com as combinações de *primers* utilizadas, foram isolados 94 cDNAs diferenciais sendo 66 do estágio verde de maturação, 8 do amarelo e 20 do vermelho (Tabela 1).

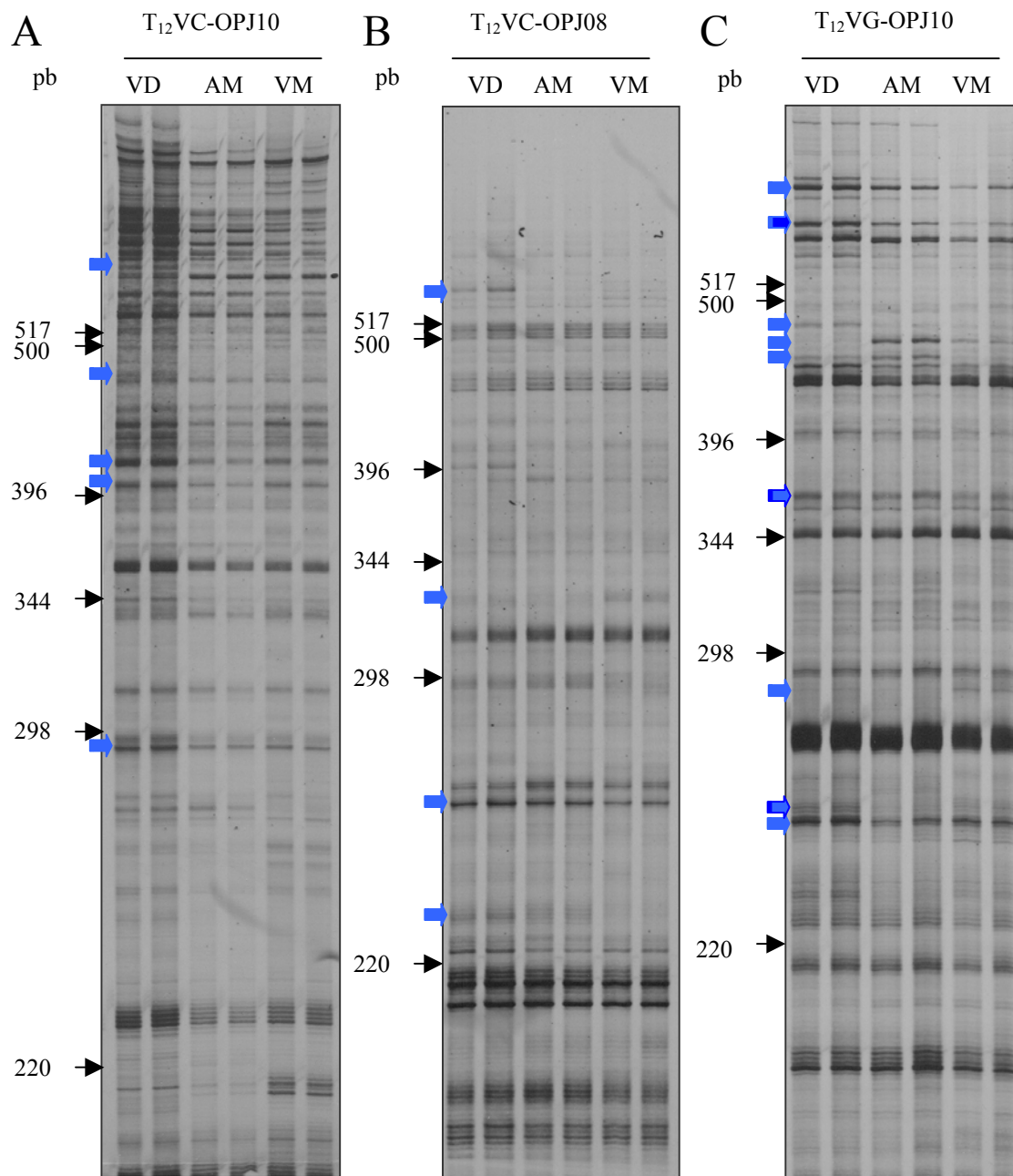


Figura 2: *Display* diferencial de mRNA a partir de RNA isolado de frutos de café em diferentes estágios de maturação: VD – verde, AM – amarelo e VM – vermelho. Em (A) foi utilizado o *primer* ancorador T<sub>12</sub>VC e o *primer* arbitrário OPJ10, em (B) T<sub>12</sub>VC e OPJ08 e em (C) T<sub>12</sub>VG e OPJ10. As setas azuis indicam exemplos de cDNAs diferenciais. As amostras foram feitas em duplicatas.

Tabela 1: Número de cDNAs isolados nos experimentos de *display* diferencial de mRNA com cada combinação de *primers*.

<i>Primers</i>	Verde <sup>1</sup>	Amarelo <sup>2</sup>	Vermelho <sup>3</sup>	Total
T <sub>12</sub> VC - OPJ10	37	0	8	45
T <sub>12</sub> VC - OPJ08	8	4	2	14
T <sub>12</sub> VG - OPJ10	21	4	10	35
Total	66	8	20	94

<sup>1</sup>cDNAs com expressão mais acentuada em frutos verdes;

<sup>2</sup>cDNAs com expressão mais acentuada em frutos amarelos;

<sup>3</sup>cDNAs com expressão mais acentuada em frutos vermelhos.

Como pode ser visto na Tabela 1, a combinação de *primers* que permitiu a identificação de um maior número de cDNAs diferenciais foi T<sub>12</sub>VC-OPJ10 (45 cDNAs diferenciais). Todos os *primers* utilizados apresentaram cDNAs com padrões repetitivos nas duplicatas.

## 2. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados dos géis de *display* diferencial de mRNA através de *slot blot*

A técnica de *slot blot* foi utilizada para a confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados dos géis de *display* diferencial por permitir que um grande número de cDNAs sejam analisados de uma só vez (Xu *et al.*, 1997). Nos experimentos, 10 ng de DNA de cada cDNA diferencial foram transferidos para membranas de nylon com o auxílio de um *slot blot*. As membranas foram hibridizadas com sondas radioativas de cDNAs sintetizados a partir do RNA isolado de frutos verde, amarelo e vermelho. Os sinais de hibridização foram quantificados e analisados como descrito no item 4.3 de Materiais e Métodos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Dos 94 cDNAs analisados, 73 (78%) tiveram a expressão diferencial confirmada (Tabela 2). O número de falsos positivos foi bastante reduzido, em função da técnica estar bem estabelecida. Os resultados das hibridizações são mostrados nas Figuras 3, 4 e 5. Os cDNAs que apresentaram coeficiente de expressão acima de 1 foram considerados como

tendo a expressão diferencial confirmada. A Tabela 2 mostra o número de cDNAs cuja expressão diferencial foi confirmada para cada estágio de maturação.

Tabela 2: Número de cDNAs diferenciais confirmados através de *slot blot*.

<i>Primers</i>	Total de cDNAs analisados	Total de cDNAs confirmados em cada estágio de maturação			Total de cDNAs confirmados
		Verde	Amarelo	Vermelho	
T <sub>12</sub> VC - OPJ10	45	33	0	3	36
T <sub>12</sub> VC - OPJ08	14	8	1	1	10
T <sub>12</sub> VG - OPJ10	35	16	1	10	27
Total	94	57	2	14	73

Como pode ser visto na Tabela 2, um total de 57 cDNAs isolados do estágio verde, 2 do amarelo e 14 do vermelho tiveram a expressão diferencial confirmada.

### 2.1. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VC - OPJ10

Como mencionado, um total de 45 cDNAs foi isolado com os *primers* T<sub>12</sub>VC - OPJ10 (Tabela 1). Dos 45 cDNAs isolados, 36 tiveram a expressão diferencial confirmada através de *slot blot* (Tabela 2, Figura 3). Assim sendo, os cDNAs 4, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 50, 51, 52, 53 e 54 tiveram a expressão diferencial confirmada no estágio verde e os cDNAs 47, 48 e 49 tiveram a expressão diferencial confirmada no estágio vermelho.

Como pode ser visto na Figura 3, diferentes padrões de expressão foram observados. Assim sendo, entre os cDNAs com expressão mais acentuada no estágio verde foram observados 4 padrões diferentes de expressão. São eles:

- (1) Expressão mais acentuada no estágio verde e queda contínua da expressão nos estágios amarelo e vermelho. Apresentaram este padrão de expressão os cDNAs 4, 6, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 32, 33, 34, 39, 40, 50 e 54.
- (2) Expressão mais acentuada no estágio verde e diminuição da expressão nos estágios amarelo e vermelho, sendo que a expressão nesses dois estágios foi semelhante. Apresentaram este padrão de expressão os cDNAs: 7, 16, 23, 27, 29 e 51.

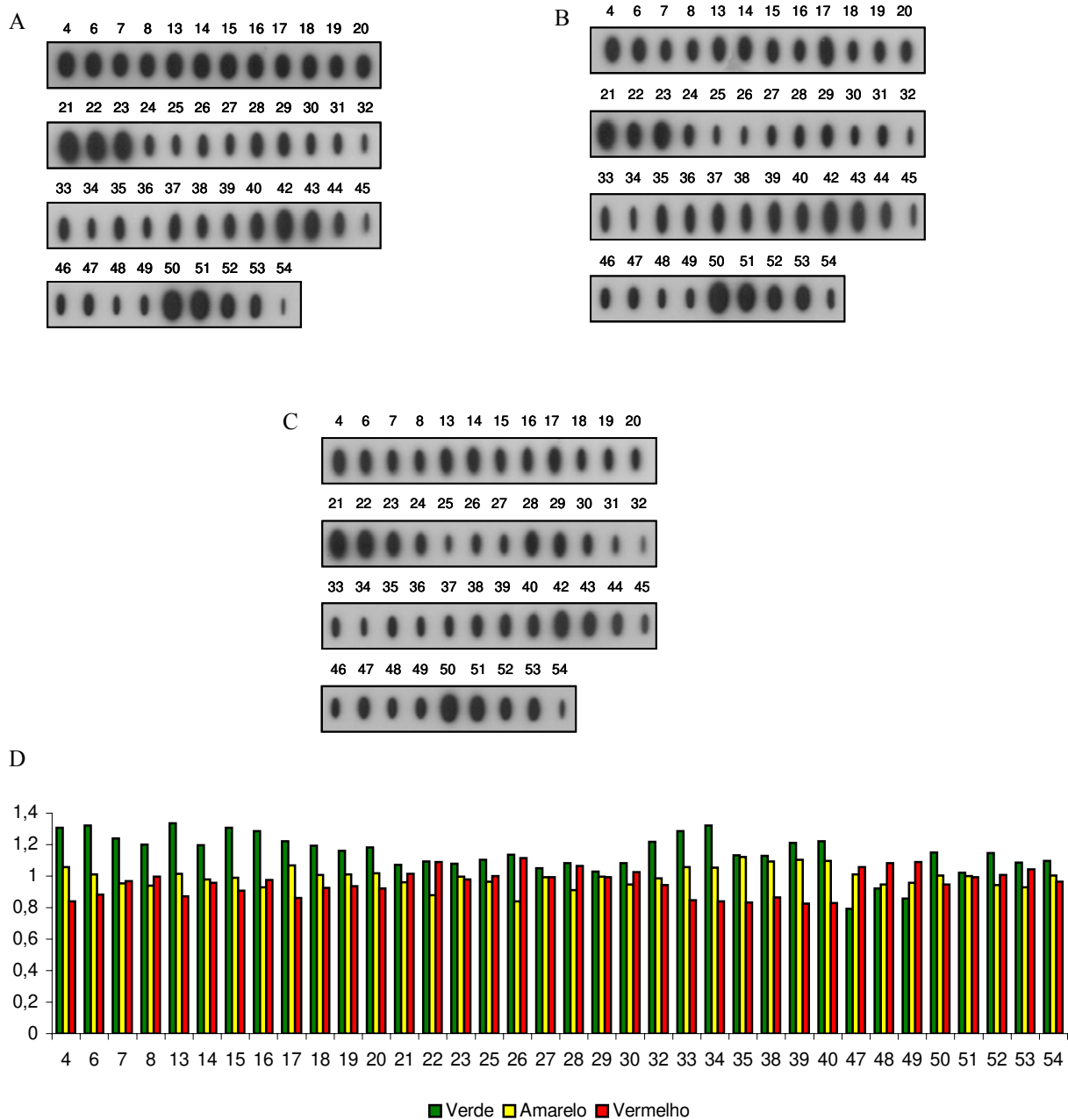


Figura 3: Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* T<sub>12</sub>VC-OPJ10. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio verde. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio amarelo. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio vermelho. (D) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs.

- (3) Expressão semelhante nos estágios verde e amarelo e queda acentuada no estágio vermelho. Apresentaram este padrão de expressão os cDNAs 35 e 38.
- (4) Expressão mais acentuada no estágio verde, com queda no estágio amarelo e aumento da expressão no estágio vermelho. Apresentaram este padrão de expressão os cDNAs: 8, 21, 22, 25, 26, 28, 30, 52 e 53 (Figura 3). Uma provável explicação para o padrão de expressão observado para estes cDNAs é que o RNA utilizado na síntese do cDNA foi isolado do fruto inteiro. Assim sendo, estes cDNAs devem estar sendo expressos em mais de um tipo de tecido do fruto em momentos diferentes da maturação. Em um determinado tecido a quantidade de transcritos seria mais abundante no estágio verde e em outro tipo de tecido estes transcritos seriam mais abundantes no estágio vermelho. Esta hipótese pode ser comprovada no futuro através de experimentos de hibridização *in situ* descrito por Cox e Goldberg (1988).

Quanto aos cDNAs com expressão mais acentuada no estágio vermelho, dois padrões foram observados:

- (1) Expressão menos acentuada no estágio verde com aumento progressivo no amarelo e vermelho. Este padrão de expressão foi observado para os cDNAs 47 e 49.
- (2) Expressão semelhante nos estágios verde e amarelo e aumento da expressão no estágio vermelho. O cDNA 48 apresentou este padrão de expressão.

## **2.2. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VC – OPJ08**

Dos 14 cDNAs isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VC – OPJ08, 10 tiveram a expressão diferencial confirmada (Tabela 2, Figura 4). São eles: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13 e 18 – com expressão mais acentuada no estágio verde; 23 – com expressão mais acentuada no estágio amarelo e 26 – com expressão levemente mais acentuada no estágio vermelho. Os cDNAs 5, 6, 7, 9, 10, 11 e 18, assim como os cDNAs 8, 21, 22, 25, 30, 52 e 53 isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VC-OPJ10, apresentam expressão mais acentuada no estágio verde, com queda no estágio amarelo e aumento da expressão no estágio vermelho. O cDNA 13 apresentou expressão mais acentuada no estágio verde com queda acentuada nos estágios amarelo e

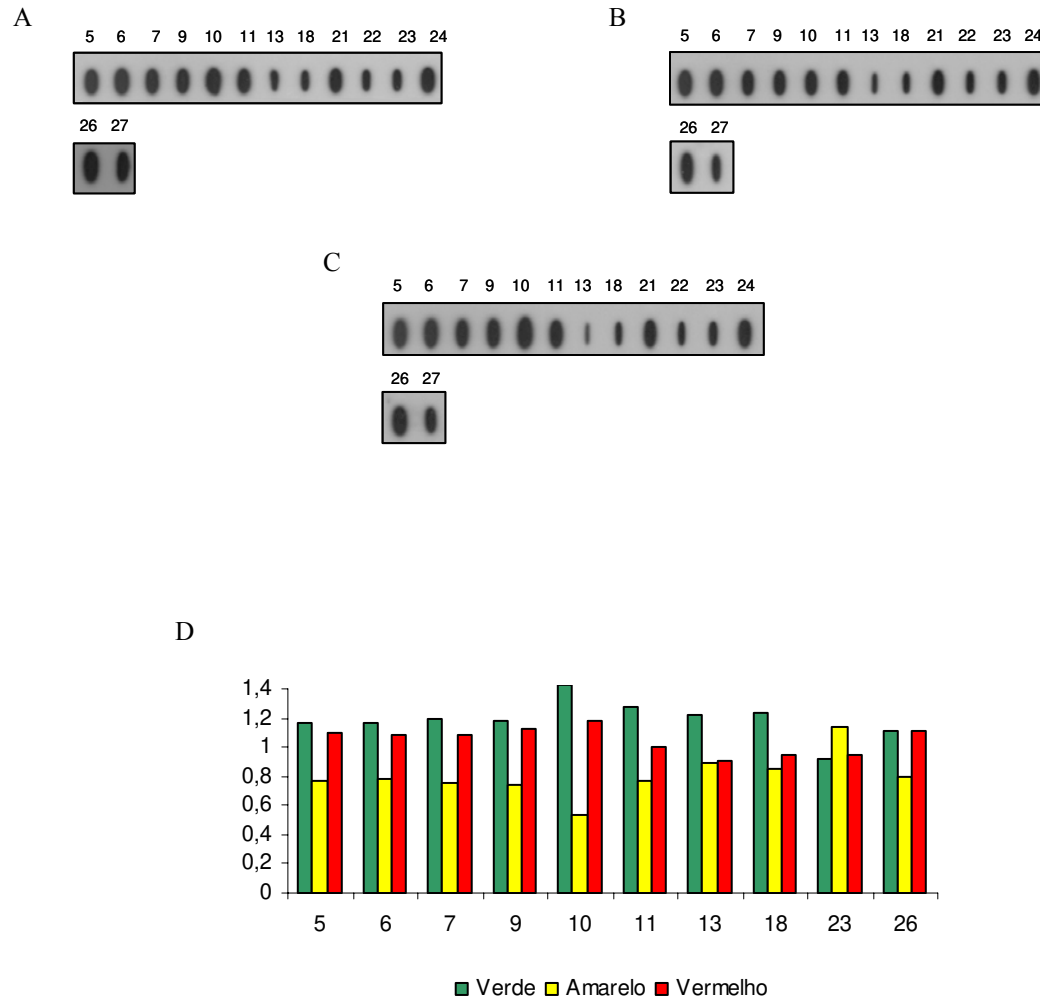


Figura 4: Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* T<sub>12</sub>VC-OPJ08. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio verde. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio amarelo. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio vermelho. (D) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs.

vermelho, sendo que nestes estágios a expressão foi semelhante. O cDNA 23, com expressão mais acentuada no estágio amarelo, apresentou expressão mais baixa nos estágios verde e vermelho. O cDNA 26, apresentou expressão levemente mais acentuada no estágio vermelho do que no verde e diminuição acentuada da expressão no estágio amarelo.

### **2.3. Análise da expressão diferencial dos cDNAs isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VG – OPJ10**

Entre os 35 cDNAs isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VG – OPJ10, 27 tiveram a expressão diferencial confirmada (Tabela 2, Figura 5). Assim sendo, os cDNAs 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 23, 25, 26, 27 e 28 apresentaram expressão mais acentuada no estágio verde; o cDNA 35 apresentou expressão mais acentuada no estágio amarelo e os cDNAs 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 e 46 apresentaram expressão mais acentuada no estágio vermelho.

Padrões de expressão diferentes foram observados entre os cDNAs com expressão mais acentuada no estágio verde. Os padrões de expressão observados foram:

- (1) Expressão mais acentuada no estágio verde com queda nos estágios amarelo e vermelho, sendo que, nestes estágios a expressão foi semelhante. Apresentaram este padrão de expressão os cDNAs: 7, 8, 9, 11, 17, 23 e 25.
- (2) Expressão mais acentuada no estágio verde com queda da expressão no estágio amarelo e aumento da expressão no estágio vermelho. Este padrão de expressão foi observado para os cDNAs: 10, 12, 15, 19, 26, 27 e 28.
- (3) Expressão mais acentuada no estágio verde e queda progressiva da expressão nos estágios amarelo e vermelho. Padrão de expressão observado para os cDNAs: 14 e 20.

O cDNA 35 foi o único com expressão mais acentuada no estágio amarelo (Figura 5). A expressão deste cDNA aumentou do estágio verde para o amarelo e a seguir, diminuiu do estágio amarelo para o vermelho.

Quanto aos cDNAs com expressão mais acentuada no estágio vermelho (Figura 5), 3 padrões foram observados:



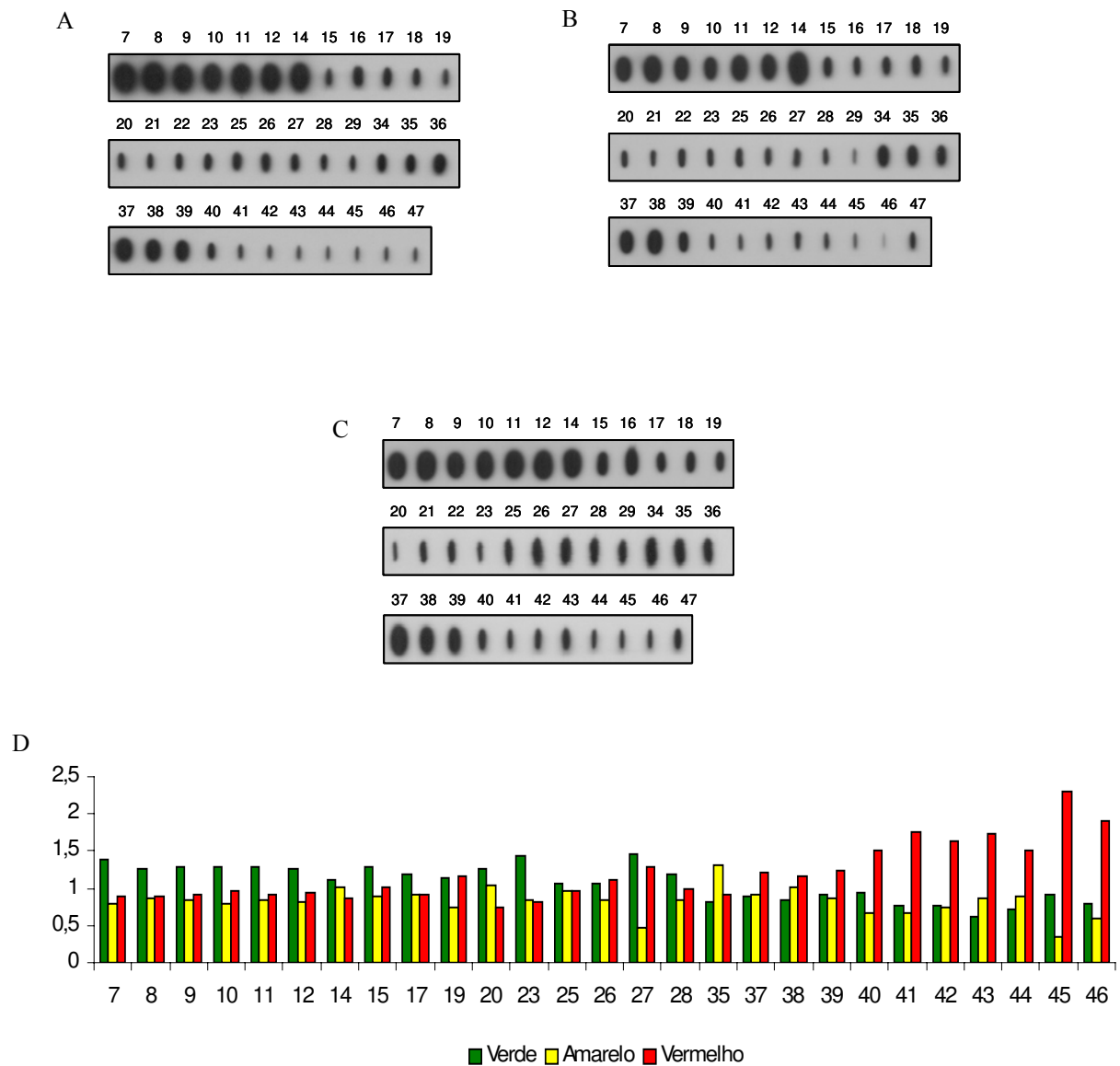


Figura 5: Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot*, dos cDNAs isolados através de *display* diferencial de mRNA com os *primers* T<sub>12</sub>VG-OPJ10. (A) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio verde. (B) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio amarelo. (C) membrana hibridizada com sonda de cDNA de fruto no estágio vermelho. (D) coeficiente de expressão (CE) dos cDNAs.

- (1) Queda da expressão do estágio verde para o amarelo e a seguir, aumento do estágio amarelo para o vermelho. Apresentaram este padrão de expressão os cDNAs: 40, 41, 45 e 46.
- (2) Aumento contínuo da expressão do estágio verde para o amarelo e do amarelo para o vermelho. Apresentaram este padrão de expressão os cDNAs: 38, 43 e 44.
- (3) Expressão semelhante nos estágios verde e amarelo e aumento da expressão no vermelho. Este padrão de expressão foi observado para os cDNAs: 37, 39 e 42.

### **3. Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs que tiveram a expressão diferencial confirmada**

Um total de 33 cDNAs que apresentaram os maiores coeficientes de expressão foram selecionados para clonagem e seqüenciamento. Assim sendo, foram selecionados 13 cDNAs isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VC – OPJ10. São eles: 4, 6, 13, 15, 17, 26, 32, 33, 34, 39, 40, 47 e 49. Entre os cDNAs isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VC – OPJ08 foram selecionados para clonagem o 13 e o 23. Um total de 18 cDNAs isolados com os *primers* T<sub>12</sub>VG – OPJ10 foram selecionados. São eles: 7, 8, 9, 15, 20, 23, 26, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 e 46.

Após a clonagem, os cDNAs foram seqüenciados e alguns desses cDNAs apresentaram seqüências repetidas, resultando, assim, em 19 seqüências não repetidas. O alinhamento das seqüências foi realizado com o auxílio do programa Clustal W (V. 1.82). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados com o auxílio do programa BLASTX (V. 2.2.6). Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 3. As seqüências de 13 cDNAs apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados, sendo 3 cDNAs de função desconhecida. A expressão destes cDNAs durante o desenvolvimento e maturação do fruto do café foi investigada através de experimentos de *slot blot* de RNA.

Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos com o seqüenciamento dos cDNAs. As cores indicam o estágio de maturação do fruto no qual o cDNA foi isolado.

cDNA	pb	Descrição (número de acesso)	Espécie	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)	Possível função
13VC-08	260	Proteína relacionada a Ras – Rab 7 (O24461)	<i>Prunus armeniaca</i>	4e-43	92	100	Sinalização celular
23VC-08	264	Phi-2 (BAB61098)	<i>Nicotiana tabacum</i>	7e-29	43	51	Fator de transcrição
9VG-10	560	Proteína do tipo Nodulina – MtN21 (AAM65952)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-10	48	74	Estrutural
23VG-10	256	Nenhuma similaridade					
26VG-10	331	Nenhuma similaridade					
35VG-10	457	Família das ubiquitinas (NP_192009)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-10	86	100	Catabolismo
38VG-10	514	Proteína expressa (NP_568342)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-17	81	85	?
39VG-10	403	Proteína expressa (NP_179517)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4e-31	80	87	?
40VG-10	444	Proteína de ligação a GTP Ras-like (AAB58478)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-11	91	94	Sinalização celular
43VG-10	345	Transposase (NP_187111)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9e-10	100	100	Transposição
44VG-10	331	Oxidoreductase putativa contendo FMN e FAD – NADPH dependente (BAB68073)	<i>Oryza sativa</i>	5e-04	90	95	Metabolismo
4VC-10	782	Proteína do tipo globulina (D85433)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7e-35	58	78	Reserva
13VC-10	572	Nenhuma similaridade					
26VC-10	366	Cadeia C CF0 ATP sintase (NP_084801)	<i>Lotus japonicus</i>	2e-13	95	97	Metabolismo
32VC-10	303	Nenhuma similaridade					
33VC-10	301	Proteína carreadora de Ubiquitina (AF180143)	<i>Glycine max</i>	9e-06	88	88	Catabolismo
34VC-10	299	Nenhuma similaridade					
40VC-10	251	Proteína desconhecida (AAN77300)	<i>Oryza sativa</i>	1e-14	90	93	?
49VC-10	261	Nenhuma similaridade					

#### 4. Análise e caracterização das seqüências com expressão mais acentuada no estágio verde

Como mostra a Tabela 3, 11 cDNAs isolados a partir de frutos verdes foram seqüenciados. Das 11 seqüências obtidas, 6 apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados sendo que, 5 (13VC-08, 9VG-10, 4VC-10, 26VC-10 e 33VC-10) com proteínas conhecidas. A expressão destes cDNAs durante o desenvolvimento e maturação do fruto foi analisada em experimentos de *slot blot* de RNA.

##### - 4VC-10

O cDNA 4VC-10 foi amplificado com os *primers* T<sub>12</sub>VC-OPJ10 e possui 782 pb. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos deste cDNA com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 58% de identidade e 78% de similaridade com uma proteína do tipo globulina de *Arabidopsis thaliana*. A Figura 6 mostra a comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos de 4VC-10 e a proteína de 499 aminoácidos de *Arabidopsis thaliana*. Outras seqüências com similaridades relevantes são descritas na Tabela 4.

```
Query: 4 PEATEIAVVLQGGKGMVRVVCPSLPNK--AECKNARFGVEEGDIFAVQRFHPMAQMAFNND 177
      P A EI++VL+G GMVRV+ S+ + +ECKN RF VEEGDIFAV R HPMAQM+FNND
Sbjct: 293 PWACEISIVLKGAGMVRVLRSSISSNTSSECKNVRFKVEEGDIFAVPRLHPMAQMSFNND 352

Query: 178 TLVFGVFSTSTENHPQYLAGKASVLRITLDKHILAASFGKNETTFDRLVNQQRESVILEC 357
      +LVFVGF+TS +NN PQ+LAG+ S LR LD+ +LAAS + T D L+ Q+E+VILEC
Sbjct: 353 SLVFGVFTTSAKNNEPQFLAGEDSALRMLDRQVLAASLNVSSVTIDGLLGAQKEAVILEC 412

Query: 358 TSLRRGRME 384
      S G +E
Sbjct: 413 HSCAEGEIE 421
```

Figura 6: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 4VC-10 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína do tipo globulina de *Arabidopsis thaliana*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruces os similares.

Tabela 4: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 4VC-10, organismos nos quais foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína do tipo globulina (D85433)	7e-35	58	78
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Possível proteína de reserva Vicilina (AAD12213)	7e-30	50	69
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Possível proteína de reserva de semente – Vicilina-like (E84685)	7e-16	42	56
<i>Daucus carota</i>	Proteína do tipo globulina (AAC15238)	6e-14	34	53
<i>Matteuccia struthiopteris</i>	Vicilina (CAA91187)	6e-13	38	58

As proteínas de reserva são as principais fontes de aminoácidos e nitrogênio durante a germinação e as fases iniciais de crescimento da plântula e representam mais de 50% dos compostos protéicos encontrados na semente (Pernollet e Mossé, 1983). As proteínas de reserva são classificadas em 4 grupos de acordo com a sua solubilidade: albuminas – solúveis em água; globulinas – solúveis em sal; prolaminas – solúveis em álcool; e glutelinas – solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas (Shewry *et al.*, 1995). As globulinas estão presentes em monocotiledôneas e dicotiledôneas, sendo divididas em dois grupos principais - legumina e vicilina - de acordo com o coeficiente de sedimentação, 11S e 7S, respectivamente (Shewry *et al.*, 1995).

As vicilinas foram encontradas em diversos organismos: *Picea glauca* (Newton *et al.*, 1992), *Theobroma cacao* (Spencer e Hodge, 1992), *Matteuccia struthiopteris* (Shutov *et al.*, 1998; Kakhovskaja *et al.*, 2003), *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), *Elaeis guineensis* (Morcillo *et al.*, 2001), *Olea europaea* (Wang *et al.*, 2001), entre outros.

Proteínas de reserva do tipo 11S já foram identificadas e caracterizadas em café, representando cerca de 50% do conteúdo protéico do fruto (Rogers *et al.*, 1999b; Marracini *et al.*, 1999). Rogers *et al.* (1999b) analisaram o acúmulo de mRNA e da proteína de reserva 11S em grãos de café em desenvolvimento. Foi observado que durante o desenvolvimento do grão ocorre um acúmulo do mRNA de proteína de reserva atingindo seu nível máximo entre 18 e 27 semanas após a florada. Após esse período, os níveis de mRNA decrescem.

As proteínas de reserva acumulam-se rapidamente entre 18 e 27 semanas após a florada e mantêm-se em níveis altos até o final da maturação (Rogers *et al.*, 1999b).

O cDNA 4VC-10 foi analisado através de *slot blot* de RNA (Figura 7). Esse experimento mostrou que a expressão desse cDNA é mais baixa nos estágios iniciais do desenvolvimento (chumbinho, chumbão e verde I), aumenta no estágio verde II e tem seu nível máximo no estágio verde. Durante a maturação o nível de expressão desse cDNA volta a cair (Figura 7). No final da maturação parte das proteínas, inclusive as proteínas de reserva, é degradada para a formação de compostos relacionados ao sabor do fruto. O mesmo acontece durante a torrefação onde proteínas são degradadas ou transformadas em outros compostos nitrogenados. Esses compostos são os responsáveis pelo sabor e determinam a qualidade da bebida (Montavon *et al.*, 2003).

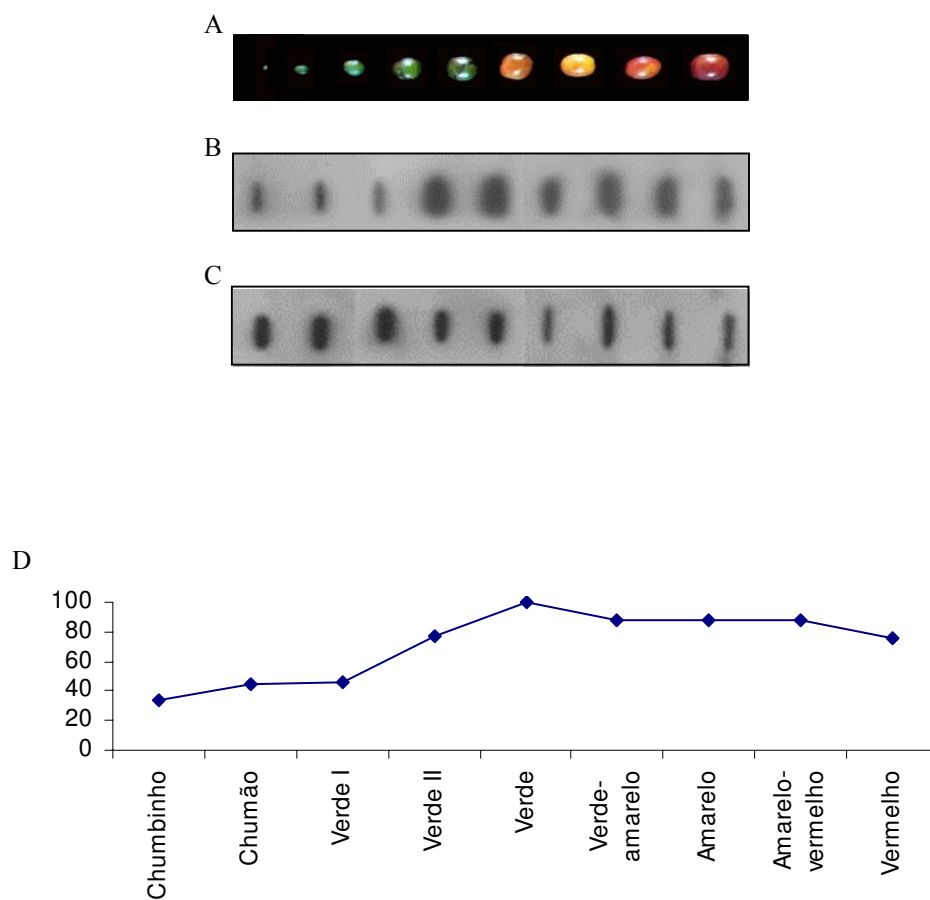


Figura 7: Caracterização do cDNA 4VC-10 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 4VC-10; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

## - 9VG-10

O cDNA 9VG-10 possui 560 pb e foi amplificado com os *primers* T<sub>12</sub>VG-OPJ10. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos deste cDNA com seqüências disponíveis em bancos de dados apresentou 48% de identidade e 74% de similaridade com proteína do tipo nodulina de 377 aminoácidos de *Arabidopsis thaliana* (Figura 8). As seqüências similares relevantes são descritas na Tabela 5.

```
Query: 239 FWYKELFPFTAMVATQCINVGVSIIIFKAATLKGLDFRVFMLYSYCISALLFPP 81
      ++ +E+ P TA+V +C NVG++ +FKAATLKG+ F VF++YSY ++ALL P
Sbjct: 5 YFQREVLPVTALVIMECANVGLNTLFKAATLKGMSFHVFIYVSYGLAALLLLP 57
```

Figura 8: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 9VG-10 e a seqüência de aminoácidos de uma nodulina de *Arabidopsis thaliana*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruzes mostram os similares.

Tabela 5: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 9VG-10, organismos nos quais foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nodulina MtN21 (AAM65952)	8e-10	48	74
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína nodulina-like (BAB10905)	2e-09	47	66
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nodulina integral de membrana (BAB01132)	4e-06	41	61

As nodulinas foram inicialmente consideradas como proteínas sintetizadas especificamente durante a simbiose da raiz com rizóbio. Esta simbiose origina nódulos na raiz onde ocorre a fixação do nitrogênio. Os nódulos são estruturas bem organizadas resultantes da interação planta-bactéria envolvendo expressão gênica diferencial e troca de sinais entre os organismos. Vários genes de plantas expressos somente ou em maior quantidade em nódulos foram identificados e seus produtos chamados de nodulinas (Kuster *et al.*, 1995). Atualmente é conhecida a expressão de genes da nodulina em tecidos não



simbióticos, sugerindo que estas proteínas participam de outros processos como, por exemplo, o transporte de água para dentro da célula (Journet *et al.*, 2001; Borstlap, 2002).

Uma nodulina isolada de nódulos de *Lotus japonicus* teve sua expressão avaliada em tecidos não simbióticos. Nesses experimentos, foi mostrado que o gene da nodulina apresenta expressão elevada no hipocótilo, caule, flores e frutos verdes, enquanto que nas folhas e nos cotilédones a expressão é baixa (Flemetakis *et al.*, 2000).

Um gene de *Antirrhium majus* que codifica uma proteína de membrana similar a nodulina foi identificado e seu nível de expressão analisado, através de *Northern blot*, em vários tecidos e durante o desenvolvimento da semente. Não foram detectados transcritos desse gene em raízes, folhas, caule e flores, sendo sua expressão predominante no início do desenvolvimento da semente. A expressão deste gene é maior durante a expansão do cotilédone e na substituição de tecidos de estocagem por tecidos fotossintéticos durante a germinação da semente (Culianez-Macia e Martin, 1993).

A análise da expressão do cDNA 9VG-10, através de *slot blot* de mRNA, durante o desenvolvimento e maturação do fruto do café mostrou a existência de uma menor quantidade de transcritos no início do desenvolvimento, aumentando até atingir o pico máximo no estágio verde II, caindo progressivamente do estágio verde até o final da maturação (Figura 9).

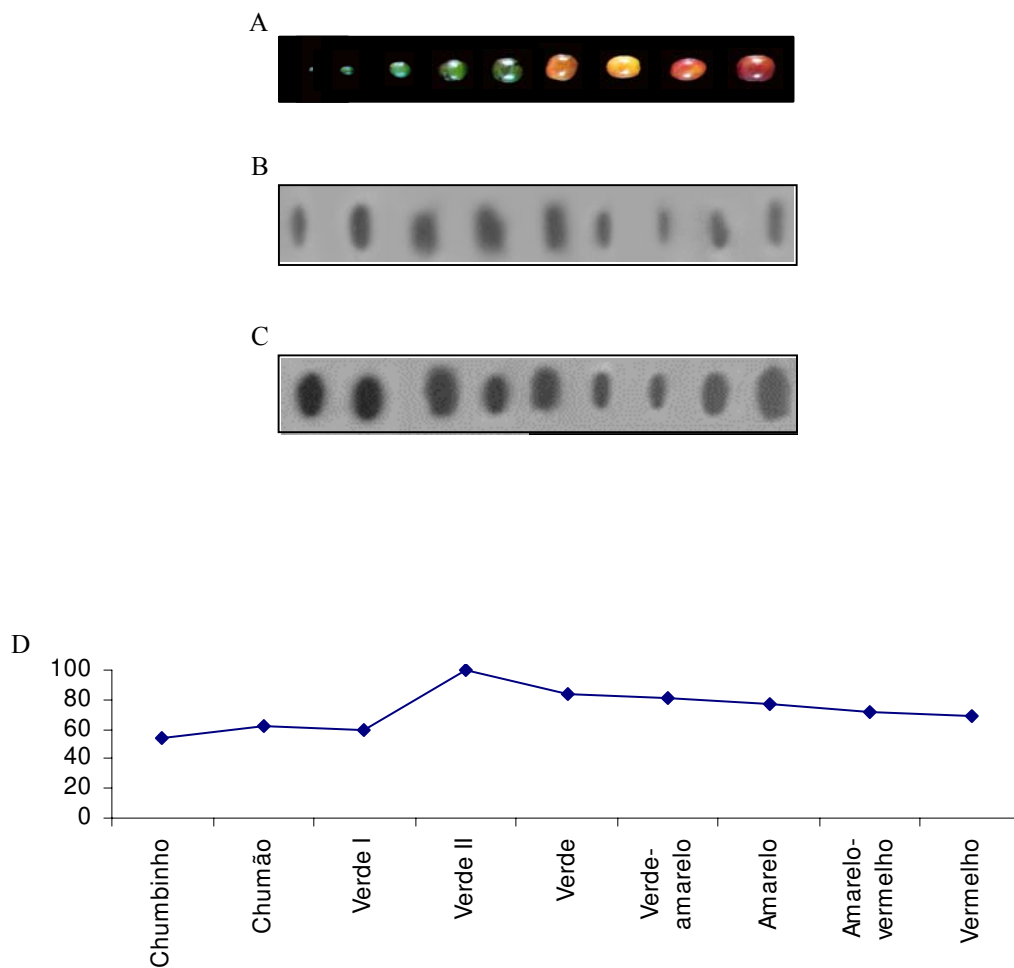


Figura 9: Caracterização do cDNA 9VG-10 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 9VG-10; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

## - 13VC-08

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 13VC-08 apresentou 92% de identidade e 100% de similaridade com a seqüência da proteína Rab7 de *Prunus armeniaca* de 207 aminoácidos (Figura 10). Este cDNA possui 260 pb, e foi amplificado com os *primers* T<sub>12</sub>VC-OPJ08. Outras seqüências com similaridades relevantes são descritas na Tabela 6.

```
Query: 3   YRGADCCVLVYDVNVMKSFENLNNWREEFLLQASPSDPENFPFIVLGNKVVDIDGGNSRVV 182
          YRGADCCVLVYDVNVMKSFENLNNWREEFL+QA+PSDPENFPF+VLGNK+D+DGGNSRVV
Sbjct: 78  YRGADCCVLVYDVNVMKSFENLNNWREEFLIQATPSDPENFPFVVVLGNKIDVDGGNSRVV 137

Query: 183 SEKKAKAWCASKGNIPYFETSAKK 254
          SEKKAKAWCASKGNIPYFETSAK+
Sbjct: 138 SEKKAKAWCASKGNIPYFETSAKE 161
```

Figura 10: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 13VC-08 e a seqüência de aminoácidos da proteína Rab7 de *Prunus armeniaca*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruzes mostram os similares.

As proteínas de ligação a GTP têm a capacidade de se ligar e hidrolisar moléculas de GTP e são divididas em duas superfamílias: proteínas de ligação a GTP, e proteínas G (Terry *et al.*, 1993). As proteínas de ligação a GTP são proteínas monoméricas, com peso molecular variando entre 21 e 30 kDa. São subdivididas em 5 famílias - Ras, Rho, Rab, Arf e Ran -, e apresentam grande diversidade de estrutura e função (Yang, 2002). Foi mostrado que essas proteínas participam no tráfego de vesículas, na manutenção da integridade de organelas, na montagem de vesículas, na expansão do retículo endoplasmático, na regulação do citoesqueleto, na ativação de lipases e no controle da transcrição (Bischoff *et al.*, 1999). As proteínas do grupo Ras foram as primeiras a serem descritas e alguns autores se referem à família de proteínas de ligação a GTP por Ras.

Tabela 6: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 13VC-08, organismos nos quais foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Prunus armeniaca</i>	Proteína relacionada a Ras – Rab 7 (O24461)	4e-43	92	100
<i>Nicotiana tabacum</i>	Proteína de ligação a GTP – Rab7b (T03629)	1e-42	94	98
<i>Gossypium hirsutum</i>	Proteína de ligação a GTP relacionada a Ras (AF115243)	1e-42	92	100
<i>Lotus japonicus</i>	RAB7C (CAA98171)	2e-42	90	100
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína de ligação a GTP relaciona a Ras (BAB01810)	2e-41	91	97
<i>Oryza sativa</i>	Pequena proteína de ligação a GTP (AAO67728)	5e-41	90	97
<i>Pisum sativum</i>	Proteína de ligação a GTP relacionada a Ras (CAA46600)	9e-41	86	98
<i>Homo sapiens</i>	Proteína Rab7 (CAA63763)	3e-28	65	84
<i>Drosophila melanogaster</i>	Proteína Rab7 (BAA88245)	5e-28	65	84
<i>Mus Musculus</i>	Rab7 (CAA61797)	1e-27	64	83

As proteínas do tipo Rab participam do tráfego de vesículas entre compartimentos específicos nas vias de endocitose e exocitose, e representam a maior família de proteínas de ligação a GTP, consistindo em mais de 20 membros diferentes. Em *Arabidopsis thaliana* foram identificadas 57 proteínas diferentes pertencentes à família Rab (Bischoff *et al.*, 1999).

As proteínas Rab7 são encontradas associadas com endossomo tardio e são requeridas no transporte de lipídeos e proteínas “para” e “do” endossomo tardio estando, portanto, envolvidas com a endocitose (Borg *et al.*, 1997; Bischoff *et al.*, 1999). *Nicotiana tabacum*, *Lotus japonicus*, *Pisum sativum* e *Prunus armeniaca* são alguns exemplos de plantas onde proteínas similares a Rab7 foram identificadas (Drew *et al.*, 1993; Haizel *et al.*, 1995; Borg *et al.*, 1997; Mbeguie-A-Mbeguie *et al.*, 1997). Em *Lotus japonicus*, foram encontrados 4 genes distintos de Rab7 denominados *rab7A*, *rab7B*, *rab7C* e *rab7D*. A expressão desses genes foi estudada através de *Northern blot*, sendo *rab7A* e *rab7B*

fortemente expressos em nódulos e pouco expressos em folhas e *rab7C* mais expressos em nódulos de raiz. A expressão do gene *rab7D* é constitutiva (Borg *et al.*, 1997). Em tabaco, o gene *Nt-Rab7* tem expressão acentuada em frutos verde e caule, baixa em tecidos florais, folhas e raízes (Haizel *et al.*, 1995).

Experimentos de *slot blot* de RNA mostraram que o cDNA 13VC-08, assim como o gene *Nt-Rab7* de tabaco, têm expressão mais acentuada durante o desenvolvimento do que na maturação (Figura 11). Sua maior expressão é observada no estágio verde II, ou seja, no final do desenvolvimento. A expressão deste cDNA neste estágio é cerca de 1,6 vez maior do que no início do desenvolvimento e 2 vezes maior do que a expressão no final da maturação.

#### - 26VC-10

A seqüência deduzida de aminoácidos deste cDNA apresentou 95% de identidade e 97% de similaridade com uma ATP sintase de *Lotus japonicus* (Tabela 7). A comparação entre as 2 seqüências é mostrada na Figura 12. Outras seqüências com similaridades relevantes são descritas na Tabela 7.

```
Query: 1   KPEAEGKIRGTLTLLSXAFMEALTIYGLVVALALLFANPFV 120
          +PEAEGKIRGTLTLLS AFMEALTIYGLVVALALLFANPFV
Sbjct: 42  QPEAEGKIRGTLTLLSLAFMEALTIYGLVVALALLFANPFV 81
```

Figura 12: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 26VC-10 e a seqüência de aminoácidos de uma ATP sintase de *Lotus japonicus*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruces mostram os similares.

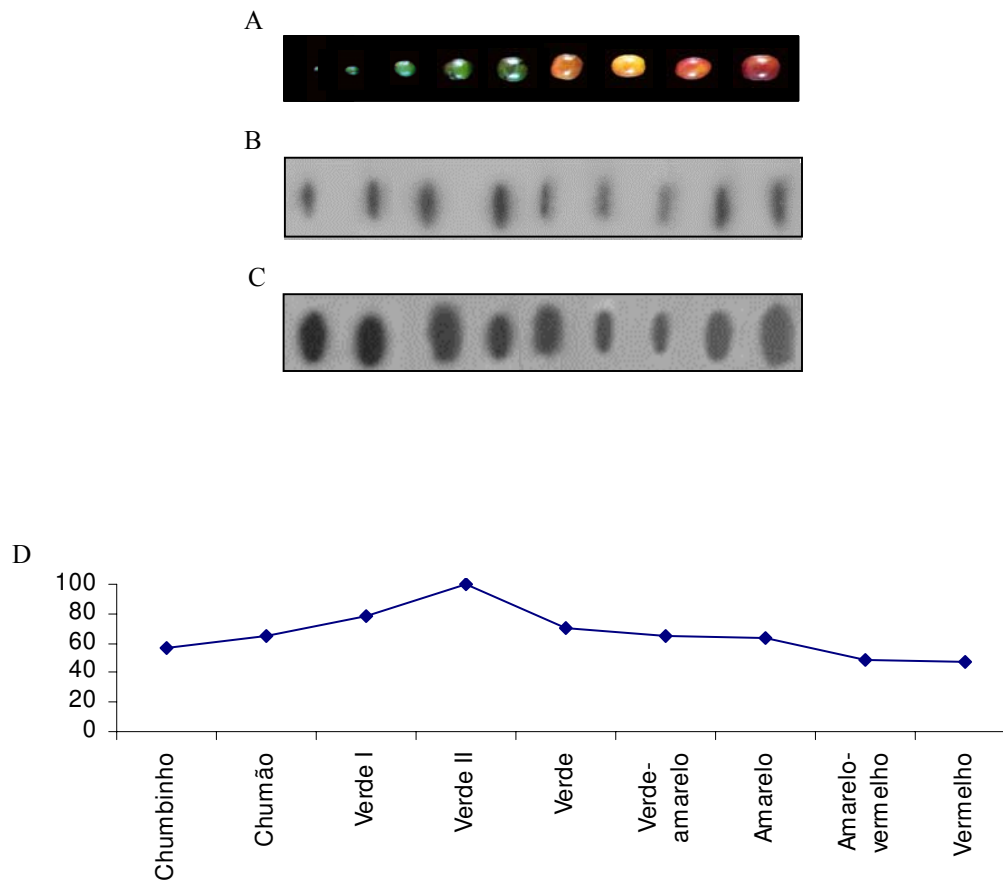


Figura 11: Caracterização do cDNA 13VC-08 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação do frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 13VC-08; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

Tabela 7: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 26VC-10, organismos nos quais foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Lotus japonicus</i>	Cadeia C ATP sintase CFO (NP_084081)	2e-13	95	97
<i>Nicotiana tabacum</i>	Cadeia C ATP sintase CFO (NP_054483)	2e-13	95	97
<i>Psilotum nudum</i>	Cadeia C ATP sintase CFO (NP_569616)	2e-13	95	97
<i>Anthoceros formosae</i>	Cadeia C ATP sintase CFO (NP_569876)	2e-13	95	97

A ATP sintase é um complexo enzimático localizado na membrana interna da mitocôndria e na membrana do tilacóide do cloroplasto, que catalisa a formação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico durante a fosforilação oxidativa e a fotossíntese, respectivamente. É formada por um componente integral da membrana (porção CF<sub>0</sub>) e uma porção periférica (CF<sub>1</sub>) acoplada a primeira. A subunidade CFO é constituída por uma proteína altamente hidrofóbica, com aproximadamente 8 kDa, que atua como um canal iônico por onde passam os prótons. A subunidade CF<sub>1</sub> contém o centro catalítico da enzima (PROSITE:PDOC00526).

Uma ATP sintase foi isolada, através de *display* diferencial de mRNA, em um estudo de expressão gênica diferencial em sementes dormentes e não-dormentes. A análise feita através de *Northern blot* revelou que a ATP sintase tem maior expressão em sementes dormentes, apesar de também ser encontrada em sementes não dormentes. A dormência é uma característica adaptativa que permite que a semente inicie sua germinação no período apropriado. Os autores acreditam que a expressão elevada da ATP sintase nestas sementes esteja associada a necessidade de ATP para a manutenção da viabilidade da semente até o momento da germinação (Fukao *et al.*, 2003).

A expressão do cDNA 26VC-10, analisada através de *slot blot* de RNA, é em torno que 4 vezes maior durante o desenvolvimento do fruto do que na maturação (Figura 13). No início do desenvolvimento (chumbinho) a expressão desse cDNA é alta e continua subindo

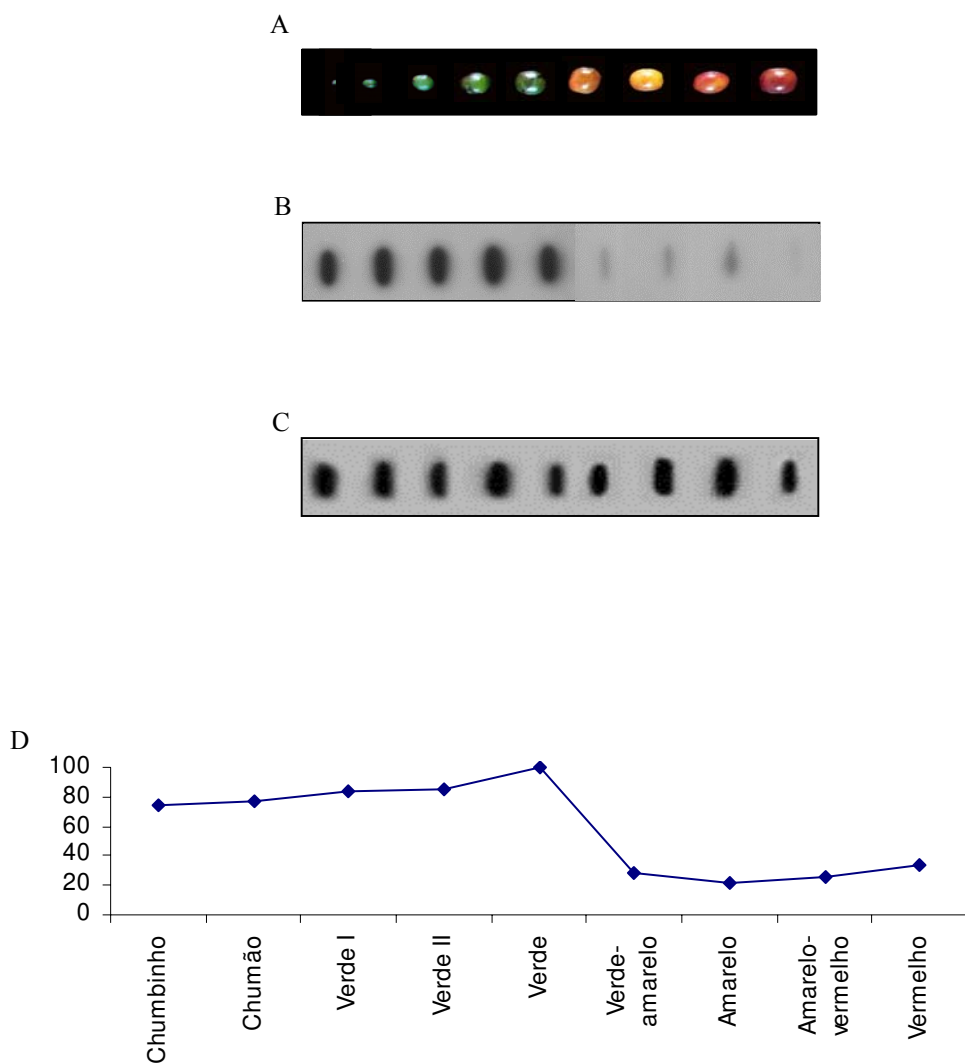


Figura 13: Caracterização do cDNA 26VC-10 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 26VC-10; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.



levemente até o estágio verde onde apresenta o maior nível de expressão. Do estágio verde para o verde-amarelo é observado uma queda brusca na expressão desse cDNA. A expressão permanece baixa até o final da maturação. A expressão acentuada de ATP sintase no início do desenvolvimento do fruto pode ser explicada pela alta demanda de ATP necessária para a divisão celular.

### - 33VC-10

O cDNA 33VC-10, de 301 pb, foi amplificado com os *primers* T<sub>12</sub>VC-OPJ10. A seqüência deduzida de aminoácidos deste cDNA apresentou 77% de identidade e 85% de similaridade com uma proteína carreadora de ubiquitina de 183 aminoácidos de *Glycine max* (Figura 14, Tabela 8).

```
Query: 7 EEKSSDEELSEDEYDSSDDAVAGPVDP 87
      EE SSDEEL+EDEYDSSD+ VAG DP
Sbjct: 157 EENSDEELTEDEYDSSDEQVAGKADP 183
```

Figura 14: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 33VC-10 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína carreadora de ubiquitina de *Glycine max*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruzes mostram os similares.

Tabela 8: Proteína que apresenta similaridade com o cDNA 33VC-10, organismo no qual foi descrita, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Glycine max</i>	Proteína carreadora de Ubiquitina (AFF03236)	1e-04	77	85

A ubiquitina é uma proteína, presente em células eucariótica, que participa no processo de marcação de proteínas para degradação, sendo de extrema importância na degradação de proteínas que regulam o ciclo celular, como as ciclinas e as ciclinas quinases, e no controle do crescimento e proliferação celular, por controlar a degradação de componentes da via de transdução de sinais (Hershko e Ciechanover, 1998).

A marcação da proteína a ser degradada é feita pela ligação covalente a uma ubiquitina. Para que ocorra essa ligação são requeridas às ações contínuas de 3 enzimas. Inicialmente, a porção C-terminal da ubiquitina é ativada, na presença de ATP, por uma enzima ativadora (E1). Nessa ativação, a ubiquitina é ligada a um resíduo de cisteína de E1 e ocorre a liberação de AMP. A ubiquitina ativada é então transferida para o resíduo de cisteína de uma proteína carreadora de ubiquitina (E2) e, finalmente, a ubiquitina é ligada pela sua porção C-terminal a um resíduo de lisina na proteína alvo em uma reação catalizada pela enzima ubiquitina ligase (E3) (Hershko e Ciechanover, 1998; Hellmann e Estelle, 2002).

Em plantas, genes que codificam para E2 foram identificados em várias espécies. Algumas espécies em que estes genes foram descritos são: *Medicago sativa* (Pramanik e Bewley, 1993); *Nicotiana sylvestris* (Genschik *et al.*, 1994); *Arabidopsis thaliana* (Yan *et al.*, 1997); *Zea mays* (de Vries *et al.*, 1998); *Glycine Max* (Fliegmann e Ebel, 1999); e *Catharanthus roseus* (Sibéril *et al.*, 2002). Em *Catharanthus roseus* foi observado que E2 tem maior expressão em frutos, flores e raízes do que em folhas (Sibéril *et al.*, 2002).

Em café, experimentos de *slot blot* de RNA mostraram que o cDNA que apresenta similaridade com a proteína carreadora de ubiquitina tem maior expressão durante o desenvolvimento do fruto do que na maturação (Figura 15). A expressão em chumbinho é bastante acentuada e continua aumentando até atingir seu pico no estágio verde II. Do verde II para o verde ocorre uma queda na expressão, que se acentua no verde-amarelo e passa a cair lentamente até o final da maturação. Como E2 participa na degradação de ciclinas mitóticas (de Vries *et al.*, 1998) é provável que sua maior expressão durante o desenvolvimento do fruto esteja relacionada com a alta taxa de divisão celular encontrada no início do desenvolvimento.

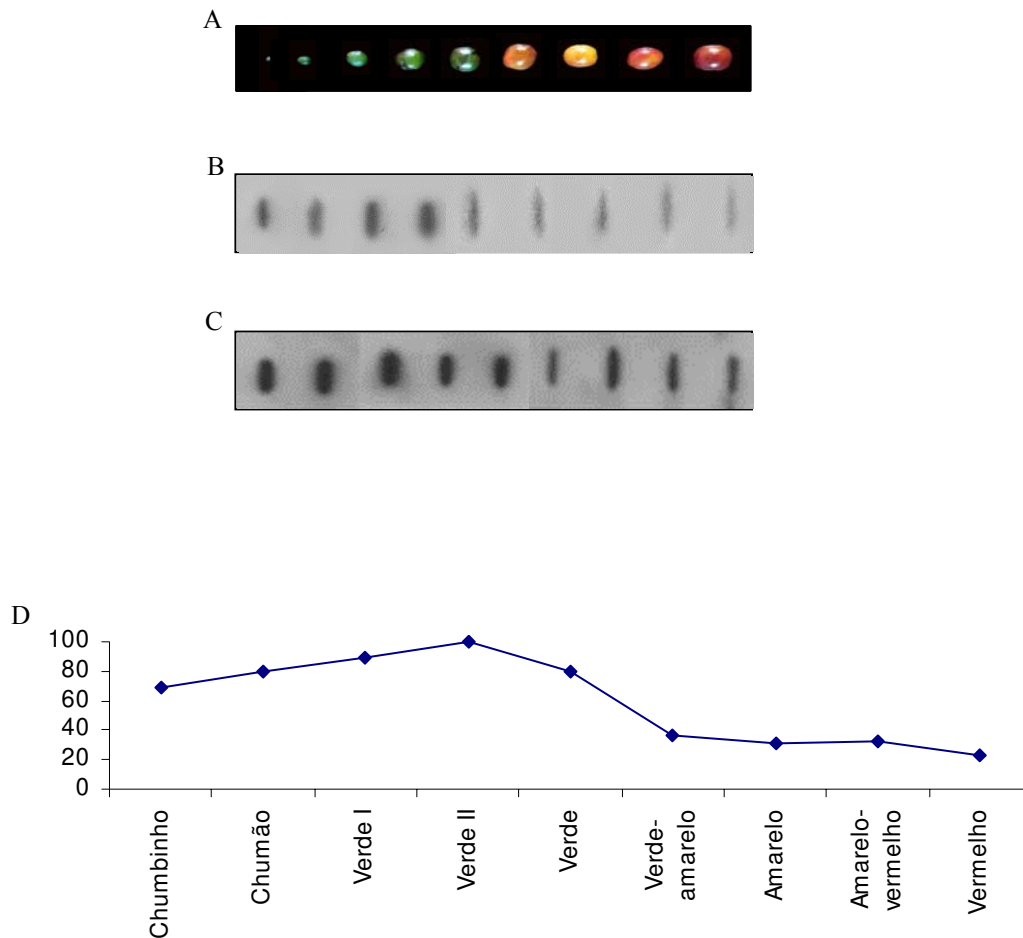


Figura 15: Caracterização do cDNA 33VC-10 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 33VC-10; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

## 5. Análise e caracterização das seqüências com expressão mais acentuada no estágio amarelo

Dois cDNAs com expressão mais acentuada no estágio amarelo foram clonados e seqüenciados. Ambos apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados. A expressão destes cDNAs, durante o desenvolvimento e maturação do fruto do café, foi caracterizada através de experimentos de *slot blot* de RNA.

### - 23VC-08

O cDNA 23VC-08 de 264 pb, foi amplificado com os *primers* T<sub>12</sub>VC-OPJ08. A seqüência deduzida de aminoácidos desse cDNA apresentou 43% de identidade e 51% de similaridade com a seqüência de aminoácidos da proteína phi-2 de *Nicotiana tabacum*. A Figura 16 mostra a comparação da seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 23VC-08 e a seqüência da proteína de *Nicotiana tabacum*. Outras seqüências com similaridades relevantes são descritas na Tabela 9.

```
Query: 110 TVAFASSLPLGNSVQQIGNNAQLASPGPNASVVGMTTAA--STVAQGGVAPTGVMMGIAGL 283
          TVAFAS +          Q+GN AQLASPG A +VGM+ + +T+ QG + GVM +AGL
Sbjct: 288 TVAFASPM-----QLGNTAQLASPGTRAPIVGMSPNSVNTTIIQGSIMQGGVMDMAGL 340
```

Figura 16: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 23VC-08 e a seqüência de aminoácidos da proteína phi-2 de *Nicotiana tabacum*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruzes mostram os similares.

A proteína phi-2, isolada de *Nicotiana tabacum*, é uma bZIP que participa da via de sinalização do ácido abscísico (ABA) (Sano e Nagato, 2002). As proteínas bZIP são fatores de transcrição que se ligam ao DNA, por uma região específica seguida por um zíper de leucina (PROSITE:PDO00036). O domínio zíper de leucina é formado por repetições de 7 leucinas, sendo pelo menos 4 separadas das demais por 6 outros aminoácidos. As proteínas bZIP apresentam estrutura em  $\alpha$ -hélice anfipática com aproximadamente 3,6 aminoácidos por volta. Essa conformação permite que essas proteínas se liguem ao DNA (Sibéril *et al.*, 2001).

Tabela 9: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 23VC-08, organismos nos quais foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Phi-2 (BAB61098)	7e-29	43	51
<i>Vitis vinifera</i>	Proteína bZIP putativa relacionada a maturação (CAB85632)	2e-22	37	47
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Elemento de resposta ao ácido abscísico (NP566629)	1e-16	38	43
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína 2 de ligação ao elemento de resposta do ABA – AREB2 (BAB12405)	1e-16	38	43
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fator de transcrição bZIP	5e-16	31	39
<i>Oryza sativa</i>	Fator de transcrição bZIP	8e-14	43	48

Durante o desenvolvimento e maturação do fruto o ABA é importante por regular a síntese de proteínas de reserva e lipídeos, promover a aquisição de tolerância a dessecação e a dormência da semente, além de regular o crescimento, a senescência e a maturação do fruto (Chandler e Robertson, 1994; Finkelstein *et al.*, 2002).

Algumas proteínas do tipo bZIP estão envolvidas na resposta ao ABA (Casareto e Ho, 2003). Hong *et al.* (2002) isolaram de *Cucumis melo* o gene *asr1*, que codifica um elemento de resposta ao ABA. Estes autores verificaram que a expressão desse gene ocorre apenas em fruto, aumentando durante o desenvolvimento e com expressão mais acentuada na fase intermediária da maturação. Após essa fase, a expressão desse gene volta a cair.

A expressão do cDNA 23VC-08 foi analisada através de *slot blot* de RNA. Esse experimento mostrou que a expressão deste cDNA é mais baixa nos estágios iniciais do desenvolvimento (chumbinho, chumbão e verde I), dobrando nos estágios verde II e verde, atingindo o seu pico no estágio verde-amarelo e voltando a cair até o final da maturação (Figura 17).

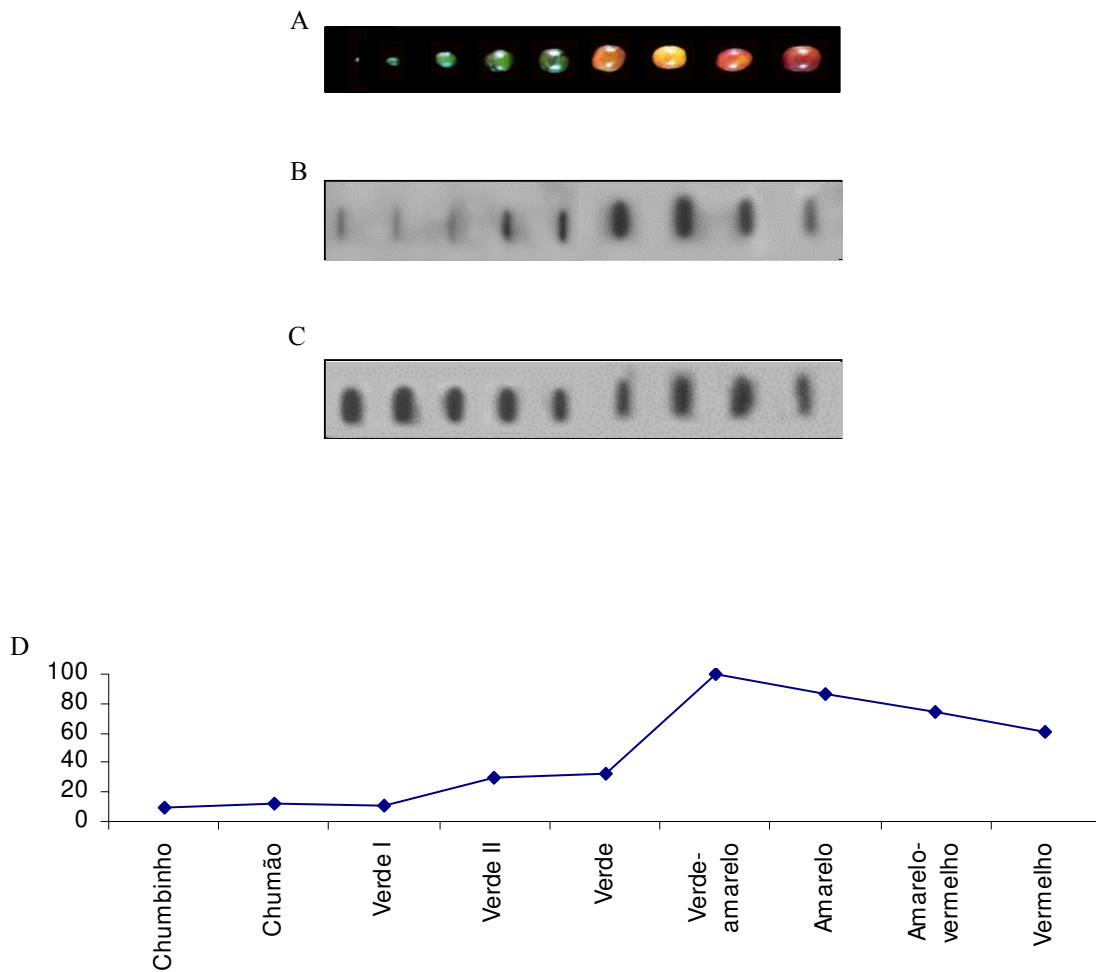


Figura 17: Caracterização do cDNA 23VC-08 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 23VC-08; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

## - 35VG-10

O cDNA 35VG-10, de 457 pb, foi amplificado com os *primers* T<sub>12</sub>VG-OPJ10. A comparação da seqüência deduzida de aminoácidos deste cDNA com seqüências disponíveis em banco de dados apresentou 86% de identidade e 100% de similaridade com uma ubiquitina de *Arabidopsis thaliana*. A Figura 18 mostra a comparação entre a seqüência deduzidas de aminoácidos do cDNA 35VG-10 e a proteína de *Arabidopsis thaliana*. Outras seqüências com similaridades relevantes são descritas na Tabela 10.

```
Query: 3   ARGLKCGGTLQERAARLFLKTTTPVE 80
          +RGLKCGGTL+ERAARLFLLK+TP++
Sbjct: 380 SRGLKCGGTLRERAARLFLKSTPLD 405
```

Figura 18: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 35VG-10 e a seqüência de aminoácidos de uma ubiquitina de *Arabidopsis thaliana*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruces mostram os similares.

Tabela 10: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 35VG-10, organismos nos quais elas foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Família das ubiquitinas (NP_192009)	1e-10	86	100
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína desconhecida (NP_850523)	8e-10	83	97

As ubiquitinas são proteínas de 76 aminoácidos que participam na degradação de proteínas sendo as responsáveis pela marcação das proteínas a serem degradadas. Com dito anteriormente, essa marcação consiste na ligação da porção C-terminal da ubiquitina com o resíduo de lisina da proteína-alvo e é catalizada por 3 enzimas: E1, E2, e E3. Após a adição da primeira ubiquitina é formada uma cadeia de poliubiquitina e a proteína ubiquitinilada é, então, degradada no proteossomo 26S na presença de ATP (Hershko e Ciechanover, 1998).

Alguns genes de ubiquitina foram isolados e analisados durante o desenvolvimento e maturação do fruto. O gene *ubi3* foi isolado em tomate e teve seu padrão de expressão

analisado. Esse gene é altamente expresso em todos os estágios de desenvolvimento e maturação do fruto, no caule, no óvulo, no pedúnculo e em sépalas, e apresenta baixa expressão em flores, folhas e no pecíolo. Entretanto, a maior expressão foi encontrada em frutos imaturos (Hoffman *et al.*, 1991).

Em café, uma ubiquitina diferencialmente expressa durante a embriogênese somática foi isolada através de *display* diferencial (Rojas-Herrera *et al.*, 2002). A análise da expressão mostrou que esse cDNA tem sua expressão aumentada durante embriogênese (Rojas-Herrera *et al.*, 2002).

A expressão do cDNA 35VG-10, durante o desenvolvimento e maturação do fruto do café, foi analisada através de *slot blot* de RNA. A expressão desse cDNA vai aumentando continuamente durante o desenvolvimento até atingir o máximo no estágio amarelo da maturação (Figura 19). Após esse estágio a expressão volta a cair. Esse padrão de expressão é muito diferente do que foi observado para a proteína carreadora de ubiquitina (Figura 15). Apesar de participarem dos mesmos eventos nas células, os genes que codificam para E2 são diferencialmente regulados e não necessariamente co-regulados com os genes da ubiquitina (de Vries *et al.*, 1998).

## **6. Análise e caracterização das seqüências com expressão mais acentuada no estágio vermelho**

Seis dos cDNAs com expressão mais acentuada no estágio vermelho foram clonados e seqüenciados. Desses, 3 apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados.



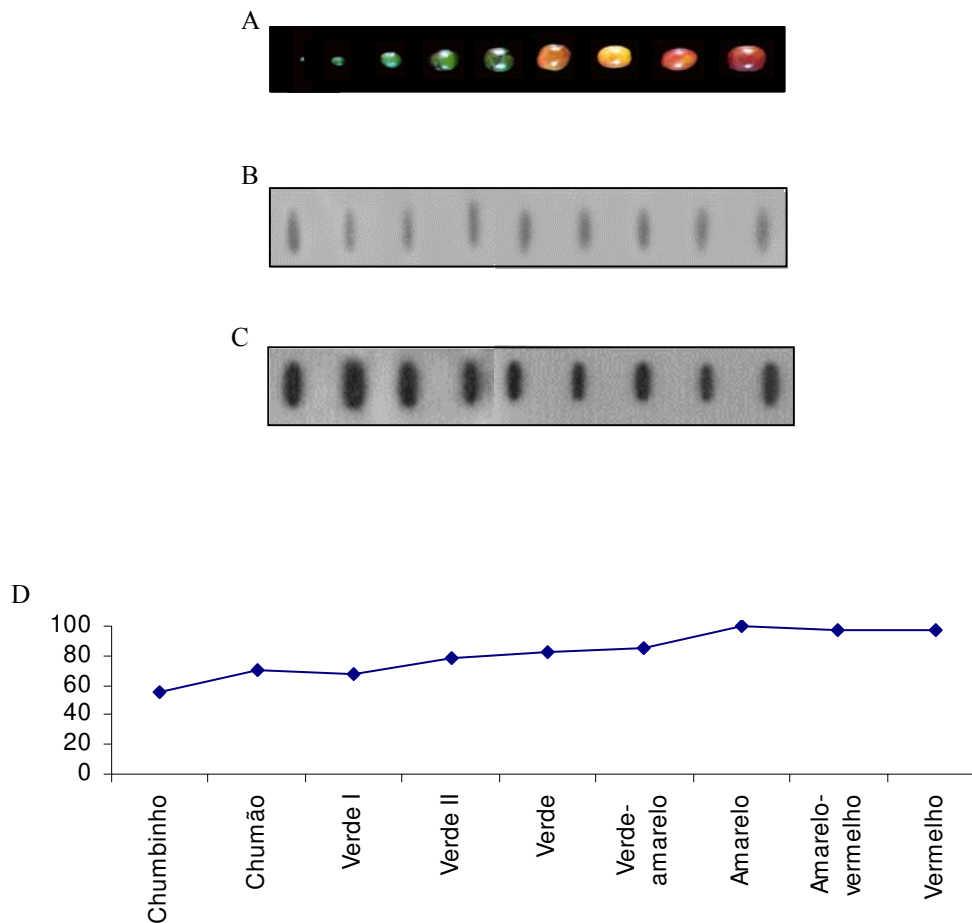


Figura 19: Caracterização do cDNA 35VG-10 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 35VG-10; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

## - 40VG-10

O cDNA 40VG-10 de 444 pb foi amplificado com os primers T12VG-OPJ10. A seqüência deduzida de aminoácidos deste cDNA foi comparada com seqüências disponíveis em bancos de dados e apresentou 91% de identidade e 94% de similaridade com uma proteína de ligação a GTP do tipo Ras de 221 aminoácidos (Figura 20). Outras seqüências com similaridades relevantes são descritas na Tabela 11.

```
Query: 106 TRKCHHRRQGVAEQQLEQAQPHAVAVQPSQSE 11
      TR+CHHR Q VA+ L QA PHA A QPS+ E
Sbjct: 773 TRRCHHRHQEVADLLLLQAPPHAAAQPSRFE 678
```

Figura 20: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 40VG-10 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína de ligação a GTP de *Arabidopsis thaliana*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruzes mostram os similares.

Tabela 11: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 40VG-10, organismos nos quais foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína de ligação a GTP Ras- <i>like</i> (AAB58478)	8e-11	91	94
<i>Cicer arietinum</i>	Proteína de ligação a GTP (CAC10213)	8e-11	91	94
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína de ligação a GTP induzida por estresse salino – Ran1 (AF017991)	8e-11	91	94
<i>Lotus japonicus</i>	Proteína nuclear de ligação a GTP – Ran1A (P54765)	1e-10	88	94

Com dito anteriormente, as proteínas de ligação a GTP são subdivididas em 5 famílias: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran. As proteínas da família Ran são encontradas tanto no citoplasma como no núcleo e apresentam baixa atividade GTPase. Suas principais funções

são a translocação de proteína para o núcleo através dos complexos de poros presentes na membrana nuclear e a regulação do ciclo celular (Yang, 2002).

Três genes que codificam para as proteínas Ran foram identificados em *Arabidopsis thaliana*: *AtRan1*, *AtRan2* e *AtRan3* (Haizel *et al.*, 1997). Estes genes apresentam padrão de expressão similar embora a expressão de *AtRan1* seja 2 vezes maior que a de *AtRan3* e 20 vezes maior que a de *AtRan2*. Esses genes são expressos em embriões em desenvolvimento e em raízes (Haizel *et al.*, 1997).

Em *Vicia faba*, Saalbach e Christov (1994) isolaram um cDNA com alta similaridade com a proteína Spi1, uma proteína Ran de levedura. A expressão desse cDNA foi avaliada em raízes, folhas e cotilédones, mostrando-se várias vezes maior em raízes do que em folhas e cotilédones. Os autores acreditam que essa proteína funcione na transdução de sinal, regulando o ciclo celular.

Experimentos de *slot blot* de RNA mostraram que o cDNA 40VG-10 apresenta dois picos de expressão, sendo um durante o desenvolvimento (chumbão) e um na maturação (vermelho), onde é 1,25 vez maior (Figura 21). A expressão desse cDNA é alta em chumbinho, aumenta ainda mais em chumbão, diminui levemente no verde I e cai a metade no verde II. Do verde II ao amarelo-vermelho a expressão volta a subir lentamente e praticamente dobra no estágio vermelho. É possível que a alta expressão encontrada no chumbão seja devida à participação das proteínas Ran no ciclo celular uma vez que, nesse estágio do desenvolvimento, o fruto aumenta rapidamente de tamanho. Sua função no fruto maduro não é muito clara.

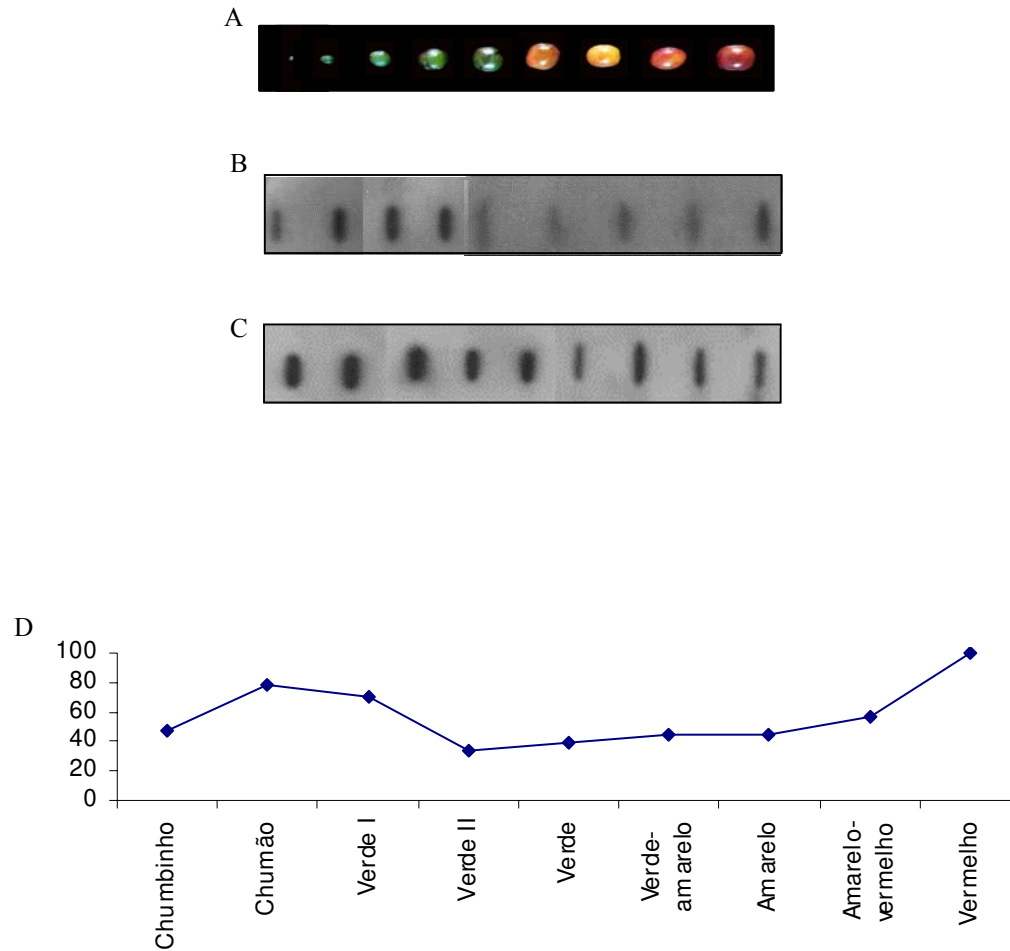


Figura 21: Caracterização do cDNA 40VG-10 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 40VG-10; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

## - 43VG-10

O cDNA 43VG-10 de 345 pb foi amplificado com os *primers* T<sub>12</sub>VG-OPJ10. Este cDNA apresenta 100% de identidade e 100% de similaridade com uma transposase de *Arabidopsis thaliana* de 757 aminoácidos (Figura 22). Outras seqüências similares relevantes são descritas na Tabela 12.

```
Query: 6   RGRVKRVVHCSRCNQTGHFRITTC AAPI 86
          RGRVKRVVHCSRCNQTGHFRITTC AAPI
Sbjct: 731 RGRVKRVVHCSRCNQTGHFRITTC AAPI 757
```

Figura 22: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 43VG-10 e a seqüência de aminoácidos de uma transposase de *Arabidopsis thaliana*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruzes mostram os similares.

Tabela 12: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 43VG-10, organismos nos quais foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	<i>E value</i>	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transposase (NP_187111)	9e-10	100	100
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transposase <i>mutator-like</i> (AC011437_6)	9e-10	100	100
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteína relacionada a mudrA (NP_172159)	3e-07	81	88

As transposases são enzimas associadas à transposição. Normalmente são codificadas pelo próprio elemento de transposição. Dessa forma, as transposases são responsáveis por catalisarem várias reações, entre elas o reconhecimento e a ligação da porção final do transposon, alinhamento das duas extremidades, clivagem endonucleotídica e associação e inserção do elemento no DNA (Benito e Walbot, 1997).

O *slot blot* de RNA mostrou que a expressão dessa transposase é mais baixa em chumbinho, aumenta lentamente durante o todo o desenvolvimento e a maturação do fruto, atingindo sua expressão mais acentuada no estágio vermelho (Figura 23).

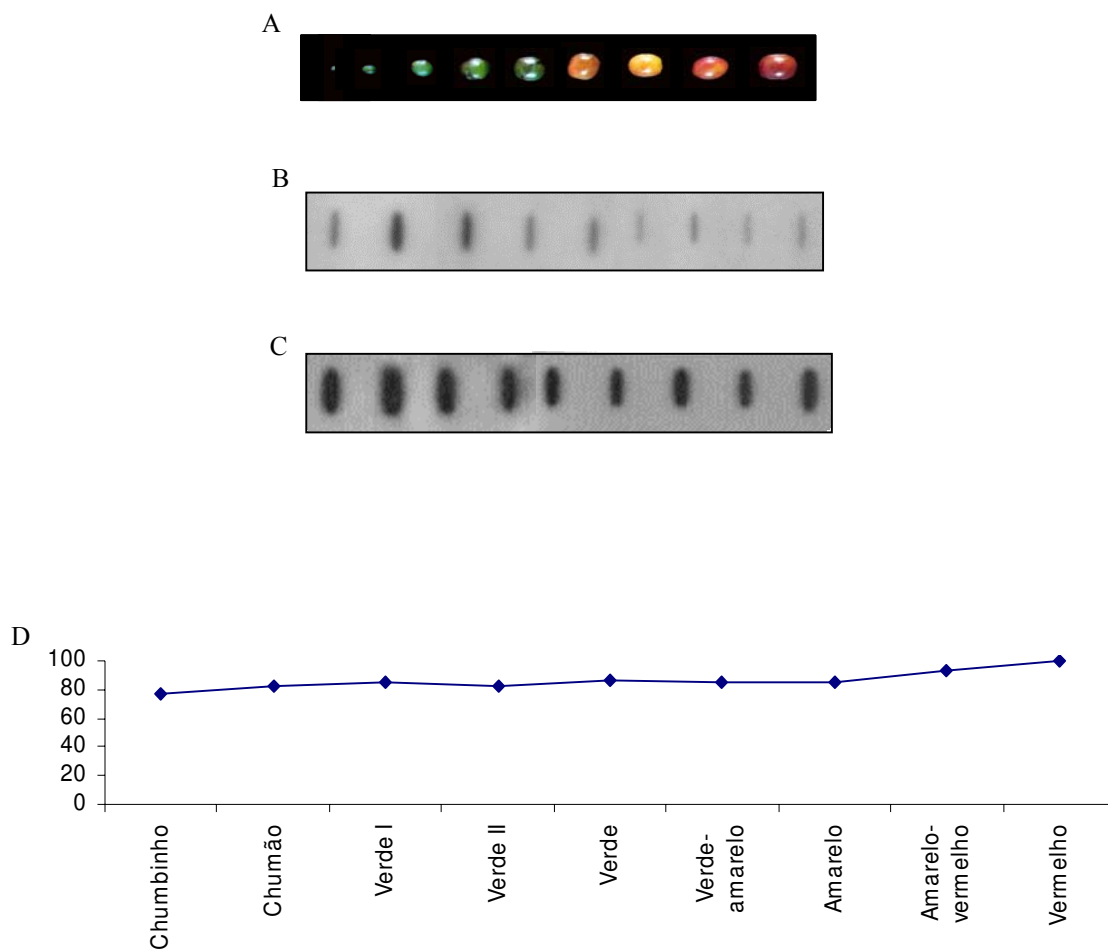


Figura 23: Caracterização do cDNA 43VG-10 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 43VG-10; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

## - 44VG-10

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 44VG-10 apresentou 90% de identidade e 95% de similaridade com a enzima oxidoreductase de *Oryza sativa* de 636 aminoácidos (Figura 24). Este cDNA de 331 pb foi amplificado com os *primers* T<sub>12</sub>VG-OPJ10. Outras seqüências similares relevantes são descritas na Tabela 13.

```
Query: 4   PEGRDDLYQYNQKERRTVLEV 66
          PEGRDDLYQYNQKE  RT+LEV
Sbjct: 369 PEGRDDLYQYNQKEGRTILEV 389
```

Figura 24: Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 44VG-10 e a seqüência de aminoácidos de uma oxidoreductase putativa de *Oryza sativa*. As letras mostram os resíduos idênticos e as cruces mostram os similares.

Tabela 13: Proteínas que apresentam similaridade com o cDNA 44VG-10, organismos nos quais foram descritas, *E value*, e porcentagem de resíduos idênticos e similares.

Organismo	Descrição	E value	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Oryza sativa</i>	Oxidoreductase putativa contendo FMN e FAD – NADPH dependente (BAB68073)	5e-04	90	95
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NADPH-ferredoxina redutase putativa	8e-4	85	95
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Família da flavodoxina	8e-04	85	95

As oxidoreductases são enzimas que catalisam a oxidação de um composto em outro. Entre elas estão a ferredoxina e a flavodoxina, que, apesar de apresentarem estruturas diferentes, encontram-se ligadas a flavina e desempenham a mesma função: transferência de elétrons. O NADPH atua como doador de elétrons para essas oxidoreductases (Setif, 2001).

Em *Arabidopsis thaliana*, foi isolada uma flavodoxina que responde a auxina em sementes em germinação. A expressão da flavoxina é maior em sementes tratadas com auxina, sendo a expressão mais acentuada nas raízes e no broto (Laskowski *et al.*, 2002).

A caracterização da expressão do cDNA 44VG-10, através de *slot blot* de RNA, mostrou que essa oxidoreductase tem maior expressão durante o desenvolvimento quando comparada com a maturação (Figura 25). Sua expressão em chumbinho é bastante elevada e continua a subir no chumbão e no verde I onde atinge seu nível máximo de expressão. A partir desse estágio o nível de expressão começa a diminuir, atingindo o nível mínimo no estágio amarelo-vermelho, e volta a subir no vermelho onde é cerca de 1,2 vez menor em relação ao verde I.



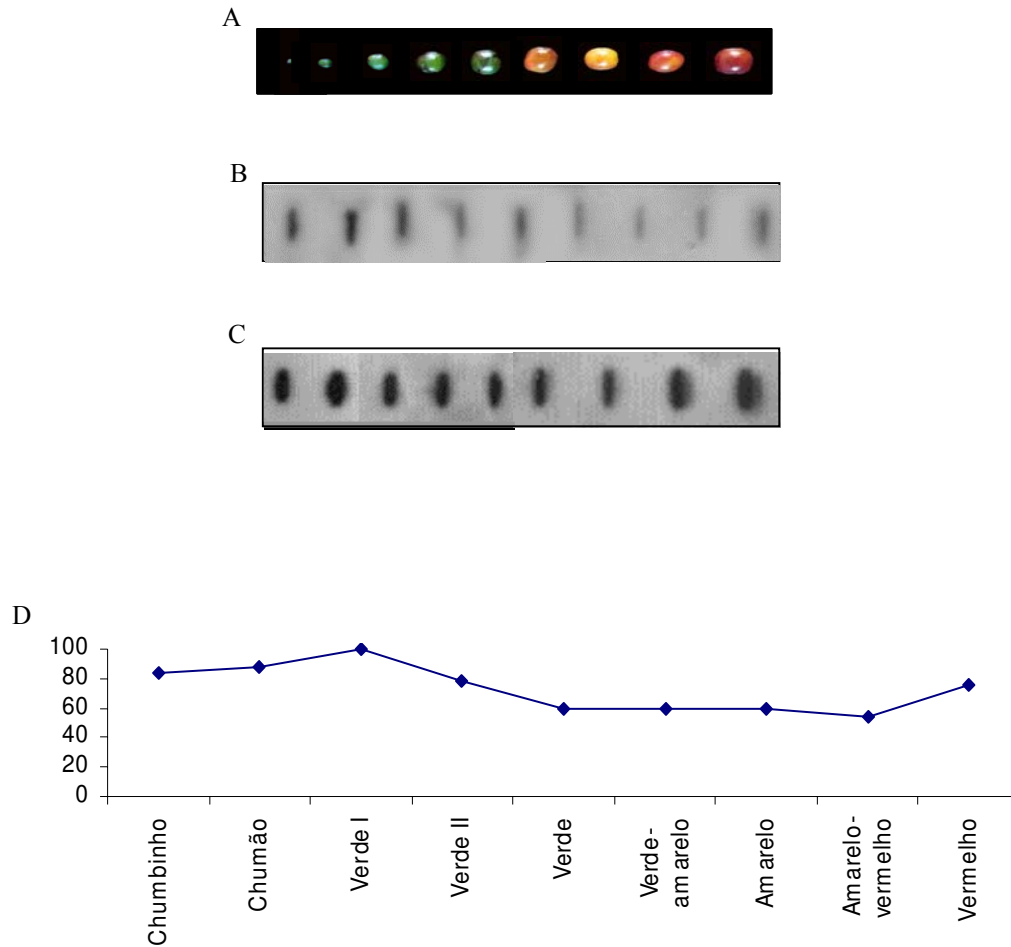


Figura 25: Caracterização do cDNA 44VG-10 durante 9 estágios de desenvolvimento e maturação do fruto do café através de *slot blot* de RNA. Em (A) estágios do desenvolvimento e maturação dos frutos utilizados para o isolamento de RNA; (B) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda 44VG-10; (C) *slot blot* de RNA hibridizado com a sonda de rDNA 26S; (D) gráfico, obtido a partir dos resultados de hibridização normalizados, mostrando a expressão (%) ao longo do desenvolvimento e maturação do fruto.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As seqüências deduzidas de aminoácidos dos cDNAs isolados no estágio verde apresentaram similaridade com vicilina, nodulina, ATP sintase, ubiquitina e proteína de ligação a GTP (Rab 7). Algumas dessas proteínas estão envolvidas em processos essenciais para a manutenção da célula e para diferenciação e divisão celular, como ATP sintase, ubiquitina, e proteína de ligação a GTP. A ATP sintase promove a síntese de ATP que, por sua vez, fornece energia para a manutenção da célula e para a divisão e diferenciação celular. A ubiquitina atua na degradação de proteínas, como as ciclinas que estão envolvidas no processo de divisão celular. Com a entrada do fruto na maturação é observada a expansão, com rápido aumento de tamanho. A proteína de ligação a GTP também participa da divisão celular.

A vicilina é uma proteína de reserva e como já foi demonstrado para outras espécies de plantas, ela é sintetizada de maneira abundante nos estágios iniciais da maturação. As proteínas de reserva são facilmente isoladas em experimentos de expressão diferencial em frutos. Em café, estudos anteriores com proteínas de reserva identificaram apenas a presença de leguminas.

A nodulina, embora já tenha sido isolada de outras plantas, não tem função muito clara na maturação. Uma hipótese é que as nodulinas estejam envolvidas no transporte de água para dentro das células.

O estágio amarelo é o estágio intermediário da maturação. A seqüência deduzida de aminoácidos dos cDNAs isolados desse estágio apresentaram similaridade com proteínas envolvidas no processo de maturação do fruto. A proteína Phi-2 é uma proteína que responde ao ABA e está diretamente relacionada com a maturação. O ABA atua no fruto regulando aspectos básicos para que o fruto alcance a maturação como a síntese de proteínas e lipídeos, aquisição a tolerância de dessecação, e crescimento.

A proteína carreadora de ubiquitina isolada no estágio amarelo, assim como a ubiquitina, participa do processo de degradação protéica. Entretanto, essa proteína é específica para o substrato que será degradado. Pode ser que ela esteja envolvida na degradação de compostos protéicos para fornecer nitrogênio livre para a síntese dos compostos relacionados ao sabor e ao aroma no fruto maduro.

No estágio vermelho foram isolados 3 cDNAs. As seqüências deduzidas de aminoácidos destes cDNAs apresentaram similaridade com proteína de ligação a GTP, oxidoreductase e transposase.

A proteína de ligação a GTP está relacionada com o transporte de proteínas para o núcleo e regulação da divisão celular. Esse cDNA também apresentou um pico de expressão no estágio chumbão o que pode estar relacionada com a divisão celular para o crescimento do fruto. No estágio vermelho, o papel dessa proteína não é muito claro. É possível que esses dois picos de expressão sejam resultado da expressão de diferentes membros de uma família multigênica. Se o cDNA isolado corresponder a uma região conservada deste gene a expressão observada pode estar sendo gerada por mais de um membro dessa família.

No estágio vermelho da maturação ocorre síntese intensa de compostos relacionados ao sabor e ao aroma do fruto maturo. Muitos deles são resultados de reações de oxidação. Um cDNA similar a uma oxidoreductase foi isolado nesta fase.

Até o momento, não havia sido descrita a presença de transposons em café. O isolamento de um cDNA cuja seqüência deduzida de aminoácidos é similar a uma transposase, é a primeira evidência da presença de transposons. A expressão desse cDNA aumenta gradativamente desde o início do desenvolvimento até o final da maturação. Seria interessante isolar o gene inteiro da transposase para estudos de aspectos evolutivos.

Alguns cDNAs não apresentaram similaridade em bancos de dados e não foram caracterizados. Entretanto, a grande maioria dos genes reguladores não é conhecida e é possível que estes cDNAs sem similaridade em bancos de dados sejam genes reguladores. Seria interessante uma caracterização detalhada desses genes, incluindo experimentos de cristalografia para observação da estrutura da proteína codificada por eles, para que sua possível função fosse elucidada.

Vale ressaltar que não existem trabalhos sobre a expressão diferencial de genes durante a maturação do fruto, sendo este um trabalho pioneiro na área que servirá de base para análises futuras.

## CONCLUSÕES

1. A seqüência deduzida de aminoácidos dos cDNAs isolados do estágio verde apresentaram, em sua maioria, similaridade com proteínas envolvidas em processos celulares básicos como a diferenciação e divisão celular.

2. A seqüência deduzida de aminoácidos dos cDNAs isolados do estágio amarelo apresentam similaridade com proteína envolvidas no processo de maturação.

3. A seqüência deduzida de aminoácidos dos cDNAs isolados no estágio vermelho apresentaram similaridade com proteínas envolvidas na síntese de compostos responsáveis pelo sabor e pelo aroma do fruto maduro e no transporte nuclear de proteínas.

5. Uma transposase foi isolada no estágio vermelho, sendo esta a primeira evidência da presença de transposons em café.

6. Este é um trabalho pioneiro na área e servirá de base para análises futuras.

## APÊNDICE

Seqüências dos clones de cDNA isolados através de *display* diferencial de mRNA em diferentes estágios de maturação.

### - 4VC-10

```
1 AAGCCCCGAGG CAACGGAGAT AGCAGTAGTA CTGCAAGGGA AGGGGATGGT TCGGGTAGTT
61 TGCCCAAGTC TACCGAACAA AGCAGAGTGC AAAAACGCGA GTTTGGGGT TGAAGAAGGC
121 GACATTTTCG CCGTGCAGAG GTTCCATCCC ATGGCGCAGA TGGCTTCAA CAACGATACG
181 CTCGTTTTTCG TTGGTTTCAG TACGTCAACG GAGAACAATC ACCCACAGTA TCTAGCAGGG
241 AAGGCATCAG TCCTCAGGAC TTTGGACAAG CACATCCTGG CAGCATCATT TGGAAAAAAT
301 GAAACTACCT TCGACAGGCT TGTGAATCAA CAACGCGAAT CGGTTATCTT AGAATGCACC
361 TCCCTGCGCA GAGGAAGAAT GGAGGATAAT GGAGAAGAGA TTGAGAGGGA AAGAGAGGAG
421 GCAAGGCAGA GGAAGAAGA GAGGAAAAGT CAGGAAGAGG AAGCTGATGC CGAGAGAAGA
481 GGAGGCAGTT AGGGAGAGAG CAGAGGAGGA AAGGAAGAAG AGAGAGCAAG AAAACTGCAA
541 GTTTTCATTT GGATCAGGAT GCACGAGGGT TAACGTTTAT ATCCAAAACA ACAGGCCGGG
601 AAGAAGAAAC TTATATCATG GCCAACTAGC TTAATTATGT TGCATCAAAA TTGGGACGAG
661 AGATTAGTAC ATCCACACAC ATTCCATCAA ACCTTGCTTT GAAAGGGACC GGAAGACAGC
721 TTATTCATCT CCCATGGCTA GCTCCAAGGC ATAGTCATCC CTTTCGACAG GTCCTCGGGC
781 TT
```

### - 13VC-10

```
1 AAGCCCCGAGG TTCAGATTGT TGCTCAGCCA TCGTATCTCT CTCTTATCTC GGTCTTGTGA
61 CCTGTCTAGC CCCACATCCA CGGCTAGAGT TGCATCCTCG ACTAGTCCCA TGCCTCTGAC
121 TTCGTCTACC CTTCAGGCTT CTTTTGAAAA ATAGACTATA TAGATATAAG TAAAATAAAA
181 TAGCTATAAAA ACTCAATAAAA AGCAGTTCAA AATCAATAAAA ATGAAAACGA TAGAACACAT
241 TTAATAATAAAA AACACTCTCT TCATATACAT ATCATAATAA GTCACATACC AAGTCATAAA
301 GTAAGTGTACA TGCCAACTTA GTAAAGTCAA GAACTTATAA CAATCAAAAAG ACATAGAACA
361 AAAGCATGCG CTATATGTAT ATCAACCTTA ACACGTCAAT ATCAAAAACA AAATAAAAAGA
421 TGACGTGTCA TCCCAACTAT TCCCTACTAT GTCCTAATA TCTCGCTCAA TCCTCAAAAC
481 TCTAGATCCC TAGCTTAGTT AGTCACCCGA CCCAATCGAT TCCGCCTCCT CCTCGGCTTA
541 ATCGAATCCC CNCGGCCGCA TGGCGCCGGG GA
```

### - 26VC-10

```
1 AAGCCCCGAGG CAGAGGGAAA AATACGAGGT ACTCTATTGC TCAGTCNAGC TTTTATGGAA
61 GCTTTAACAA TTTATGGACT GGTTGTAGCA TTAGCACTTT TGTTTGCAGG TCCTTTTGTGTT
121 TAATCTTATA AATATAAAAA TTATTGACTT GGATTGTGCA TTTGCTTTTT CGAATTATAG
181 TAAGATTTCA CTCCTACAAT TACTTATTCG TTGACAAAAT AACCCACGGG AAGGGCTGAT
241 TTGCGGATGA GGAATTGGTA TACCGACTCG CTTTCATCCT TTCCC GCCG GAGTCCAAGG
301 GAAACTAAGT ATTGGTAGTT CACACAACCT GAATACTTTT CAAAATAAGT AGGAAAAAAA
361 AAAAAA
```

### - 32VC-10

```
1 AAGCCCCGAGG CCTATGCTTT TTTGAATCCA ATCATAGATT TTATGCCAGT CATACTGTGTC
61 TTCTTTTTTT TATTAGCTTT TGTTTGGCAA GCTGCTGTAA GTTTTCGATG AGATATTTAA
121 TAATATCAGA GAAAATTCAT GATTTATGTG TGAAAAAGTT CTACAATTG ATAAGATCAG
181 ATAAGTTTTA GAGTATGAAC TCTCGATTCA AACATTGAAA TTCCTTGATA GTCGAGAAAA
241 GTCTGGCTTA CTCCGTTTC TTTTCTCAT TTATAAACCT TTCAGCAAA AAAAAAAAAA
301 AAA
```

### - 33VC-10

1 AAGCCCGAGG AGAAATCAAG TGATGAGGAG CTAAGCGAAG ATGAATACGA CTCTAGTGAT  
61 GACGCGGTGG CAGGCCAGT GGATCCTTAG CCCCTCCTAG TCCTAGTGGT TACTTGTACC  
121 TCTACATGAT TCTCTGGTTC CTGCATAATT GAACCTGAAC CTATTCATTG GGAAGGGATG  
181 CAAAAGAAGA AATCCCAGCC CTTAACATTA ATTCTCTCGT GTAAATATAT CCGGTGCTAA  
241 TACATTGCTT TTCTATTCTT GTTTATATGT TTACTCTTGG TGGTGCAAAA AAAAAAAAAA  
301 A

### - 34VC-10

1 AAGCCCGAGG GAGCATGACA AACACAAGTG TATGCTGACG TTTAACAGAA GAAAAGTGCC  
61 GTTGAAGACG GAAGACGGGG TTGCGACATT TCATGACAAA AAAAAATGA AATCTGAAAC  
121 AGACAAATTG GTTTTTCGGA GTACTTTCTT GTCCGCTGCT CATCTTATTC GAAATTTTCA  
181 TGATGTTCCCT AAAAGTGCTT CCCTGTCATA GCTACTGCTA CTTAATAATC GTGGAGATGA  
241 ATGAGATTTT GATGCAATTA TTGTATTTTT ACTAACTCGT TACGGCAAAA AAAAAAAAAA

### - 40VC-10

1 AAGCCCGAGG ACATACTACC ATGTGCAACC AGGCTAAGAA ATTCACTTGG AAGAAAGGTG  
61 GTCAAGTTGA AAACTCGGCA CGTTACCAAG CACCCTAGTG TTCAGGGTAC CTGGACAACA  
121 GAATTGAAGA TGTGAGCTAA AAAAGAGAGT TACTGATATC TAATCTATTC CGGGGTTTG  
181 GAACTACCTT AGTTTGTCTT TCCAAGTCTT TTGTCAGTAA ATTCATATGA TGGGATGCAA  
241 AAAAAAAAAA A

### - 49VC-10

1 AAGCCCGAGG AGGATAGTGA TGAAGATATG GGATTGAGCT TGTGTTGATTA GCGTTTGTG  
61 AATCTTATTC TCTTATAAAT GTAGTAGGAA GGTCTTTCAG TCCGTTGAAA TTTTGGGTA  
121 TAGCATTATG TTACTAGAAG GCGTTATGAT TTTCTTTTAC AATGTAGTTT ACTGAATGGA  
181 TAACTATGAT GCAAACGTGT TCTAGATTTT TATCCATTAA GCAGTTTGTG TCGTTTATA  
241 TTTGGGGAAA AAAAAAAAAA A

### - 13VC-08

1 CATACCGTGG AGCAGACTGT TGTGTTCTTG TGTACGATGT TAATGTCATG AAATCATTTG  
61 AAAATCTTAA CAACTGGCGG GAGGAATTTT TACTGCAGGC CAGTCCATCT GACCCTGAAA  
121 ACTTTCCATT TATTGTGTTG GGAAACAAGG TAGATATTGA TGGGGGCAAT AGTCGAGTGG  
181 TTTCCGAAAA GAAAGCAAAG GCATGGTGTG CTTCTAAGGG AAACATAACC TACTTTGAGA  
241 CATCTGCAAA AAAAAAAAAA

### - 23VC-08

1 CATACCGTGG GGAGGTAAAA GAAGATGCTT GAGAAGAACG CTGACAGGGC CTGGTAGAA  
61 CGGGAAGATA AAATCCTTGA CAAGAAGTAC TAATTCTAGG GCAGTACGAA CTCGAGCATT  
121 GTTTAGATAA GTGGATTGGA GTAGCTAGCT TGTATGATC TTTTTCTGT CTCCGCTGT  
181 AAACATGTTA GGTAGCTTTG TGAACAGAAG CAGGGAGTGN GGTGCAGTGA ATAAGGGAAC  
241 CTATTTGTAG CCAAAAAAAAAA AAAA

### - 9VG-10

1 AAGCCCGAGG AAGAGAAATC TACCAAGGAG ACCAATAGTT AATGGAGGAA GCTGTGATTT  
61 CAGTGGGAGA AGTAGCAAAG AGGGGGGAAA AGAAGAGCTG AAATGCAATA GGAATACAGC  
121 ATGAAGACAC GAAAGTCCAA GCCCTTCAAT GTGGCTGCTT TGAAGATGAT GCTCACACCG  
181 ACATTGATGC ATTGTGTTGC AACCATGGCT GTGAATGGAA ATAGCTCTTT ATACCAAAAC  
241 CCTTCTTCC GGTCCCCAT TTCTTCTCG TTTCTTCTCG TTTCTTCTCG GTATATTGTG  
301 GTGGTGGTGG CGGCGGCATT CCAGCGACTT CTACAGCAGC AACTCCGGTG GTCTCAACTC  
361 CTCGTGCGTT CCCCCTTCTT TTTTGCTCTG CTTTGCCCGA AAAGTTTATG GAATGGATGA  
421 TTGGTGGAGT TTAACGCTTC TGATGATGTT GAGTGATTGG AAATGATGAA TGATATATTG

481 ATTAGAACCG AGGAAAAGGA GGTAGGCAGG TTGATGAAGA AGATGAATGA TGGAGGACTG  
541 GTTCAACGTC CCTCGGGCTT

### - 23VG-10

1 AAGCCCCGAGG GGAAACTATG AATTTCCGGAG GAACAATTGG TGATGTAGCT CCTGCTTCTT  
61 GTGGATCATT ATTAATTTAG AGATTGACAA TTAIGTTAAA TATTTGATAT ATGCACAGCT  
121 TGTCGAGAGA CTTGAGAGTG GCCATTATTG ACTGCCGTTT AGTCTTAAAC TCTAGTTGTC  
181 CTATGCTGAG TTGTTTTGTT CCACAATTTG CTCCGCAATG TAATGCTCCT TTGTTACTGT  
241 CCCAAAAAAA AAAAAA

### - 26VG-10

1 AAGCCCCGAGG TACCGCTGTA CATTGAAGTA GTTTAGTATG GTATGAAAAA CACATTCCTA  
61 GACATGTTTT TATATTGTGT TTGGTATGTA ACAAAAACTT AGTACGCTGG ATTTGAGGAA  
121 ATGCAGTGT TCCAGTAGGG GAAAAATTC TAGAACTCAT GAAAAATTGA TTCTACTTGT  
181 AGAGTGGGGC TTAGATTTA AGCAATTTG TTGGTTGCG ATGCTTAGCG TTATTTTGCT  
241 GATGTAGTTT GAGGGATTTC CTCGTGTATG TGCTACATTG CAAATCATTG ATGAAATTCT  
301 TTCTGTTTTG CCAAAAAAAA AAAAAAAA A

### - 35VG-10

1 AAGCCCCGAGG ACTAAAATGT GGAGGTA CTGCAAGAACG TGCAAGAAGG CTTTTCTGTC  
61 TCAAACTAC CCCTGTAGAG AAGCTTCCAA AGAAGTTACT TGCCAAGAAG TGAATTTATT  
121 TGGAAATATT TTTTATTTGT AGGGATCCCA AATCGAATAG CCTGGAGAGA TGCTTGCAAT  
181 ATCATAACTG CAACCTAGTG TCCTGCTGGA TTGTCCCGTA CCGTGTTCAC TTATGCAAAG  
241 GATGTTTTAC ATTTGTGTTA AAAAAAGTTA ATTTGAGCC TTAGTATTAG GTCTAACGA  
301 AAAAAATATT GACGAGTTCT GGAGAAGCGT TGACGCTGTG TAAGGTTTAA GCCCGTATGG  
361 GCCATCATGC ATAAGATAGG CTGTATATAT TTTCTCATCC GGACTTTGGT GCATATCGAG  
421 TGGATCTGGT ATTTTCCTGC CCAAAAAAAA AAAAAA

### - 38VG-10

1 AAGCCCCGAGG ATAACACCAA TAGGCAGCCC TCCGCCGACC GCTTTTCCGG TAGTCACGTC  
61 ATACCTCGCA AACCTCTTCT TCGGCCTCT GCATTGTGGG CATGCATAAT CATCCGGCTG  
121 CAACCAACCA ACAGAACACA CCCAGTTACA TTACCATGGC AAATTTTAAA AAAATGGTGT  
181 AATGGTAAAT AACTACTCT CAATTTTAAA AATGAAGAAA CTAGTGACGA AAGCTCGCCT  
241 GCTCGTCGAA AGGTTTCGTT AAGGTGTATA TGTACCCGCA GTCGAGACAT ATATGAGTTG  
301 CTCGATCCTG GAAGATTAGA AATATCAGTC AGGCGGGGTT GCTGGGGATG AAACCTCACGG  
361 AGGAGGCATA GCATACCAAT TAACCAATT ATATATTCAG CCTGCCTTT GAGCGGGCGT  
421 AACTTTCCGT CCAATCGAGG GGGTGCTGGG CCGCTTCTGC AGTCTTTTTG ACGTCCACAT  
481 CAGCTCCTCT TGCATTCCCA AAAAAAAA AAAA

### - 39VG-10

1 AAGCCCCGAGG AAATAGTTGA GGTGAAACAG GATGAGTTGA TGAAGAATCG GCCTAGGGAG  
61 GACCAGGTCA AATTAAGTGG AATTGCTTTT GGGCCAGCTT ACCAGCCTAC TTCAACCAAA  
121 GGAAAGCCTT CAAAGCTGCA CAAGAGGAAG CATCAGATTG GGTCCTTGT CTTGATATG  
181 AAGCAGAAAG AGATGGAAT TCCAGAGCGA CGTGCCAGAG GCTTCCTCAC CAAAGCTCAA  
241 ACACAGGGAA AGTATGGGCC GGTGGGAAGA AGTTGATTTG CTTGTGTTCA GTGCACCTGA  
301 GCAAGTATTG CTAACCAAGA AAACTTTTC TTTTCATTCT TCCTCTCTTC TTATACAACC  
361 CGCTTAAATC ATACGTAAAA GGGGATTTT GGGGCATTT TTG

### - 40VG-10

1 AAGCCCCGAGG TTCAGATTGA CTTGGTTGCA CAGCAACAGC ATGAGGCTGA GCTTGCTCAA  
61 GCTGCTGCTC AGCCACTCCC TGACGACGAT GATGACACTT TCGAGTAAGG AGCAGCTGGA  
121 TGGAGCTTGG AGTGCTCTG TTATGGAATT TGTGGCATT TCCATCGATA GGTTCTCTTG  
181 CCATCTATAG GTTTCAGAAA TTTTGCTCC ATATTAGAAA GTATCGAGGG ATTTTTCATC  
241 GATCAGTTA GGAATTTTCA AACTTCTGTA TGTGTTGCTT TGATTTGTTT GTGAGAAGGA

301 CCCGATGTGG TTACTCAGTT AAAGATCCGG TGGACTATTG TTTGTATGAA CTAAGACTGC  
361 ATGCAGATTT TAGTTTTTTC ATGATTAAGG GGGCATTTCG CTTATAATTC AATTTTTGCG  
421 TGCCGGGACC CAAAAAAAAA AAAA

### - 43VG-10

1 AAGCCCGAGG ACGTGTAAG CGAGTTGTGC ATTGTAGCCG TTGCAATCAG ACTGGCCACT  
61 TCAGGACAAC ATGCGCAGCA CCTATTGAG TCTCATAGTG GAAGGTGTTT GCTGCCTTAG  
121 AATTTAGTAA ATGTTTCTTG TGCAGAGTGA AGATAGTTTG TTAGATCTTG CTAATATTTG  
181 TGGAGTTCTA TTATTTATCT TTTGCAAGTT CATAATGTAA TTCTTGCTAC TGGCAATCGT  
241 GTTTAGACTC CCCTTTAATA AAATGATTAG GTCATCTACA GAAGTCTGTT TACTTTAAAG  
301 TGCCAGGAAT TTATCCTGAG CGTTTATTTT CGAAAAAAAA AAAA

### - 44VG-10

1 AAGCCCGAGG GAAGAGATGA TCTATATCAA TACAACCAA AGGAACGAAG AACTGTGCTG  
61 GAGGTGCCAC CTTTATTAAT AATATGAACT AACACCAGA GATAGTTACC TTTGATCTG  
121 TTTGATTGTG CATGGCAGTT TACTTTCTTC CACTATAACA TGGGCAGTTT AGTTAATTTT  
181 GCCTTCAGAA ATGATACATG GAATGCACGT CCATTGTGGA GGATGCACTG GCGATCTTTC  
241 CAAATATATA GTGGAATTC CAATTTATTA TACCTTTTGT CACTGAGATG AATTGCTCT  
301 CTCAGGTCAT CTGTCCCAA AAAAAAAAAA A



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aharoni, A.; O'Connell, A. P. (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J. Exp. Bot.* 53(377), 2073-2087.
- Akaffou, D. S.; Ky, C. L.; Barre, P.; Hamon, S.; Louran, J.; Noirot, M. (2003) Identification and mapping of major gene (Ft1) involved in frutification time in the interspecific cross *Coffea pseudozanguebarie* x *C. liberica* var. Dewevrei: impact on caffeine content and seed weight. *Theor. Appl. Genet.* 106, 1486-1490.
- Ampomah-Dwamena, C.; Morris, B. A.; Sutherland, P.; Veit, B.; Yao, J. (2002) Down-regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiol.* 130, 605-617.
- Appel, M.; Bellstedt, D. U.; Gresshoff, P. M. (1999) Differential display of eukaryotic mRNA: meeting the demands of the new millennium? *J. Plant Physiol.* 154, 561-570.
- Assmann, E. M.; Ottoboni, L. M. M.; Ferraz, A.; Rodriguez, J.; Mello, M. P. (2003) Iron-responsive genes of *Phanerochaete chrysosporium* isolated by differential display reverse transcription polymerase chain reaction. *Env. Microbiol.* 5(9), 77-786.
- Benítez-Burraco, A.; Blanco-Portela, R.; Redondo-Nevado, J.; Bellido, M. L.; Moyano, E.; Caballero, J.; Muñoz-Blanco, J. (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria Xananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.* 54(383), 633-645.
- Benito, M.; Walbot, V. (1997) Characterization of the maize *mutator* transposable element MURA transposase as a DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 17(9), 5165-5175.
- Bischoff, F.; Molendijk, A.; Rajendrakumar, C. S. V.; Palme, K. (1999) GTP-binding proteins in plant. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 233-256.
- Borg, S.; Brandsturp, B.; Jensen, T. J.; Poulsen, C. (1997) Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules. *Plant J.* 11(2), 237-250.

- Borstlap, A. C. (2002) Early diversification of plant aquaporins. *Trends in Plant Sci.* 7(12), 529-530.
- Bramley, P. M. (2002) Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53(377), 2107-2113.
- Camargo, A. P.; Camargo, M. B. P.; Pallone Filho, W. J. (2001) Modelo climático-fenológico para determinação das necessidades de irrigação de café arábica na região norte de São Paulo e no triângulo mineiro. Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 190. Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas, SP.
- Carvalho, A. (1993) Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil. Documentos IAC, Campinas, 34.
- Casaretto, J.; Ho, T. D. (2003) The transcription factor HvABI5 and HvVP1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. *Plant Cell* 15, 271-284.
- Chandler, P. M.; Robertson, M. (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 113-141.
- Collinge, M.; Boller, T. (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol. Biol.* 46, 521-529.
- Company, P.; González-Bosch, C. (2003) Identification of a copper chaperone from tomato fruits infected with *Botrytis cinerea* by differential display. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 304, 825-830.
- Corre-Menguy, F.; Cejudo, F. J.; Mazubert, C.; Vidal, J.; Lelandais-Brière, C.; Torres, G.; Rode, A.; Hartmann, C. (2002) Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development. *Plant Mol. Biol.* 50, 687-698.
- Cox, K. H.; Goldberg, R. B. (1988) Analysis of plant gene expression. In: *Plant Molecular Biology: a practical approach*. pp 1-35. IRL Press, Oxford, England.

- Culianez-Macia, F. A.; Martin, C. (1993) DIP: a member of the the MIP family of membrane proteins that is expressed in mature seeds and dark-grown seedlings of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 4(4), 717-725.
- Dedecca, D. M. (1957) Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *Typica* Cramer. *Bragantia*, Campinas, 16, 315-366.
- De Vries, A.; Cordts, S.; Dresselhaus, T. (1998) Molecular characterization of a cDNA encoding na ubiquitin carrier protein (UBC7) isolated from egg cells do maize (PGR98-177). *Plant Physiol.* 118, 1101.
- Dong, Y.; Yao, J.; Atkinson, R. G.; Putterill, J. J.; Morris, B. A.; gardner, R. C. (2000) *MDH1*: an apple homeobox gene belonging to the *BEL1* family. *Plant Mol. Biol.* 42, 623-633.
- Donson, J.; Fang, Y.; Espiritu-Santo, G.; Xing, W.; Salazar, A.; Miyamoto, S.; Armendarez, V.; Volkmuth, W. (2002) Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol. Biol.* 48, 75-97.
- Drew, J. E.; Bown, D.; Gatehouse, J. A. (1993) Sequence of a novel plant *ras*-related cDNA from *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* 21, 1195-1199.
- Dunaeva, M.; Adamska, I. (2001) Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. *Eur. J. Biochem.* 268, 5521-5529.
- Evers, D.; Ghislain, M.; Hausman, J.; Dommes, J. (2003) Differential expression in two potatos lines differing in their resitance to *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.* 160, 709-712.
- Fernandes, S. M.; Pereira, R. G.; Nery, F.; Pinto, N. A. V. (2001) Caracterização da composição química de arábica e conillon. II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil – Setembro de 2001.
- Ferrándiz, C.; Pelaz, S.; Yanofsky, M. F. (1999) Control of carpel and fruit development in arabidopsis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 321-354.

- Finkelstein, R. R.; Gampala, S. S. L.; Rock, C. D. (2002) Abscisic acid signaling in seed and seedling. *Plant Cell*, Supplement 2002, S15-S45.
- Flemetakis, E.; Kavroulakis, N.; Quaedvlieg, N. E. M.; Spaink, H.; Dimou, M.; Roussis, A.; Katinakis, P. (2000) *Lotus japonicus* contains two distinct ENOD40 genes that are expressed in symbiotic, nonsymbiotic, and embryonic tissues. *MPMI* 13(9), 987-994.
- Fliegmann, J.; Ebel, J. (1999) Ubiquitin carrier protein (UBC4) from soybean (*Glycine max*) (PRG99-157). *Plant Physiol.* 121, 686.
- Fukao, T.; Ida, S.; Rumpho, M. E.; Kennedy, R. A.; Yamasue, Y. (2003) Differential gene expression of the  $\alpha$ -chain of mitochondrial H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase between dormant and non-dormant seeds of paddy *Echinochloa* weeds. *Weed Biol. Man.* 3, 15-20.
- Genschik, P.; Durr, A.; Fleck, J. (1994) Differential expression of several E2-type ubiquitin carrier protein genes at different developmental stages in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana sylvestris*. *Mol. Gen. Genet.* 244, 548-556.
- Gil, B.; Pastoriza, E.; Ballester, A.; Sánchez, C. (2003) Isolation and characterization of cDNA from *Quercus robur* differentially expressed in juvenile-like and mature shoots. *Tree Physiol.* 23, 633-640.
- Gill, R. T.; Valdes, J. J.; Bentley, W. E. (1999) Reverse transcription-PCR differential display analysis of *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12), 5386-5393.
- Giovannoni, J. (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 725-749.
- Girke, T.; Tood, J.; Ruuska, S.; White, J.; Benning, C.; Ohlrogge, J. (2000) Microarray analysis of developing arabidopsis seeds. *Plant Physiol.* 124, 1570-1581.
- Goldberg, R. B.; Baker, S. J.; Perez-Grau, L. (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56, 149-160.

- Graner, E. A.; Godoy-Junior., C. (1967) Histórico. In: Manual do cafeicultor. Graner, E. A.; Godoy-Junior., C. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, pp. 8-16.
- Haizel, T.; Merkle, T.; Turck, F.; Nagy, F. (1995) Characterization of membrane-bound small GTP-binding proteins from *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 108, 59-67.
- Haizel, T.; Merkle, T.; Pay, A.; Fejes, E.; Nagy, F. (1997) Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in *Arabidopsis*. *Plant J.* 11(1), 93-103.
- Hellmann, H.; Estelle, M. (2002) Plant development: regulation by protein degradation. *Science* 297, 793-797.
- Hershko, A.; Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
- Hoffman, N. E.; Ko, K.; Milkowski, D.; Pichersky, E. (1991) Isolation and characterization of tomato cDNA and genomic clones encoding the ubiquitin gene *ubi3*. *Plant. Mol. Biol.* 17, 1189-1201.
- Hong, S.; Kim, I.; Yang, D. C.; Chung, W. (2002) Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *J. Exp. Bot.* 53(378), 2271-2272.
- Joly, A. B.; Hemógenes, F. L. F. (1979) As principais culturas brasileiras. Botânica econômica. Editora da USP, SP.
- Journet, E.; El-Gachtouli, N.; Vernoud, V.; de Billy, F.; Pichon, M.; Dedieu, A.; Arnould, C.; Morandi, D.; Barker, D. G.; Gianinazzi-Pearson, V. (2001) *Medicago truncatula* *ENOD11*: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *MPMI* 14(6), 737-748.
- Kakhovskja, I.; Rudacova, A.; Manteuffel, R. (2003) Legumin- and vicilin-like proteins from spores of the fern *Matteuccia struthiopteris*. *J. Plant Physiol.* 160, 583-588.
- Kim, Y. S.; Park, J. Y.; Kim, K. S.; Ko, M. K.; Cheong, S. J.; Oh, B. (2002) A thaumatin-like gene in nonclimateric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Mol. Biol.* 49, 125-135.

- Kumar, A.; Ellis, B. E. (2003) A family of polyketide synthase genes expressed in ripening *Rubus* fruits. *Phytochemistry*, 62, 513-526.
- Kuster, H.; Quandt, H.; Broer, I.; Perlick, A. M.; Pühler, A. (1995) The promoter of the *Vicia faba* L. VfENOD-GRP3 gene encoding a glycine-rich early nodulin mediates a predominant gene expression in the interzone II-III region of transgenic *Vicia hirsuta* root nodules. *Plant Mol. Biol.* 29, 759-772.
- Lashermes, P.; Combes, M.-C.; Robert, J.; Trouslot, P.; D'Hont, A.; Anthony, F.; Charrier, A. (1999) Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Gen. Genet.* 261, 259-266.
- Laskowski, M. J.; Dreher, K. A.; Gehring, M. A.; Abel, S.; Gensler, A. L.; Sussex, I. M. (2002) *FQRI*, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinine reductase. *Plant Physiol.* 128, 578-590.
- Liang, P.; Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNAs by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257(5072), 967-971.
- Lim, H. W.; Lee, J. E.; Shin, S. J.; Lee, Y. E.; Oh, S. H.; Park, J. Y.; Seong, J. K.; Park, J. S. (2002) Identification of differentially expressed mRNA during pancreas regeneration of rat by mRNA differential display. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 299, 806-812.
- Marín-Rodríguez, M. C.; Smith, D. L.; Manning, K.; Orchard, J.; Seymour, G. B. (2003) Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Mol. Biol.* 51, 851-857.
- Marraccini, P.; Deshayes, A.; Pétiard, V.; Rogers, W. (1999) Molecular cloning of complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37(4), 273-282.
- Marraccini, P.; Allard, C.; Andre, M. L.; Courjault, C.; Gaborit, C.; Lacoste, N.; Meunier, A.; Michaux, S.; Petit, V.; Priyono, P.; Rogers, J. W.; Deshayes, A. (2001) Update on Coffee Biochemical Compounds, Protein and Gene Expression during Bean Maturation and in other Tissues. 19<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee – ASIC, Trieste, 14-18 May 2001.

- Mazzafera, P.; Robinson, S. P. (2000) Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55, 285-296.
- Mbeguie-A-Mbeguie, D.; Gomez, R.; Fils-Lycaon, B. (1997) Molecular cloning and nucleotide sequence of a Rab7 small GTP-binding protein from apricot fruit. Gene expression during fruit ripening (PGR97-117). *Plant Physiol.* 114, 1569.
- Mizuno, K.; Kato, M.; Irino, F.; Yoneyama, N.; Fujimura, T.; Ashihara, H. (2003) The first step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthase in coffee (*Coffea Arabica* L.) *FEBS Letters* 547, 56-60.
- Moore, S.; Vrebalov, J.; Payton, P.; Giovannoni, J. (2002) Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *J. Exp. Bot.* 377(53), 2023-2030.
- Montavon, P.; Mauron, A.; Duruz, E. (2003) Changes in green coffee protein profiles during roasting. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2335-2343.
- Morcillo, F.; Hartmann, C.; Duval, Y.; tregear, J. W. (2001) Regulation of 7S globulin gene expression in zygotic and somatic embryos of oil palm. *Physiol. Plant.* 112, 233-243.
- Newton, C. H.; Flinn, B. S.; Sutton, B. C. S. (1992) Vicilin-like seed storage proteins in the gymnosperm interior spruce (*Picea glauca/engelmannii*). *Plant Mol. Biol.* 20, 315-322.
- Nucio, M. L.; Thomas, T. L. (1999) ATS1 and ATS2: two novel embryo-specific genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 39, 1153-1163.
- Parcy, F.; Valon, C.; Kohara, A.; Misera, S.; Geraudat, J. (1997) The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3, FUSCA 3, and LEAFY COTYLEDON 1 loci act in concert to control multiple aspects of arabidopsis seed development. *Plant Cell* 9(8), 1265-1277.
- Pernollet, J. -C.; Mossé, J. (1983) Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In: *Seed Proteins*. Daussant, J.; Mossé, J.; Vaughan, J. Academic Press, London, pp.155-192.

- Pimenta, C. J.; Vilela, E. R. (2001) Compostos fenólicos e qualidade da bebida. II Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil – Setembro de 2001.
- Pramanik, S. K.; Bewley, D. (1993) A ubiquitin carrier protein cDNA from developing alfafa embryos. *Plant Physiol.* 102, 1049-1050.
- Rena, A. B.; Maestri, M. (1986) Fisiologia do cafeeiro. In: *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam sua produtividade*. Rena, A. B.; Malavolta, E.; Rocha, M.; Yamada, T. Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e Fósforo. Piracicaba, pp. 13-85.
- Rogers, W. J.; Michaux, S.; Bastin, M.; Bucheli, P. (1999a) Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Science* 149, 115-123.
- Rogers, W. J.; Bézard, G.; Deshayes, A.; Meyer, I.; Pétiard, V.; Marraccini, P. (1999b) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 37(4), 261-272.
- Rojas-Herrera, R.; Quiroz-Figueroa, F.; Monforte-González, M.; Sánchez-Teyer, L.; Loyola-Vargas, V. M. (2002) Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L., revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotech.* 21, 43-50.
- Rubinelli, P.; Siripornadulsil, S.; Gao-Rubinelli, F.; Sayre, R. T. (2002) Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for H43 protein function in iron assimilation. *Planta* 215, 1-13.
- Saalbach, G.; Christov, V. (1994) Sequence of a plant cDNA from *Vicia faba* encoding a novel Ran-related GTP-binding protein. *Plant Mol. Biol.* 24, 969-972.
- Sablowski, R. W. M.; Meyerowitz, E. M. (1998) A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* 92, 93-103.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. E. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.



- Sano, T.; Nagata, T. (2002) The possible involvement of phosphate-induced transcription factor encoded by *Phi-2* gene from tobacco in ABA-signaling pathways. *Plant Cell Physiol.* 43(1), 12-20.
- Sétif, P. (2001) Ferredoxin ad flavodoxin reduction by photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1507, 161-179.
- Shewry, P. R.; Napier, J. A.; Tatham, A. S. (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* 7, 945-956.
- Shutov, A. D.; Braun, H.; Chesnokov, Y. V.; Bäumlein H. (1998) A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores: evolutionary pathway of seed storage globulins. *Eur. J. Biochem.* 252, 79-89.
- Sibénil, Y.; Doireau, P.; Gantet, P. (2001) Plant bZIP G-box binding factors: modular structure and activation mechanisms. *Eur. J. Biochem.* 268, 5655-5666.
- Sibénil, Y.; Thiersault, M.; Nepumoceno, G. Doireau, P.; Gantel, P. (2002) Cloning of a cDNA encoding na E2 ubiquitin-conjugating enzyme from *Catharanthus roseus*: expression analysis in plant organs and in response to hormones in cell suspensions. *J. Exp. Bot.* 53(366), 149-150.
- Spencer, M. E.; Hodge, R. (1992) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*. *Planta* 186, 567-576.
- Stein, J.; Liang, P. (2002) Differential display technology: a general guide. *Cell Mol. Life Sci.* 59(8), 1234-1240.
- Sterk, P.; Booij, H.; Schellekens, G. A.; van Kammem, A.; de Vries, S. C. (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 907-921.
- Stone, S. L.; Kwong, L.W.; Yee, K. M.; Pelletier, J.; Lepiniec, L.; Fischer, R. L., Goldberg, R. B.; Harada, J. J. (2001) *LEAFY COTTLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98(20), 11806-11811.

- Takemoto, D.; Hayashi, M.; Doke, N.; Nishimura, M.; Kawakita, K. (2000) Isolation of the gene for EILP, an elicitor-inducible LRR receptor-like protein, from tobacco by differential display. *Plant Cell Physiol.* 41(4), 458-464.
- Tamura, T.; Hara, K.; Yamaguchi, Y.; Koizumi, N.; Sano, H. (2003) Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.* 131, 545-462.
- Terryn, N.; Van Montagu, M.; Inzé, D. (1993) GTP-binding proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* 22, 143-152.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Thomas, T. L. (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination. An overview. *Plant cell* 5, 1401-1410.
- Thomaziello, R. A.; Fazuoli, L. C.; Pezzopane, J. R. M.; Fahl, J. I.; Carelli, M. L. C. (2000) Café Arábica: Cultura e Técnicas de Produção. Boletim Técnico 187. Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas, SP.
- Xu, N.; Johns, B.; Pullman, G.; Cairney, J. (1997) Rapid and reliable differential display from minute amounts of tissue: mass cloning and characterization of differentially expressed genes from Loblolly pine embryos. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15, 377-391.
- Wang, W.; De-Dios-Alché, J.; Castro, J. Rodriguez-Garcia, M. (2001) Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in *olea europaea*. *Int. J. Dev. Biol.* 45(S1), S63-S64.
- White, J. A.; Todd, J.; Newman, T.; Focks, N.; Girke, T.; Ilárduya, O. M.; Jaworski, J. G.; Ohlrogge, J. B.; Benning, C. (2000) A new set of arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol.* 124, 1582-1594.
- Wilkinson, J. Q.; Lanahan, M. B.; Conner, T. W.; Klee, H. J. (1995) Identification of mRNA with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Mol. Biol.* 27, 1097-1108.

- Wobus, U.; Weber, H. (1999) Seed maturation: genetic programmes and control signals. *Curr. Opin. in Plant Biology* 2, 33-38.
- Yan, N.; Doelling, J.; Viestra, R. D. (1997) A new family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2S) Atubc15/16/17/18 in *Arabidopsis thaliana* (PGR97-174). *Plant Physiol.* 115, 1729.
- Yang, Z. (2002) Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell, Supplement* 2002, S375-S388.
- Yasuda, H.; Nakajima, M.; Ito, T.; Ohwada, T.; Masuda, H. (2001) Partial characterization of genes whose transcripts accumulate preferentially in cell clusters at the earliest stage of carrot somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 45, 705-712.
- Zeppa, S.; Guidi, C.; Zambonelli, A.; Potenza, L.; Vallorani, L.; Pierleoni, R.; Sacconi, C.; Stocchi, V. (2002) Identification of putative genes involved in the development of *Tuber borchii* fruit body by mRNA differential display in agarose gel. *Curr. Genet.* 42, 161-168.