



**DISSERTAÇÃO**

**EXPRESSÃO DE GENES DA BIOSÍNTESE  
DE CAFEÍNA EM FRUTOS E  
ENDOSPERMAS DE *Coffea arabica*: SEM  
CAFEÍNA**

**MICHELLE DE PAULA ABREU DE OLIVEIRA**

**Campinas, SP  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**INSTITUTO AGRONÔMICO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA  
TROPICAL E SUBTROPICAL**

**EXPRESSÃO DE GENES DA BIOSÍNTESE DE  
CAFEÍNA EM FRUTOS E ENDOSPERMAS DE *Coffea*  
*arabica*: SEM CAFEÍNA**

**MICHELLE DE PAULA ABREU DE OLIVEIRA**

**Orientador: Oliveiro Guerreiro Filho  
Co-orientadora: Mirian Peres Maluf**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Melhoramento Genético Vegetal.

Campinas, SP  
Maio 2007

Aos meus pais  
Sonia e Vítorio,  
**DEDICO**

Ao Francisco, cujo apoio, carinho,  
amor, dedicação e companheirismo  
foram indispensáveis,

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus, pela força que me deu para que eu fosse capaz de conseguir chegar onde cheguei;
- Ao Instituto Agronômico, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado;
- Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de estudo;
- Ao orientado Dr. Oliveiro Guerreiro Filho e a co-orientadora Dra. Mirian Perez Maluf, pela paciência e orientação profissional dedicados durante o curso;
- Aos professores da área de concentração Melhoramento Genético Vegetal;
- Aos pesquisadores e funcionários do Centro de Café “Alcides Carvalho”;
- As meninas do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Café “Alcides Carvalho”, pelo incentivo e amizade;
- As amigas Paula, Fernanda e Márcia pelo incentivo e pela amizade dedicada nesse período do curso;
- A minha amiga, doutoranda Cristiana de Gaspari Pezzopane, pela amizade e ajuda durante o curso;
- Aos meus pais, Sonia e Vitório, minhas irmãs, Alessandra e Bianca, meu sobrinho, Matheus e meu cunhado Marcelo. Agradeço pelo incentivo e força que sempre me deram para chegar até o final do curso;
- Ao meu namorado, Francisco, pelo amor e apoio que sempre me dedicou e foi indispensável na minha caminhada até aqui;
- Aos amigos que fiz durante esse período em Campinas, foram essenciais para o meu crescimento e amadurecimento tanto profissional, quanto sentimental;
- A todos os meus amigos e parentes, que mesmo distante sempre torceram por mim e vibram comigo nessa nova etapa da minha vida.

## **ESCLARECIMENTOS**

As sequências genômicas analisadas nesta dissertação foram obtidas no Banco de ESTs do Genoma Café. O acesso a este Banco de Dados é restrito e condicionado à autorização pelo Comitê Gestor do Genoma Café, cujos membros são formados pela FAPESP, CBO&D do Café e EMBRAPA. Os dados são confidenciais e não podem ser divulgados publicamente durante o período previsto de confiabilidade. Portanto, as sequências utilizadas não serão apresentadas neste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                                                             |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE DE TABELAS.....                                                                                      | vii  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                                                      | viii |
| RESUMO.....                                                                                                 | xi   |
| ABSTRACT.....                                                                                               | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                                                           | 01   |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                | 05   |
| 2.1. A Cultura do café no Brasil.....                                                                       | 05   |
| 2.2 Classificação Botânica.....                                                                             | 06   |
| 2.3 Cultivares de <i>C. arabica</i> .....                                                                   | 07   |
| 2.4 Cafeína.....                                                                                            | 08   |
| 2.5 Café Descafeinado.....                                                                                  | 10   |
| 2.6 Café Naturalmente Descafeinado.....                                                                     | 12   |
| 2.7 Genes Envolvidos no Desenvolvimento de Frutos.....                                                      | 13   |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                   | 15   |
| 3.1 Local de Experimentação.....                                                                            | 15   |
| 3.2 Material Vegetal.....                                                                                   | 15   |
| 3.3 <i>Data-mining</i> e Identificação de Genes da Via Biossintética da Cafeína.....                        | 16   |
| 3.4 Genes Envolvidos nas Fases de Desenvolvimento dos Frutos.....                                           | 17   |
| 3.5 Extração de Ácidos Nucléicos.....                                                                       | 18   |
| 3.6 Amplificação de Genes por PCR.....                                                                      | 19   |
| 3.7 Análise de Expressão.....                                                                               | 20   |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                               | 21   |
| 4.1 <i>Data-mining</i> .....                                                                                | 21   |
| 4.2 Amplificações de Regiões Genômicas dos Genes das Metiltransferases.....                                 | 21   |
| 4.3 Expressão de Genes da Via Biossintética de Cafeína.....                                                 | 22   |
| 4.3.1 Metilxantosina sintase.....                                                                           | 23   |
| 4.3.2 Teobromina sintase.....                                                                               | 25   |
| 4.3.3 Cafeína sintase.....                                                                                  | 28   |
| 4.4 Expressão dos Genes da Via Biossintética de Cafeína em <i>C. canephora</i> e <i>C. eugenoides</i> ..... | 34   |
| 4.5 Expressão dos Genes de Desenvolvimento e Maturação do Fruto.....                                        | 38   |
| 5 CONCLUSÕES.....                                                                                           | 49   |

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |
|-----------------------------------|----|

## ÍNDICE DE TABELAS

|            |                                                                                                                        |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - | Progênies das espécies de <i>C. arabica</i> , <i>C. canephora</i> e <i>C. eugenioides</i> utilizadas neste estudo..... | 16 |
| Tabela 2 - | Sequência de oligos, a região amplificada e o tamanho esperado para o produto de amplificação dos genes.....           | 17 |
| Tabela 3 - | Identificação de transcritos correspondentes aos genes envolvidos na via biossintética da cafeína.....                 | 21 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 -  | Esquema das vias de síntese (A) e de degradação (B) da cafeína..                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 09 |
| Figura 2 -  | Adaptação da escala fenológica proposta por Pezzopane et al., 2003. 1- chumbinho; 2- expansão; 3- verde; 4- verde-cana; 5- cereja.....                                                                                                                                                                                                                            | 15 |
| Figura 3 -  | Padrão de amplificação de fragmentos correspondentes aos genes da Metilxantosina (A), Teobromina sintase (B), Cafeína sintase (C). Plantas da progênie AC (2-14) e Mundo Novo (1). PM- Peso Molecular de 250 pb.....                                                                                                                                              | 22 |
| Figura 4 -  | Sequências do cDNA da metilxantosina sintase. Em vermelho estão representadas as sequências dos oligos “Forward” e “Reverse”.....                                                                                                                                                                                                                                 | 23 |
| Figura 5 -  | Amplificação de transcritos de metilxantosina, a partir de RT-PCR, na cultivar Mundo Novo, nas plantas AC1, AC2 e AC3. OV- ovário, CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                                                                                                                        | 25 |
| Figura 6 -  | Sequências do cDNA da teobromina sintase. Em vermelho estão representadas as sequências dos oligos “Forward” e “Reverse”.....                                                                                                                                                                                                                                     | 26 |
| Figura 7 -  | Amplificação de transcritos de teobromina, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                                                                                                                                                                | 27 |
| Figura 8 -  | Sequências do cDNA da cafeína sintase. Em vermelho estão representadas as sequências dos oligos “Forward” e “Reverse” abrangendo a maior parte do transcrito. Em amarelo estão representadas as sequências de oligos que apresentaram um padrão diferencial da expressão do gene CCS1. Em azul estão as sequências fragmentadas na região 5` do gene da CCS1..... | 29 |
| Figura 9 -  | Amplificação de transcritos de Cafeína sintase, a partir de RT-PCR na cultivar MN, utilizando os pares de oligos F2, F3, F4, F5 e F6. OV- ovário, CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                                                                                                         | 30 |
| Figura 10 - | Amplificação de transcritos de Cafeína sintase, a partir de RT-PCR na planta AC1, utilizando os pares de oligos F2, F3, F4, F5 e F6. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                                                                                                                      | 31 |
| Figura 11 - | RT-PCR da planta AC2. Combinações dos pares de oligos F2, F3, F4, F5 e F6. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC-                                                                                                                                                                                                                                            |    |

|             |                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|             | verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo ubíquo.....                                                                                                                                                            | 32 |
| Figura 12 - | RT-PCR da planta AC3. Combinações dos pares de oligos F2, F3, F4, F5 e F6. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                                            | 33 |
| Figura 13 - | Amplificação de transcritos do gene da metilxantosina sintase em <i>C. eugenoides</i> , a partir de RT-PCR., nas fases expansão (EX) e cereja (CE). Ac- actina usada como controle.....                                       | 35 |
| Figura 14 - | Amplificação de transcritos de teobromina sintase em <i>C. eugenoides</i> , a partir de RT-PCR, nas fases expansão (EX) e cereja (CE). Ac- actina usada como controle.....                                                    | 35 |
| Figura 15 - | Amplificação de transcritos de Cafeína sintase em <i>C. eugenoides</i> utilizando as combinações dos pares de oligos F2, F3, F4, F5, F6, nas fases expansão (EX) e cereja (CE) Ac- actina usada como controle.....            | 36 |
| Figura 16 - | Amplificação de transcritos de metilxantosina sintase em <i>C. canephora</i> , a partir de RT-PCR. VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                                                 | 36 |
| Figura 17 - | Amplificação de transcritos de teobromina sintase em <i>C. canephora</i> , a partir de RT-PCR. VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                                                     | 37 |
| Figura 18 - | Amplificação de transcritos de cafeína sintase em <i>C. canephora</i> utilizando as combinações dos oligos F2, F3, F4, F5, F6, a partir de RT-PCR. VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo..... | 37 |
| Figura 19 - | Avaliação de transcritos de <i>ACC oxidase</i> , a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                      | 40 |
| Figura 20 - | Avaliação de transcritos de <i>never ripe</i> , a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                       | 41 |
| Figura 21 - | Avaliação de transcritos de <i>late maturation accumulated</i> a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....        | 42 |
| Figura 22 - | Avaliação de transcritos de <i><math>\alpha</math>-galactosidase</i> , a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão,                                                                           |    |

|             |                                                                                                                                                                                                                                |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|             | VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                                                                                                                                                     | 43 |
| Figura 23 - | Avaliação de transcritos de <i>endo-<math>\beta</math>-mannanase</i> , a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo..... | 44 |
| Tabela 24 - | Avaliação de transcritos de fenilalanina-amônia-liase, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....                 | 46 |
| Tabela 25 - | Avaliação de transcritos de <i>caffeoyl-CoA metiltransferase</i> , a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.....     | 47 |

OLIVEIRA, Michelle de Paula Abreu. **Expressão de genes da biossíntese de cafeína em frutos e endospermas de *Coffea arabica*: sem cafeína.** Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Pós-Graduação-IAC.

## RESUMO

Um dos aspectos mais relevantes para atender as demandas atuais do mercado de café é a qualidade final da bebida. Há uma preocupação crescente de todos os segmentos da cadeia produtiva do café que estão relacionados com um aumento da qualidade de café. Estudos envolvendo métodos de manejo da cultura, tratamentos pós-colheita, caracterização físico-química de frutos e sementes, desenvolvimento de cultivares com características químicas diferenciadas, entre outros, vêm sendo desenvolvidos com este propósito. Esta dissertação teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de cultivares naturalmente descafeinadas através da caracterização dos genes da via biossintética de cafeína em germoplasma que apresente variações no acúmulo da substância. Plantas mutantes de *Coffea arabica*, AC1, AC2 e AC3, com teores nulos de cafeína em frutos foram avaliados. Para tal foram amplificados transcritos correspondentes aos genes codificadores das enzimas da via biossintética de cafeína em folhas e frutos, através da metodologia de RT-PCR. Oligonucleotídeos específicos para cada gene foram selecionados a partir de análises *in silico* realizadas no Banco de Dados do Genoma Café. As análises revelaram que não há diferenças no padrão de expressão dos genes correspondentes à 7- metilxantosina sintase e à teobromina sintase durante o desenvolvimento dos frutos. No entanto, plantas AC apresentaram polimorfismos na expressão de um transcrito alternativo do gene cafeína sintase. Além disso, transcritos do gene da cafeína sintase apresentaram uma possível deleção na região codificadora inicial, alterando a possível sequência de aminoácidos da proteína. Estas análises sugerem que a proteína cafeína sintase pode estar alterada e não-funcional, resultando na ausência de cafeína nos frutos de plantas AC. Além disso, análises da expressão de genes de desenvolvimento e maturação dos frutos foram realizadas, com o objetivo de verificar se as vias de sinalização destes

resultados são fundamentais para o estabelecimento de estratégias de melhoramento visando a transferência desta característica para cultivares de café.

**Palavras-Chave:** *N*- metiltransferase, Cafeína, RT-PCR

OLIVEIRA, Michelle de Paula Abreu. **Caffeine biosynthesis in *Coffea arabica*: molecular and genetics aspects of accumulation in coffee tissues.** 2007. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Pós-Graduação- IAC.

## ABSTRACT

One of the most important aspects of coffee culture today is the cup quality and all segments of coffee production network are concentrating efforts to improve this trait. In order to achieve this several aspects such as culture management, post-harvest treatment, determination of fruit and seed chemical composition, development of new cultivars bearing specific biochemical characteristics are under investigation. The lack of precise information regarding chemical aspects of fruits and seeds directly associated with higher cup-quality represents a major limitation for the development of new coffee cultivars. Innumerable compounds are present in coffee seeds, which upon toasting and grounding can interact and influence final organoleptic aspects of coffee beverage. Biosynthesis and degradation of those substances are not completely understood. Therefore, in this study we propose to evaluate the biosynthesis of caffeine, one of the most important substances of coffee fruits, through the characterization of genes involved in this pathway, in germplasm exhibiting variable levels of this substance. Natural caffeine-free coffee plants are evaluated regarding expression of genes encoding major caffeine biosynthetic enzymes. Gene-specific transcripts were amplified from fruits under development of these mutants. Analysis demonstrated that there are no significant differences on the expression pattern of genes encoding 7-methylxanthosine synthase and theobromine synthase enzymes. However, caffeine-free mutants exhibited polymorphism in the expression of an alternative processed caffeine synthase transcript. Also, caffeine synthase transcripts of AC plants exhibited a sequence deletion on the initial coding region, changing the putative final amino acid composition. Therefore, the caffeine synthase enzyme could be non-functional, resulting in the absence of caffeine in fruits of AC mutant plants. In other analysis, genes expressed during development and fruit maturation were also evaluated regarding transcript accumulation, to verify if caffeine-free mutants were impaired in signaling pathways. The results demonstrated that transcript accumulation of those genes is normal in the absence of caffeine. Concluding, through this study it can be suggested that mutation in AC plants results in an altered caffeine synthase protein that has no effect on regular fruit development.

These results are important for the establishment of breeding strategies aiming to transfer this gene to commercial cultivars.

**Keywords:** *N*-methyl-transferases, Caffeine, RT-PCR

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma das principais fontes de divisas para diversos países das regiões tropicais do mundo. Mais da metade da produção mundial tem origem na Colômbia, Indonésia, Vietnã e no Brasil, o maior produtor com o equivalente a 30% do total global, com produção que equivale a cerca de 25% do volume internacional.

O café foi introduzido no Brasil, em 1727, no Estado do Pará. A cultura se expandiu em direção aos Estados do Sudeste onde encontrou condições edafoclimáticas excepcionais para o cultivo, vindo a se tornar o eixo econômico e político do País durante quase todo século XIX.

Com o desenvolvimento acelerado e a diversificação das exportações brasileiras o café foi perdendo importância em termos de participação relativa na balança comercial, mas representa ainda hoje cerca de 2,5% do produto interno bruto nacional. Na safra 2005/2006, o Brasil produziu 32.944 mil sacas, tendo produtividade média de 14,86 sacas/ha. A safra 2006/2007 é estimada em 41 milhões de sacas de café beneficiado (CONAB, 2007).

Além de sua importância econômica, a cafeicultura tem destacado papel social nos países produtores, uma vez que gera grande número de empregos nos vários segmentos da cadeia produtiva e contribui para o desenvolvimento do meio rural, desacelerando, mesmo que modestamente, o crescimento das cidades.

O café pertence ao gênero *Coffea* que abriga cerca de 80 espécies. Destas, apenas duas têm importância econômica: *C. arabica* e *C. canephora*, que respondem por cerca de 70% e 30% da produção mundial e produzem os cafés conhecidos respectivamente, como arábica e robusta.

*C. arabica* é alotetrapóide com  $2n = 4x = 44$  cromossomos. A espécie é autógama com cerca de apenas 10% de polinização cruzada, sendo originária em regiões de altitude, entre 1300 a 2000m, na Etiópia, no Nordeste do Continente Africano. Produz café de qualidade muito apreciada, sendo especialmente utilizado como matéria-prima de cafés expressos e percolados.

*C. canephora* é uma espécie diplóide com  $2n = 2x = 22$  cromossomos, alógama com sistema de incompatibilidade do tipo gametofítico (CONAGIN & MENDES, 1961). O centro de origem e diversificação da espécie é amplo estendendo-se da Guiné ao Congo; da costa oeste à região central do Continente Africano, predominando em regiões de baixa altitude, entre 0 a 1300m e precipitação elevada. A bebida é de

qualidade inferior ao arábica, sendo os grãos utilizados no preparo de cafés percolados, em blends com café arábica, mas predominantemente utilizados como matéria prima do café solúvel.

As duas espécies são cultivadas no Brasil. *C. canephora* concentra-se essencialmente, no Estado do Espírito Santo e *C. arabica* nos Estados do Paraná, São Paulo, Bahia e Minas Gerais, Estado que produz cerca de 65% do café arábica comercializado pelo País.

*C. arabica* é arbustiva, tem apenas uma haste ortotrópica, é suscetível as principais pragas e doenças da cultura e tem custo de produção superior às cultivares de *C. canephora*, estas mais vigorosas e tolerantes às pragas, com ramos ortotrópicos em maior número, mais produtivas e com menor custo de produção.

Do ponto de vista químico, as espécies também apresentam importantes diferenças, especialmente em relação ao teor de sólidos solúveis, maior em *C. canephora* e à concentração de cafeína nos grãos. *C. arabica* têm cerca de 1,1% e *C. canephora* têm o dobro, sendo que algumas seleções podem ter até 4% do alcalóide (CARVALHO et al., 1983).

As propriedades estimulantes da bebida que tradicionalmente é consumida em infusões, impulsionam seu consumo, sendo os países de clima frio das nações nórdicas Noruega, Finlândia, Suécia e Dinamarca, os maiores consumidores *per capita* de café. No entanto, apenas um quinto dos cerca de seis bilhões de habitantes do planeta são consumidores de café, sendo os Estados Unidos o maior consumidor mundial em volume. O Brasil é o segundo nesta lista e único país produtor a se alinhar entre os grandes consumidores da bebida.

Estratégias de valorização do café visando aumento de consumo interno e também das exportações vêm sendo adotadas pelo Brasil. Avanços apreciáveis têm sido conquistados a partir de substancial melhoria na qualidade do café brasileiro. Inúmeras pesquisas envolvendo métodos de manejo da cultura, tratamentos pós-colheita, caracterização físico-química de frutos e sementes, desenvolvimento de cultivares com características químicas diferenciadas, entre outros, vêm sendo desenvolvidas com este propósito.

Tecnologias de produção de cafés especiais do tipo orgânico, sombreado, mercado justo, aromatizado e descafeinados, entre outros, também vêm sendo aperfeiçoadas com o objetivo de valorizar o produto e o mercado do café.

Pode-se dizer que, em termos de qualidade, a superioridade genética do grão, ou seja, a composição do endosperma é a principal característica de um cultivar. Produtos de baixa qualidade não se prestam, por mais favoráveis que sejam as condições ambientais, à produção de bebidas de boa qualidade.

Do ponto de vista químico, alguns compostos, com destaque especial para a cafeína, têm merecido especial atenção por diferentes elos da cadeia produtiva. O alcalóide é bastante valorizado pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas. O mercado também se segmenta em relação a preferência e consome desde cafés com níveis bastante elevados de cafeína até cafés descafeinados, obtidos a partir de métodos químicos ou físicos de extração.

O estabelecimento de métodos apropriados para descafeinação e, posteriormente o desenvolvimento do café solúvel possibilitaram a produção do solúvel descafeinado (MAZZAFERA & CARVALHO, 1991). O consumo desse tipo de café nos Estados Unidos é atualmente quase 20% do total consumido no país. Já no Brasil essa porcentagem é próxima a 1% em relação ao total consumido (DESCOBERTA..., 2003).

Uma das razões do baixo consumo é a alteração de características sensoriais da bebida provocada pelo processo industrial de extração da cafeína do endosperma. Além disso, quando realizado com solventes, a descafeinação deixa resíduos químicos prejudiciais à saúde humana.

Neste contexto, a seleção de cafeeiros naturalmente descafeinados se constitui em uma das áreas da moderna pesquisa cafeeira. Investigações nesse sentido vêm sendo realizadas há várias décadas. Muitas espécies do gênero *Coffea* nativas de Madagascar têm o endosperma naturalmente desprovido de cafeína (CHARRIER, 1978; RAKOTOMALALA, 1992). No entanto, a transferência dessa característica para cultivares de *C. arabica* mediante utilização de métodos tradicionais de hibridação, não foi ainda possível em função de fortes barreiras genéticas entre as espécies envolvidas (CHARRIER, 1978).

Novo impulso a essas pesquisas foi dado com a descoberta por SILVAROLLA et. al., (2004), de três plantas de *C. arabica* com ausência quase completa de cafeína no endosperma. Pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Coffea* do Instituto Agrônômico (IAC), em Campinas, essas plantas foram denominadas AC1, AC2 e AC3 e vêm sendo intensamente utilizadas no programa de melhoramento genético do cafeeiro do IAC, visando o desenvolvimento de cultivares naturalmente descafeinadas.

É nesse contexto que se enquadra esta dissertação que teve como objetivo caracterizar os genes da via biossintética de cafeína nos mutantes AC1, AC2 e AC3. Estudos de natureza básica ou fundamental relacionados à fisiologia, bioquímica e biologia molecular das vias de síntese e degradação da cafeína serão desenvolvidos para dar suporte ao melhoramento genético.

O desenvolvimento de marcadores moleculares a partir de locos associados com características agronômicas depende, porém da disponibilidade de populações divergentes e de material genético bem caracterizado para comparação, bem como de um banco de seqüências de genes. Tais condições encontram-se reunidas no programa de melhoramento do café do IAC que continuamente avalia milhares de integrantes do banco ativo de germoplasma e tem acesso ao banco de ESTs de café desenvolvido pelo Programa AEG/Fapesp em parceria com a Embrapa (Genoma Café), que reúne mais de 200.000 seqüências.

Assim, neste trabalho pretendeu-se investigar geneticamente plantas com diferentes teores de cafeína, associando informações de seqüências de genes envolvidos em processos metabólicos que controlam a síntese da cafeína em café.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Cultura do Café no Brasil

O café arábica foi introduzido no Brasil em 1727, por Francisco Mello Palheta trazido de sua visita à Guiana Francesa. As primeiras sementes e mudas foram plantadas em Belém (PA) e anos mais tarde no Estado do Maranhão. A partir de 1760 deslocou-se pela Costa Atlântica do Nordeste brasileiro para o Rio de Janeiro, expandindo-se pela encosta da Serra do Mar e atingindo, em 1780, o Vale do Paraíba (CARVALHO, 1993).

A cultura se expandiu no Sudeste brasileiro, tornando-se a principal fonte de divisas do País, tendo também importância destacada na esfera política e social. Nas primeiras décadas do século passado o café chegou a representar mais de 60% das exportações brasileiras (TAUNAY, 1939). A partir de então, a participação relativa do café no volume total das exportações brasileiras passou a diminuir, representando atualmente cerca de 2,5% do produto interno bruto nacional.

No entanto, a commodity tem importante impacto no agronegócio mundial do café que envolve anualmente, recursos da ordem de 91 bilhões de dólares e tem a participação de cerca de 8% da população mundial, movimentando em torno de cento e quinze milhões de sacas (EMBRAPA, 2001). A cadeia produtiva do café brasileiro se insere nesse gigantesco mercado totalizando 30% da produção mundial e empregando sete milhões de pessoas.

Além das excelentes condições de solo e clima presentes em grande extensão do território brasileiro, um dos mais importantes fatores que contribuíram para o desenvolvimento da cafeicultura no país foi a seleção de cultivares altamente produtivas e adaptadas às diferentes regiões agroecológicas. As cultivares Mundo Novo e Catuaí, que ainda hoje constituem aproximadamente 80% do parque cafeeiro de café arábica, são 250% mais produtivas que a variedade botânica típica introduzida no Brasil no século XVIII (CARVALHO et al., 1981).

A posterior introdução da espécie *C. canephora* no Brasil e, mais recentemente, as seleções de *C. canephora* realizadas no Espírito Santo, deram novo impulso ao desenvolvimento da cafeicultura nacional. A espécie representa atualmente um quarto do café produzido, tendo a produtividade média no estado alcançado 22,5 sacas/ha (FERRÃO et al., 2004).

Hoje o parque cafeeiro nacional conta atualmente com cerca de 6 bilhões de cafeeiros, sendo 5,5 bilhões em produção e 500 mil em formação, ocupando no total 2,3 milhões de hectares. Na safra 2006/2007, o Brasil produziu 32 milhões de sacas de café arábica e 9,5 milhões de sacas de robusta.

Com 103 cultivares de *C. arabica* e 10 cultivares de *C. canephora* registradas no Ministério da Agricultura e do Abastecimento, o Brasil é o único país no mundo a cultivar as duas espécies em larga escala e com níveis elevados de produtividade, assegurando certa supremacia na produção e comercialização de café no mundo.

## 2.2 Classificação Botânica

O café pertence à família Rubiaceae, tribo *Coffeae* que é dividida em dois gêneros: *Coffea* L. e *Psilanthus* Hook.f, (BRIDSON & VERDCOURT, 1988), que se distinguem essencialmente pela estrutura floral. As espécies do gênero *Coffea* possuem anteras e estigmas proeminentes, ultrapassando a extensão do tubo da corola, assim como, flores com estilo longo. Espécies do gênero *Psilanthus* possuem anteras e estigmas inclusos no tubo da corola cercado um estilete curto (BRIDSON, 1987).

Cada um dos dois gêneros é dividido em sub-gêneros: o gênero *Coffea*, em *Coffea* e *Baracoffea* e o gênero *Psilanthus*, nos sub-gêneros *Psilanthus* e *Afrocoffea* (BRIDSON, 1987).

Segundo ANTHONY (1992), espécies do gênero *Coffea* subgênero *Coffea* são nativas das regiões ocidental, central oriental do Continente Africano, assim como de Madagáscar e o subgênero *Baracoffea* tem origem restrita à Madagáscar e à região oriental. Espécies do gênero *Psilanthus* subgênero *Psilanthus* são nativas das regiões ocidental e central do Continente Africano e subgênero *Afrocoffea* tem distribuição mais ampla, com espécies oriundas da África Ocidental, África Central, África Oriental, Ásia e Oceânia.

As espécies mais importantes pertencem ao subgênero *Coffea* que abriga mais de 80 espécies agrupadas por CHEVALIER (1942) em três seções denominadas *Mascarocoffea* que reúne espécies oriundas de Madagascar e Ilhas Mascarenhas; *Mozambicoffea*, que agrupa espécies do leste africano e *Eucoffea*, com espécies presentes nas regiões central e oeste do continente africano.

A seção *Eucoffea* reúne as mais importantes espécies de cafeeiros e foi dividida por CHEVALIER (1947) em quatro subseções: *Erythrocoffea* (*C. arabica*, *C. congensis*,

*C. canephora*, *C. eugenioides*); *Melanocoffea* (*C. stenophylla*); *Nanocoffea* (*C. heterocalyx*, *C. humilis*, *C. anthonyi*, *C. kapakata*) e *Pachycoffea* (*C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. klainii*). As duas primeiras subseções se diferenciam pela cor dos frutos maduros, respectivamente vermelha e preta e as duas outras subseções, se diferenciam pelo porte das plantas, respectivamente baixo ou arbustivo e arbóreo.

As espécies utilizadas para ilustrar cada uma das subseções da seção *Eucoffea* são aquelas presentes no Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea* do Instituto Agrônômico, em Campinas. Algumas delas como *C. racemosa*, *C. eugenioides* e *C. liberica* têm importância destacada em programas de melhoramento genético, como fontes de variabilidade genética para resistência às principais pragas e doenças da cultura, teor de cafeína, sólidos solúveis, óleo, tolerância a estresses abióticos, arquitetura das plantas, precocidade de maturação dos frutos, entre outras (CARVALHO & FAZUOLI, 1993).

Grande número de mutantes (CARVALHO et al., 1991), formas botânicas (KRUG et al., 1938) e introduções diversas, especialmente da Etiópia, centro de origem e diversificação da espécie (FAO, 1968) encontram-se representados no banco de germoplasma mantido em Campinas pelo Centro de Café 'Alcides Carvalho do IAC que se constitui talvez na mais representativa reserva gênica *ex situ* da espécie *C. arabica*.

### **2.3 Cultivares de *C. arabica***

A coleção de germoplasma do Instituto Agrônômico tem contribuído para o desenvolvimento de cultivares com características distintas, cultivadas em todas as regiões produtoras do Brasil. Cerca de 90% do parque cafeeiro nacional é representado por cultivares selecionadas pelo IAC.

O início do programa de melhoramento institucional, na década de 30, tinha por objetivo selecionar cultivares mais produtivas do que a variedade típica ou nacional extensamente cultivada.

Com este objetivo, foram selecionados as cultivares Bourbon Vermelho (MENDES et al., 1941) e Bourbon Amarelo (CARVALHO et al., 1957) e posteriormente, nos anos 40, a cultivar Mundo Novo (FAZUOLI, 1977), ainda hoje a mais plantada no Brasil e cerca de 250% mais produtiva que o material introduzido no Brasil.

Posteriormente, com o objetivo de reduzir os custos de produção da cultura, bastante elevados, especialmente em função das dificuldades de colheita de plantas de porte muito elevado foram selecionadas cultivares de porte baixo como Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo mediante a transferência do gene caturra para a cultivar Mundo Novo (CARVALHO & MONACO, 1972).

Ainda buscando proporcionar maior eficiência ao setor produtivo, genes de resistência à ferrugem, principal problema fitossanitário da cultura, foram transferidos à cultivar Mundo Novo, dando origem a novas cultivares de porte alto denominadas Icatu Vermelho, Icatu Amarelo e Icatu Precoce (FAZUOLI, 1993), assim como, cultivares resistentes e de porte baixo denominadas Obatã e Tupi (FAZUOLI et al., 2002).

Cultivares resistentes ao bicho-mineiro vem sendo desenvolvidas também com o objetivo de reduzir o custo de produção da cultura, mediante transferência de genes de resistência identificados por MEDINA-FILHO et al. (1997) em *C. racemosa*.

Além da redução de custos buscando tornar mais eficiente o sistema produtivo, pesquisas vem sendo realizadas visando à qualidade como forma de agregação de valor ao café produzido. É nesse escopo que se enquadram as pesquisas atualmente conduzidas pelo Centro de Café do Instituto Agronômico, visando o desenvolvimento de cultivares com baixos teores de cafeína.

## 2.4 Cafeína

A cafeína é o composto alcalóide encontrado em vários tecidos do cafeeiro, mas essencialmente nos grãos, sendo responsável pelo efeito estimulante do café. A substância é um derivado de um composto chamado xantosina, que é convertido em cafeína em uma reação de biossíntese na qual intervém a ação de três enzimas. É sintetizada em plantas a partir do anel purínico de adenina, através dos seguintes passos: xantosina → 7-metilxantosina → 7-metilxantina → 3,7-dimetilxantina (teobromina) → 1,3,7-trimetilxantina (cafeína) (Figura 1A). A principal via de degradação de cafeína foi elucidada como sendo: cafeína → 1,3-dimetilxantina (teofilina) → 3-metilxantina → xantina → ácido úrico → alantoína → ácido alantóico → uréia → CO<sub>2</sub>+NH<sub>4</sub> (Figura 1B). Alternativamente, cafeína pode degradar-se para teobromina e desta para 3-metilxantina.

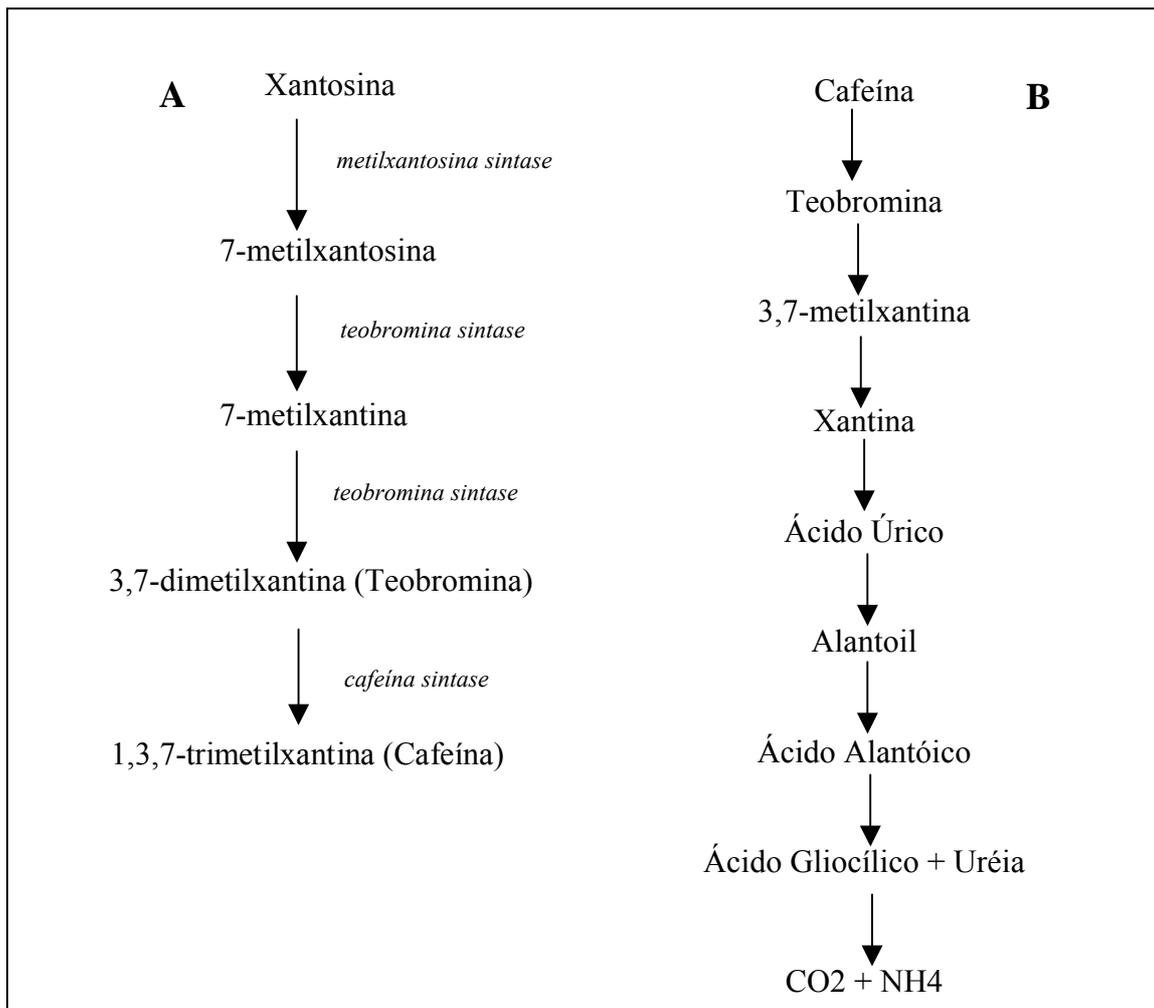


Figura 1- Esquema das vias de síntese (A) e de degradação (B) da cafeína.

Os primeiros estudos com as enzimas da síntese de cafeína em café foram feitos pelos grupos de Waller (ROBERTS & WALLER, 1979) e Baumann (BAUMANN et al., 1983), que verificaram que a enzima responsável pela metilação de 7-metilxantosina para 7-metilxantina e desta para teobromina, era provavelmente a mesma. Outra metiltransferase faz a metilação de xantosina para 7-metilxantosina. Estas enzimas foram purificadas e os genes que as codificam foram clonados e sequenciados em diferentes espécies, incluindo café (MOISYADI et al., 1998; OGAWA et al., 2001).

O conhecimento sobre a síntese e degradação da cafeína tem grande relevância em estudos que podem conduzir ao desenvolvimento de cafeeiros com grãos desprovidos de cafeína, seja mediante intervenção a nível molecular em um dos passos das vias biossintéticas ou pela utilização de genes marcadores na seleção assistida em programas de melhoramento genético.

No primeiro caso, genes envolvidos em diferentes passos da via biossintética da cafeína, podem ser bloqueados interrompendo a síntese do alcalóide. Estudos dessa natureza vêm sendo realizados por vários pesquisadores como MAZZAFERA et. al., (1994), que usaram marcadores radioativos e dosagem de enzimas, em *C. dewevrei* (1% cafeína nas sementes) e as cultivares Mundo Novo (1,2%) e Laurina (0,6%) de *C. arabica*, e concluíram que a proporção entre as taxas de síntese e degradação de cafeína variavam durante a maturação e entre as cultivares, determinando o teor final na semente.

O teor de cafeína reduzido nas sementes da cultivar Laurina é condicionado pela expressão de um gene recessivo (Revisto por MAZZAFERA et al., 1994). Em estudos posteriores, realizados com as espécies *C. eugenoides*, *C. salvatrix* e *C. bengalensis*, ASHIHARA & CROZIER (1999) chegaram a conclusão semelhante. Segundo eles, as três espécies possuem baixo acúmulo de cafeína devido à síntese lenta do alcalóide. Em *C. eugenoides*, os autores observaram também uma rápida degradação da cafeína sintetizada.

Polimorfismos de genes envolvidos na via biossintética da cafeína têm importância destacada no melhoramento do cafeeiro. MIZUNO et al., (2003) identificaram, em frutos de *Coffea arabica*, genes com certa homologia aos genes da cafeína sintase e teobromina sintase presentes em folhas jovens de chá e presentes em bancos de dados genômicos, sugerindo a ocorrência de polimorfismo gênico. Esses pesquisadores obtiveram, através da utilização da técnica de RT-PCR, clones do gene cafeína sintase e verificaram que eles possuíam 80% de similaridade com a teobromina sintase e 40% de similaridade com a cafeína sintase de chá, concluindo que, se clonados podem auxiliar no desenvolvimento de transgênicos de *C. arabica* com baixo teor de cafeína por tecnologia antisense de RNAm ou por silenciamento de gene.

## **2.5 Café Descafeinado**

O desenvolvimento de cultivares com baixos teores de cafeína (SILVAROLLA et al., 2004) tem por alvo um nicho especial de mercado constituído especialmente por consumidores intolerantes aos efeitos estimulantes da cafeína.

Atualmente o produto disponível no mercado para consumidores com este perfil é o café descafeinado por métodos químicos ou físicos de extração, sendo que a origem do processo encontra-se no interesse de indústrias alimentícias e farmacêuticas pelo

alcalóide encontrado nos grãos. O café descafeinado é, portanto, um subproduto industrial.

Existem dois processos para a retirada da cafeína do endosperma do fruto de café, são eles: extração por solventes orgânicos e extração com água. A extração com solventes orgânicos, especialmente diclorometano ou a extração feita com água (KATZ, 1980).

A principal vantagem da extração por solventes orgânicos é a seletividade para cafeína e as vantagens da extração pela água são as grandes taxas de extração, eliminação de ceras insolúveis, cafeína mais pura devido ao método de recuperação, e falta de contato direto entre o produto a ser descafeinado e o solvente. O método tem também desvantagens como a perda de muitas substâncias importantes para o desenvolvimento do aroma e sabor que são solúveis em água e precisam ser recuperadas no final do processo (KING, 1980).

Outra alternativa para o desenvolvimento de cafés descafeinados é a utilização da transgenia. Plantas transgênicas de *C. canephora* foram recentemente produzidas por OGITA et al. (2003). O gene que codifica para teobromina sintase foi silenciado através da metodologia de “RNA interference” ou RNAi. O teor de cafeína dosado em folhas das plantas transformadas obtidas é reduzido em até 70%, indicando a possibilidade de se produzir grãos de café intrinsecamente deficientes em cafeína. OGITA et al., (2003) utilizaram como vetor de transformação *Agrobacterium tumefaciens* com deleções específicas da região 3`UTR do gene que codifica a enzima teobromina sintase e inocularam em *C. canephora*. Foram obtidas 35 mudas transgênicas contendo o RNAi e um gene de controle que codifica a proteína fluorescente verde (GFP). As folhas dessas mudas transgênicas que expressaram o RNAi apresentam uma redução de 30 – 80% na quantidade de teobromina e uma redução de 50 – 70% de cafeína, quando comparados com a planta normal. Tais plantas ainda não tiveram os frutos avaliados (OGITA et al., 2003).

Cafés descafeinados produzidos por meio de processo industrial ou a partir da técnica de biologia molecular, como a transformação genética de plantas, tem um custo bastante elevado e, no primeiro caso, compromete o sabor da bebida. Cafeeiros produtores de grãos naturalmente descafeinados parecem ser a alternativa mais apropriada para esse mercado, com o objetivo de aliar as tradicionais características sensoriais do café à ausência do alcalóide.

## 2.6 Café Naturalmente Descafeinado

A procura por cafeeiros produtores de grãos naturalmente descafeinados ou com teores muito baixos de cafeína vem de longa data. A variabilidade para essa característica no gênero *Coffea* é bastante grande.

A maioria das espécies de *Coffea*, presente em Madagascar, é desprovida de cafeína nos grãos (CHARRIER & BERTHAUD, 1985; CHARRIER, 1978; RAKOTOMALALA et al., 1992), mas barreiras genéticas dificultam a transferência dessa característica para cultivares de *C. arabica*.

Existe também variabilidade para o teor de cafeína entre o germoplasma de *C. arabica*. A cultivar Laurina, com cerca de 0,6% do alcalóide nos grãos (TANGO & CARVALHO, 1963), foi utilizada extensamente em hibridações com cultivares comerciais de *C. arabica*, mas a seleção de plantas produtivas e com baixo teor de cafeína não se revelou tão simples (CARVALHO et al., 1988).

Novas buscas foram realizadas dentro de *C. arabica* a partir da avaliação de grande número de plantas presentes em coleção no IAC, mas variações pequenas, ao redor de 1% de cafeína nas sementes, nível normalmente encontrado nas variedades comerciais dessa espécie foram encontradas (MAZZAFERA e CARVALHO, 1992).

Cruzamentos interespecíficos entre *C. arabica* e espécies diplóides com baixo teor de cafeína provenientes da África foram realizados por MAZZAFERA E CARVALHO (1992). Os autores obtiveram híbridos com baixo teor de cafeína mas também reduzido valor agronômico.

No entanto, pesquisas recentes identificaram acessos de *C. arabica* com teores de cafeína significativamente reduzidos, próximos a ausência total (SILVAROLLA et al., 2004), o que representa uma possibilidade real para a obtenção de cultivares de café naturalmente descafeinadas.

SILVAROLLA et al., (2004) estudaram trezentos acessos de *C. arabica* provenientes da Etiópia, centro de origem e diversificação da espécie, e observaram que três destas plantas, denominadas pelos autores, AC1, AC2 e AC3, apresentaram níveis baixos de cafeína. Uma vez que foi observado acúmulo de teobromina, precursor imediato da via biossintética da cafeína em folhas da planta AC1, os autores sugerem uma deficiência da enzima que age na conversão da teobromina para cafeína. Para testar esta hipótese, eles introduziram nas plantas AC1 e Mundo Novo (MN) cafeína e/ou adenina marcadas radioativamente para monitorar a degradação e a conversão da cafeína. Essa análise foi feita utilizando HPLC após 4, 21 e 48 horas de incubação. A

cafeína exógena marcada radioativamente foi degradada na planta AC1 e MN. Na planta AC1 houve um acúmulo de teobromina, indicando que existe um problema na via biossintética da cafeína. Os autores sugeriram que o baixo nível de cafeína em AC1, comparado com MN, não está relacionado com a degradação da cafeína.

Inúmeras hibridações vêm sendo realizadas entre as plantas AC1, AC2 e AC3 e cultivares comerciais de *C. arabica*, visando à seleção de cultivares naturalmente descafeinadas e altamente produtivas e vigorosas como as atualmente cultivadas. Além dos métodos tradicionais de seleção, estudos relacionados à identificação de marcadores moleculares que possibilitem a seleção assistida, visando à redução do tempo e do custo do processo de seleção, também vem sendo rea

O pericarpo é composto por vários tecidos como exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo é responsável pela expressão da coloração do fruto do café durante o desenvolvimento. O mesocarpo é rico em açúcar e água, sendo formado de células do parênquima com paredes celulares compactas e densas em frutos verdes, que durante a maturação se tornam mais finas provavelmente devido a modificações de pectina. O endosperma é localizado na parte mais interna do pericarpo (DE CASTRO & MARRACCINI, 2006).

O perisperma desenvolve-se do nucelo do óvulo logo depois da fecundação (MENDES, 1942) e permanece até a fase madura (DENTAN, 1985; WEST et al., 1995). O endosperma de café é um tecido triplóide, assim como em outras espécies de plantas.

Estudos realizados por LIN et al., (2005), relacionados aos genes da via biossintética da cafeína, evidenciaram a participação dos mesmos em diferentes tecidos das plantas como endosperma e folhas jovens. Os genes da teobromina sintase e cafeína sintase foram expressos em frutos imaturos e a expressão do gene teobromina sintase foi mais alta, não somente em frutos verdes pequenos (fase chumbinho), mas também em pericarpo e em endosperma imaturo de frutos verdes maiores (fase verde). Os pesquisadores observaram através da tecnologia RT-PCR que não houve expressão de metilxantosina, teobromina e cafeína sintase em frutos maduros, o que poderia explicar a ausência do acúmulo de cafeína durante o processo de maturação nos frutos avaliados.

Diferenças na obtenção de híbridos vêm sendo observadas quando se utilizam em cruzamentos com cultivares comerciais os três mutantes AC1, AC2 e AC3. O mesmo acontece em relação a progênies obtidas pela autofecundação das três plantas. Assim, a eventual participação dos genes envolvidos com a alteração da via biossintética da cafeína na expressão de características em outros tecidos será objeto de investigação no presente estudo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de Experimentação

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Centro de Café “Alcides Carvalho” do Instituto Agrônomo (IAC), situado no Centro Experimental, na Fazenda Santa Elisa, Campinas, São Paulo.

#### 3.2 Material Vegetal

Neste estudo, foi utilizada uma progênie de 12 plantas oriunda do Banco de Germoplasma do Centro Agrônomo Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), na Costa Rica em 1975. Três dessas plantas denominadas AC1, AC2, AC3, são caracterizadas pela ausência quase completa de cafeína no endosperma. A cultivar Mundo Novo foi utilizada como controle nos experimentos realizados. Também foram avaliados frutos de *C. canephora* variedade Kouilou IAC 67-1 e de *C. eugenoides* coleção 8, pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Coffea* do IAC, mantido pelo Centro de Café ‘Alcides Carvalho’ no Centro Experimental Campinas, SP (Tabela 1).

Os frutos foram coletados em vários estádios de desenvolvimento e armazenados em freezer -80°C para as extrações de ácidos nucléicos. As folhas jovens destes materiais também foram coletadas e armazenadas segundo o mesmo procedimento.

Após a antese e fertilização, o desenvolvimento dos frutos varia de acordo com a espécie, cultivar, região de cultivo e tratos culturais. Em Campinas, o florescimento das diferentes espécies de *Coffea* nooEas

Figura 2- Adaptação da escala fenológica proposta por Pezzopane et al., 2003. 1- chumbinho; 2- expansão; 3- verde; 4- verde-cana; 5- cereja.

Tabela 1- Progênies das espécies de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* utilizadas neste estudo

| <b>Espécie</b>             | <b>Amostra</b>                | <b>Código de Identificação</b> |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>C. arabica</i>          | Cultivar Mundo Novo IAC 515-5 | MN                             |
|                            | Progênie Etiópia Planta 1     | AC1                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 2     | AC2                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 3     | AC3                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 4     | ET4                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 5     | ET5                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 6     | ET6                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 7     | ET7                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 8     | ET8                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 9     | ET9                            |
|                            | Progênie Etiópia Planta 10    | ET10                           |
|                            | Progênie Etiópia Planta 11    | ET11                           |
| Progênie Etiópia Planta 12 | ET12                          |                                |
| <i>C. canephora</i>        | Cultivar Kouilou IAC 67       | Coleção 1                      |
| <i>C. eugenioides</i>      | -                             | Coleção 8                      |

### **3.3 Data-mining e Identificação de Genes da Via Biossintética da Cafeína**

Para a síntese dos oligos específicos que correspondessem a cada um dos genes relacionados com a via biossintética da cafeína foi feita uma busca de sequências das enzimas no NCBI por sequências de Metilxantosina Sintase (AB048793), Teobromina Sintase (AB048794) e Cafeína Sintase (AB086414) já identificadas em café e em outras espécies.

Utilizando-se estas sequências, foi realizada uma busca através do aplicativo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) no Banco de Dados do Genoma Café para a identificação de sequências ou ESTs homólogos aos genes em café.

Esses agrupamentos foram realizados para identificar os ESTs correspondentes a cada um dos genes. Uma vez que as três enzimas apresentam domínios protéicos muito conservados, do grupo metiltransferase, nas análises, via BLAST, vários ESTs apresentaram homologia (similaridade) com todos os três genes. Assim, após a identificação desses ESTs, foram feitos agrupamentos para identificar regiões comuns destes domínios através do aplicativo CLUSTAL W (HIGGINS et al., 1994).

Um resumo destas análises é apresentado na tabela 2. Nesta tabela encontram-se os genes da via biossintética da cafeína CmXRS1– Metilxantosina sintase; CTS2- Teobromina sintase; CCS1- Cafeína sintase. Pode-se também visualizar a sequência do oligo obtido, a região amplificada e o tamanho esperado de cada fragmento.

Tabela 2- Sequência de oligos, a região amplificada e o tamanho esperado para o produto de amplificação dos genes

| <b>Gene</b>   | <b>Sequência do oligo</b> | <b>Região do Transcrito</b> | <b>Tamanho Esperado</b> |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| <b>CmXRS1</b> | F- ATGCCCGGCTCTTTCTACAG   | 361pb - 380pb               | 300pb                   |
|               | R- CGGGCGTCTAATTCAACTCCT  | 639pb - 660pb               |                         |
| <b>CTS2</b>   | F- CCCGTCCAGAAGGCATATTT   | 253pb – 273pb               | 300pb                   |
|               | R- GAGAAGGCATCATAATGGG    | 564pb - 586pb               |                         |
| <b>CCS1</b>   | F2- ATACAAGAATTGTTGCGG    | 87pb - 104 pb               | 833pb                   |
|               | F3- TTTTCAACAGTTCGGGAC    | 174pb - 191pb               | 746pb                   |
|               | F4- CGCAATCTTGAGAAAGAA    | 323pb - 340pb               | 596pb                   |
|               | F5- GGGTGCATTTACTCTTCC    | 509pb - 526pb               | 410pb                   |
|               | F6- GGTCCGCCCATCAAGAAG    | 536pb - 553pb               | 383pb                   |
|               | R- CAGGATACAGGGGAATGGGATC | 612pb - 633pb               |                         |

### 3.4 Genes Envolvidos nas Fases de Desenvolvimento dos Frutos

Os genes utilizados para verificar as vias de desenvolvimento dos frutos codificam para seguintes proteínas:

Fenilalanina-amônia-liase (PAL) → enzima precursora dos compostos fenólicos.

1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACC oxidase) → enzima da via biossintética do etileno e que dará origem ao mesmo.

Endo -  $\beta$  - manannase e  $\alpha$  - galactosidase → enzimas relacionadas à composição química da semente, envolvidas na síntese de açúcar (MARRACCINI et al, 2001).

Late Maturation Accumulated (LEA) → proteína relacionada com a proteção osmótica de endosperma durante a maturação.

Never Ripe → proteína relacionada com a indução e transdução de sinal durante a maturação do fruto.

Caffeoyl-CoA metiltransferase → enzima precursora da síntese de ácidos clorogênicos.

A busca por ESTs homólogos a estes genes foi feita por análises *in silico* no Banco de Dados do Genoma Café. Essa busca foi feita utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Após a realização dessas análises, foram feitos agrupamentos e alinhamentos das sequências de aminoácidos para cada gene e realizada a síntese de oligonucleotídeos baseada nessas seqüências específicas.

### **3.5 Extração de Ácidos Nucléicos**

O DNA total de folhas foi extraído de todas as amostras, segundo o método descrito por PAILLARD et al., (1996). O material vegetal foi coletado e mantido em nitrogênio líquido sendo em seguida macerado. Após a maceração, foi adicionado 1,5 mL de tampão de extração (0,35M sorbitol; 0,1M Tris-HCL; 50mM EDTA pH 8,0; 0,5% bisulfito de sódio) mais 22,5  $\mu$ L de mercaptoetanol. Esse material foi centrifugado a 10000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado sendo adicionado 370  $\mu$ L de tampão de extração mais mercaptoetanol, para ressuspensão do pellet. Acrescentou-se posteriormente 520  $\mu$ L de tampão de lise (0,2M Tris-HCL; 50 mM EDTA; 2M NaCL; 2% MATAB) e em seguida 110  $\mu$ L de SDS 10% e a solução foi misturada suavemente. A mistura foi incubada a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 10000 rpm a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo, e o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M (100  $\mu$ L) e 1 mL de isopropanol 100% gelado. A solução foi mantida por 2 horas em freezer -20°C. Após este período,

centrifugou-se a solução a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C. Em seguida, manteve-se o DNA em temperatura ambiente para secar, sendo ressuspendido em 200 µL de TE (100 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA). Adicionou-se 4 µL de RNase 10mg/mL e a solução foi incubada por 30 minutos a 37°C. Adicionou-se TE para completar o volume de 1 mL. O DNA foi extraído com 1 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugou-se por 10 minutos a 10000 rpm a 15°C. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Em seguida foi coletada a fase superior e foi transferida para um outro tubo e adicionado clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugou-se por 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. A fase superior foi transferida para outro tubo e para precipitar o DNA foi adicionado 100 µL de acetato de sódio 3M e 1 mL de isopropanol 100% gelado, sendo mantido por 8 horas em temperatura de -20°C. A solução foi centrifugada a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C sendo descartado o sobrenadante e em seguida o pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado por 8 minutos a 13000 rpm a 4°C. Depois do pellet seco, este foi ressuspendido com TE.

Para extração de RNA, os frutos foram coletados e macerados em nitrogênio líquido. Depois de macerado, foi adicionado 20 mL de tampão de extração (2% CTAB; 2% PVP; 100 mM Tris-HCL; 25 mM EDTA; 2 M NaCL) mais 400 µL de mercaptoetanol. A solução foi incubada a 65°C por 15 minutos e depois foi adicionado 20 mL de clorofórmio. Centrifugou-se a 10000 rpm por 10 minutos, sendo a fase aquosa transferida para outro tubo. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. A fase aquosa foi recolhida e a ela adicionado LiCl 12 M RNase Free até a concentração final de 2,5M. A solução foi incubada por 12 horas a 4°C. Depois foi centrifugada a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C. O pellet foi lavado com 500 µL de LiCl 2,5 M RNase Free e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O pellet secou a temperatura ambiente e depois foi ressuspendido em 100 µL de água tratada com DEPC.

O RNA foi quantificado através de espectrofotometria, medindo-se a absorvância a 260nm e 280nm.

### **3.6 Amplificação de Genes por PCR**

A partir dessas amostras de DNA foram feitos testes de amplificação, para verificar se havia polimorfismos nas sequências dos genes selecionados entre as plantas. A reação de PCR foi feita para um volume final de 26 µl. Foram utilizados 40 ng de DNA, tampão 10X, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, dNTP 2 mM, oligos F e R 10 pmol, *Taq polimerase* 0,25 µl e H<sub>2</sub>O DEPC.

As condições de reação foram as seguintes: 95°C para denaturação da fita por um minuto; 52°C para o anelamento com os oligos por trinta segundos, essa temperatura foi repetida por 30 ciclos e 72°C por trinta segundos para que fosse realizada a extensão da fita a partir de cada terminal 3' dos oligos.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 0,8% e corados com solução de brometo de etídio.

### **3.7 Análise de Expressão**

A análise de expressão dos genes, foi feita através da metodologia RT-PCR (Transcriptase reversa por reação de polimerase em cadeia).

Após a quantificação por espectrofotômetro do RNA, foi sintetizado o cDNA a partir da metodologia de RT-PCR utilizando-se 400 ng de RNA total. O RNA foi tratado com DNase. As condições de reação para esta síntese foram as indicadas no protocolo do Kit SuperScript III First – Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen).

Os genes correspondentes à Metilxantossina Sintase (CmXRS1), Teobromina Sintase (CTS2), Cafeína Sintase (CCS1), foram amplificados utilizando-se oligos específicos selecionados anteriormente. Oligos correspondentes ao gene actina foram utilizados como controle da integridade e concentração do RNA analisado.

As condições de PCR utilizadas estão descritas no item anterior (item 3.6).

Foram feitas três repetições com esses oligos para comprovar os resultados obtidos.

Os fragmentos correspondentes aos transcritos gênicos foram separados em gel de agarose corado com brometo de etídeo, e posteriormente avaliados quanto à presença, ausência e intensidade visual dos fragmentos amplificados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Data-mining

Através das análises *in silico* foram identificados 12 ESTs homólogos ao gene da Cafeína Sintase (CCS1), 11 ao da Metilxantosina (CmXRS1) e 21 ao da Teobromina Sintase (CTS2). Como estas enzimas apresentam domínios protéicos comuns e altamente conservados, vários ESTs apresentaram homologia comum aos três genes.

Para diferenciar os ESTs específicos para cada um dos genes foram feitas análises de agrupamento e alinhamento das possíveis sequências de aminoácidos de cada EST. Desta maneira foi possível identificar os ESTs correspondentes a cada um dos genes da via biossintética de cafeína. O número de ESTs, a biblioteca onde eles se expressam e o tamanho de cada agrupamento ou “*contig*” são apresentados na tabela 3.

Os resultados mostram que foi possível identificar sequências homólogas para os genes das três enzimas em café (CmXRS1, CTS2, CCS1), e que estas são expressas em folhas e frutos (Tabela 3). Além disso foi possível identificar polimorfismos na região 5’ entre os ESTs presentes em bibliotecas de frutos e folhas, indicando uma possível tecido-especificidade de transcritos.

Tabela 3- Identificação de transcritos correspondentes aos genes envolvidos na via biossintética da cafeína

| Gene                | Transcritos | Nº de ESTs | Tecido | Tamanho (pb) Esperado |
|---------------------|-------------|------------|--------|-----------------------|
| Metilxantosina      | 1           | 6          | Fruto  | 1089                  |
| Sintase<br>(CmXRS1) | 2           | 5          | Folha  | 1014                  |
| Teobromina          | 1           | 9          | Fruto  | 975                   |
| Sintase<br>(CTS2)   | 2           | 12         | Folha  | 996                   |
| Cafeína Sintase     | 1           | 6          | Fruto  | 1205                  |
| (CCS1)              | 2           | 6          | Folha  | 1032                  |

#### 4.2 Amplificações de Regiões Genômicas dos Genes das Metiltransferases

Com o objetivo de se verificar a qualidade dos oligos e comprovar a sua especificidade, foram realizados testes de amplificação utilizando-se DNA total de uma progênie de 12 plantas, três das quais identificadas como naturalmente descafeinadas (AC1, AC2 e AC3).

Os oligos utilizados para esta amplificação correspondem a regiões codificadoras dos genes da via biossintética da cafeína metilxantosina sintase, teobromina sintase e cafeína sintase. A região selecionada corresponde a um fragmento expresso de aproximadamente 300 pares de bases (pb) para todos os genes.

Os resultados desta análise estão apresentados na Figura 3. Em todas as plantas avaliadas foi amplificado um fragmento único, de 500 pb para os três genes, o que indica a especificidade dos pares de oligos testados. Além disso, o tamanho observado é maior do que o esperado de 300 pb, devido a uma possível presença de introns na região amplificada. Os introns são sequências de intervenção, ou seja, são sequências de DNA de um gene que não codificam qualquer parte da proteína produzida pelo gene e que separa a sequência constituída pelos exons (sequência codificadora).

Também não foi observado polimorfismo com relação ao tamanho do fragmento amplificado entre as progênies. Este resultado foi observado para os três genes testados. Dessa maneira, uma vez que todos os pares de oligos amplificaram banda única e do mesmo tamanho, comprovou-se que estes são específicos para os locos em estudo.

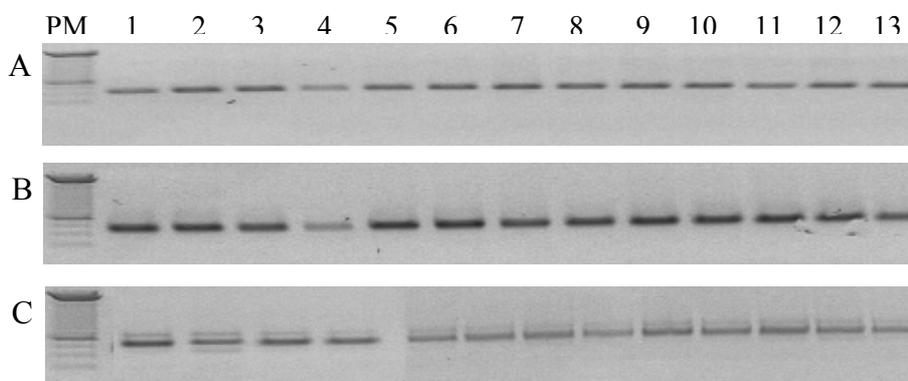


Figura 3- Padrão de amplificação de fragmentos correspondentes aos genes da Metilxantosina (A), Teobromina sintase (B), Cafeína sintase (C). Plantas da progênie AC (2-14) e Mundo Novo (1). PM- Peso Molecular de 250 pb.

### 4.3 Expressão de Genes da Via Biossintética de Cafeína

As análises bioquímicas das plantas AC indicam que estas acumulam teobromina, precursor da cafeína. Além disso, não foi detectada atividade de cafeína sintase em folhas AC (SILVAROLLA et al., 2004). A partir destas análises, a hipótese testada neste estudo é se a inatividade da enzima cafeína sintase é resultado da ausência ou deficiência da expressão do seu gene. Assim, a expressão do gene da cafeína sintase e das outras enzimas da via foram avaliadas através da técnica RT-PCR, ao longo do desenvolvimento de frutos AC.

Frutos da variedade comercial Mundo Novo, que apresentam teores normais para cafeína, foram incluídos nesta análise para comparação do padrão de expressão gênica.

#### 4.3.1 Metilxantosina sintase

A metilxantosina sintase é a primeira enzima da via biossintética da cafeína, responsável pela transformação da xantosina para 7-metilxantosina. Na figura 4 pode-se observar o gene da metilxantosina sintase com a região do oligo que foi obtida. Os resultados da avaliação deste gene são apresentados na Figura 5. Em todos os genótipos foi amplificado um fragmento de 300 pares de bases, de acordo com o esperado.

```
GACTTTCGGGAAAGAACCACGNNGTCGAACTGCCTCTCGCCAAGGTGAAACCTGTCCTTG  
AACAAATGCGTACGGGAATTGTTGCGGGCCAACCTGCCAACATCAACAAGTGCATTAAAGT  
TGCGGATTTGGGATGCGCTTCTGGACAAACACACTTTTAAACAGTTCGGGACATTGTCCAAA  
GTATTGACAAAGTTGGCCAGGAAAAGAAGAATGAATTAGAACGTCCCACCATTTCAGATTTT  
TCTGAATGATCTTTTCCCAAATGATTTC AATTCGGTTTTCAAGTTGCTGCCAAGCTTCTACCG  
CAA ACTTGAGAAAGAAAATGGACGCAAAATAGGATCGTGCCTAATAGGGGCAC ATGCCCG  
GCTCTTTCTACAGCAGACTCTTCCCCGAGGAGTCCATGCATTTTTTACACTCTTGTTACTGTC  
TTCAATGGTTATCTCAGGTTCTAGCGGTTTGGTGACTGAATTGGGGATCAGTACGAACAAA  
GGGAGCATTACTCTTCCAAAGCAAGTCGTCTGCCCGTCCAGAAGGCATATTTGGATCAATT  
TACGAAAGAAAGATTTTACCACATTTCTAAGGATTCATTCGGAAGAGTTGTTTTACATGGC  
CGAATGCTCCTTACTTGCATTTGTAA AGGAGTTGAATTAGACGCCCGGAATGCCATAGACTT  
ACTTGAGATGGCAATAAACGACTTGGTTGTTGAGGGACA
```

Figura 4- Sequências do cDNA da metilxantosina sintase. Em vermelho estão representadas as sequências dos oligos “Forward” e “Reverse”.

Em frutos da cultivar Mundo Novo foi observado um padrão de expressão uniforme do gene metilxantosina sintase em todas as fases de desenvolvimento estudadas. Essa cultivar foi obtida pelo programa de melhoramento do IAC e por isso é esperada uma uniformidade na expressão de genes relacionados com características agronômicas desejáveis. Quando se faz seleção de plantas para obtenção de materiais melhorados, leva-se em consideração diversas características que são importantes agronomicamente, entre elas está a qualidade de bebida. A seleção de materiais melhorados leva a homozigose dos genes relacionados a essas características importantes para o melhorista. Por isso podemos visualizar o mesmo padrão de expressão do gene metilxantosina sintase em MN.

Em frutos AC1 é observado um acúmulo de transcritos em todos os estádios de desenvolvimento, com um aparente declínio na fase verde-cana, indicando que houve um possível silenciamento do gene nessa fase de desenvolvimento.

Já em AC2, o padrão de expressão do gene apresenta um acúmulo de transcritos na primeira fase estudada (expansão), com um declínio nas fases verde-cana e cereja.

O padrão de expressão dos frutos apresentados em AC3 mostra um acúmulo de transcritos em todos os estádios de desenvolvimento, com um aparente declínio nos estádios chumbinho e verde-cana.

Um acúmulo de transcritos sugere que ocorre uma maior transcrição deste gene na fase de desenvolvimento avaliada, indicando que nas outras fases onde a expressão do gene foi menor ocorreu uma alteração na síntese dessa enzima.

A expressão dos transcritos de metilxantosina indica que esse passo da via biossintética da cafeína deve funcionar normalmente nas plantas AC e que a baixa concentração de cafeína não é devida a alterações na expressão deste gene.

No entanto os resultados indicam que entre as plantas AC1, AC2 e AC3 há uma variabilidade quanto ao acúmulo de transcritos da metilxantosina, o que talvez resulte em diferenças na concentração final de cafeína nos estádios de desenvolvimento estudados. Entre as plantas AC observou-se também variação de expressão entre as fases de desenvolvimento estudadas. Quando se compara as plantas AC, verifica-se que a planta AC2 apresenta um padrão de expressão bem diferente de AC1 e AC3, uma vez que transcritos metilxantosina se acumulam nas fases iniciais de desenvolvimento dos frutos.

Quando se compara as plantas AC com MN, pode-se notar claramente a diferença de expressão dos transcritos. A cultivar MN possui uma uniformidade na

expressão dos transcritos por ser material melhorado, enquanto que material selvagem como as AC variam a expressão entre as plantas e entre os estádios de desenvolvimento avaliados.

Em estudo similar, KOSHIRO et al., (2006) avaliaram o padrão de expressão do gene da enzima metilxantosina em *C. arabica* cv. Mokka e em *C. canephora*, através de análises RT-PCR, e observaram que transcritos do gene metilxantosina foram amplificados em todas as fases de desenvolvimento do fruto e houve uma diminuição da expressão na fase cereja da cultivar Mokka. Os autores sugerem que além do controle transcricional existe também um controle pós-transcricional envolvido nas *N*-metiltransferases, ou que exista também uma atividade de nucleotídeos purínicos para a biossíntese de cafeína importante para os frutos de café.

No entanto, como na cultivar Mundo Novo os transcritos de metilxantosina estão presentes em todas as fases de desenvolvimento, e como a concentração de cafeína em frutos Mokka e MN é a mesma, pode-se concluir que o padrão de expressão deste gene é dependente do genótipo e do ambiente e não interfere significativamente com o teor final de cafeína do fruto.

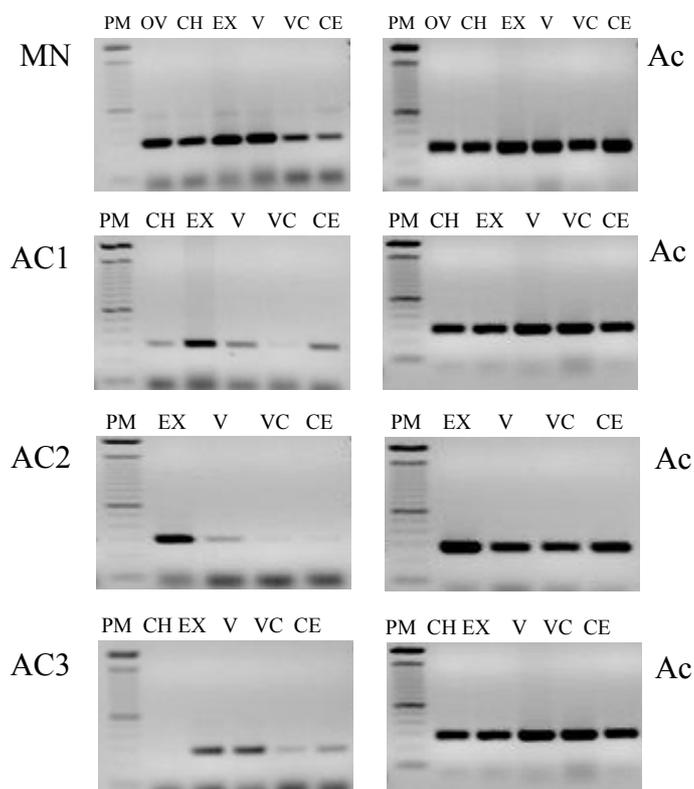


Figura 5- Amplificação de transcritos de metilxantosina, a partir de RT-PCR, na cultivar Mundo Novo, nas plantas AC1, AC2 e AC3. OV- ovário, CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

#### 4.3.2 Teobromina sintase

A teobromina sintase é a segunda enzima da via biossintética da cafeína responsável pela transformação de 7-metilxantosina em teobromina. Na figura 6 pode-se observar o gene da metilxantosina sintase com a região do oligo que foi obtida. Os resultados da avaliação da expressão do gene da teobromina sintase são apresentados na Figura 7. O fragmento amplificado em todos os genótipos é de 300 pares de bases.

```
CTCAGGTCTTTTACTAATCCCGTTTATCTTTTACTTTTTCTTGTAGCAAGAAAGAGATTTCT
GAAGAACTACCTAACATATTTATTTAAGTCGTGGCTCATGATTTACATTCCCACATGCAA
CACTAACAAAATGATCCGACTATATAAGTTACCAGTTCTAGACGTGCAGGTTCCCAGCGGTT
TGGTGATTGAATTGGGGATTGGTGCAAACAAAGGGAGTATTTACTCTTCCAAAGGATGTCGT
CCG CCCGTCCAGAAGGCATATT GGATCAATTTACGAAAGATTTTACCACATTTCTAAGGAT
TCATTCGAAAGAGTTGTTTTACGTGGCCGAATGCTCCTTACCTGCATTGTAAAGTAGATGA
AATTCGACGAACCGAATCCCCTAGACTTACTTGACATGGCAATAAACGACTTGATTGTTGAG
GGACTTCTGGAGGAAGAAAAATTGGATAGTTCAATATTCCATTCTTTACACCTTCAGCAGA
AGAAGTAAAGTGCATAGTTGAGGACGAAGGTTCTTGCGAAATTTTATATCTGGAGACTTTTA
AGG CCCATATGATGCTGCCTTCTC TATTGATGATGATTACGCAGTAAGATCCCATGAACAA
ATTAAGCAGAGTATGTGGCATCATTAATTAGATCAGGTTACGAACCCATCCTCGCAAGTCA
TTTTGGAGCAGCTATTATGCCTGACTTATTCACATGCTTGCGAAACATGCAGCAAAGGGTCT
CCACATGGGCAAAAAGCTGCTATAATAATCTTATCATTCTCTCGCCAAAAGCCAGAAGAGTC
AGACGTGCAAAAAGTTTGTTTTTAGTTTGTTTTTGGGACGTGGGGGTCCTTTCAGGCATCGC
CTTTTGNATCCGTAATAAAGCGATGGGCAAGATAAGAATTTAAAACATATTTCAAAAAAAA
AAAAAAG
```

Figura 6- Sequências do cDNA da teobromina sintase. Em vermelho estão representadas as sequências dos oligos “Forward” e “Reverse”.

Pode ser observado na figura 8 o padrão de expressão apresentado pelo gene teobromina sintase em MN. A cultivar MN apresenta o mesmo padrão e intensidade de expressão dos transcritos em todas as fases de desenvolvimento estudadas.

O padrão de expressão em frutos AC1 mostra um acúmulo de transcritos em todos os estágios de desenvolvimento, com um aparente declínio na fase verde-cana.

Em AC2, o padrão de expressão dos frutos apresenta um acúmulo de cópias do gene na primeira fase de desenvolvimento apresentando um declínio nas fases posteriores de desenvolvimento.

A planta AC3 apresenta um acúmulo de transcritos a partir dos estádios expansão e verde, havendo um declínio na expressão de transcritos nos estádios verde-cana e cereja.

Pode ser verificado que de maneira geral a expressão do gene teobromina sintase diminui conforme o desenvolvimento do fruto, sendo observado que nas últimas fases de amadurecimento não há expressão do gene.

O padrão de expressão do gene da teobromina sintase foi muito semelhante ao da metilxantosina, indicando que ambas as enzimas apresentaram mecanismos comuns de regulação da expressão gênica.

Em análises bioquímicas anteriores, SILVAROLLA et al., (2004) observaram que existe um acúmulo de teobromina nos frutos da planta AC1, indicando a existência de uma alteração no último passo da via biossintética da cafeína, que impede a conversão da teobromina para cafeína. Supondo que a via biossintética da cafeína funcione pelo mecanismo de *feedback*, isto é, quando há produção de uma enzima e esta não consegue fazer a conversão para seu produto final, o qual se acumula, ocorre um sinal na via indicando que não há mais a necessidade de continuar a produção desta enzima, pois não há conversão para o produto final. Dessa maneira pode-se explicar o acúmulo da teobromina, identificada em análises bioquímicas anteriores por SILVAROLLA et al., (2004), e também a deficiência na enzima cafeína sintase que faz a conversão da teobromina em cafeína.

No trabalho de KOSHIRO et al., (2006), a expressão do gene teobromina sintase se apresentou de forma irregular em todas as fases de desenvolvimento da cultivar Mokka, e em *C. canephora* não foram detectados transcritos. Os pesquisadores também analisaram a expressão do gene em grãos e no pericarpo e observaram que a expressão dos transcritos foi maior em sementes que em pericarpo em *C. arabica* cultivar Mooka, no estádio expansão. Em *C. canephora* foi observado uma expressão reduzida desse gene em sementes também no estádio expansão.

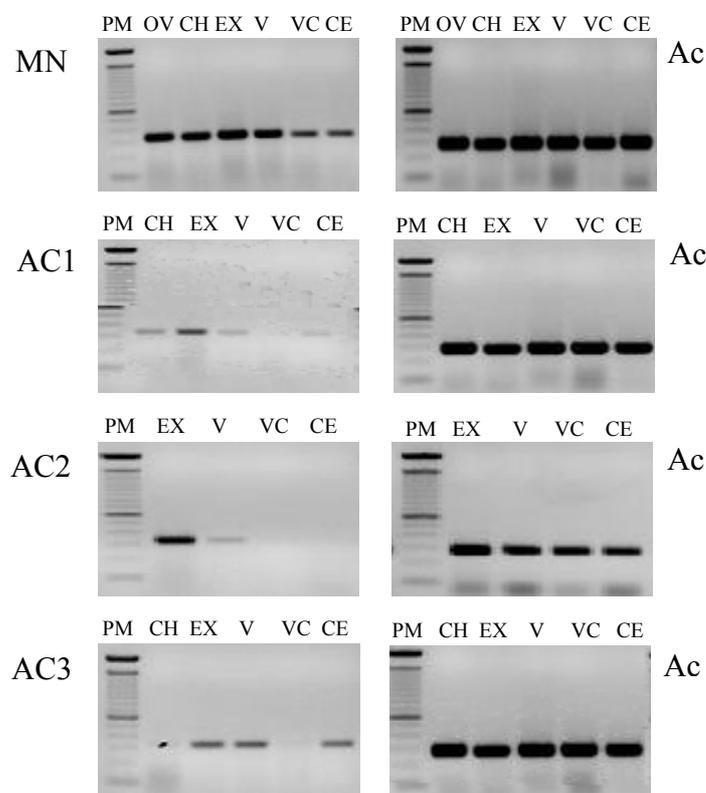


Figura 7- Amplificação de transcritos de teobromina, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

#### 4.3.3 Cafeína sintase

Cafeína sintase é a última enzima da via biossintética da cafeína e é responsável pela conversão de teobromina para cafeína.

Nesta análise, foram utilizados diferentes oligos que correspondem a diferentes regiões da região 5' do transcrito da cafeína sintase. Estes oligos foram denominados F2, F3, F4, F5 e F6 (Figura 8).

A fragmentação foi feita para caracterizar a região 5' do transcrito da cafeína sintase (SILVA et al., comunicação pessoal), uma vez que em análises anteriores se observou um padrão diferencial da expressão do gene CCS1 em folhas de plantas AC (SILVA et al., comunicação pessoal). Esses estudos sugerem também a existência de uma alteração na sequência 5' do gene.

Antes de ser feita a fragmentação da região 5' do transcrito, foi obtido um par de aproximadamente 300 pares de bases que compreendia uma região menor do transcrito da cafeína sintase. Porém, esse par de oligos não se teve uma boa amplificação, apresentando um padrão diferencial em folhas de plantas AC, por isso foi feita a fragmentação na região 5' do transcrito, para selecionar a região anterior a esse par de oligos para verificar se existia uma possível alteração nessa região.

Na figura 8 pode-se observar a sequência do gene da cafeína sintase e os pares de genes obtidos da sequência.

ATGGAGGCGAAGGCGATACAAGCTACGCCAAGAACTCATCCTAC **AATCTGTTTCTCATCAG**  
**GGTG**AAACCTGTCTTGAACAATGC **ATACAAGAATTGTTGCGG**GCCAACTTGCCCAACATC  
AACAAAGTGCTTTAAAGTTGGGGATTTGGGATGCGCTTCTGGACCAACACA **TTTTCAACAGT**  
**TCGGGAC**ATTGTACAAAGTATTGACAAAGTTGGCCAGGAAAAGAAGAATGAATTAGAACGT  
CCCACCATTAGATTTTTCTGAATGATCTTTTCCAAAATGATTTCAATTTCGGTTTTCAAGTTG  
CTGCCAAGCTTCTAC **CGCAATCTTGAGAAAGAA**AATGGACGCAAAATAGGATCGTGCCTGA  
TAGGCGCAATGCCCGGCTCTTTCTACAGCAGACTCTTCCCGAGGAGTCCATGCATTTTTTA  
CACTCTTGTTACTGTTTGCATTGGTTATCTCAGGTTCCAGCGGTTTGGTGAATGATGGGG  
ATCAGTGCGAACA AAA **GGGTGCATTACTCTTCC**AAAGCAAGT **GGTCCGCCCATCAAGAAG**G  
CATATTTGGATCAATTTACGAAAGATTTTACCACATTTCTTAGGATTCATTCGGAAGAGTTG  
ATTTAC **GTGGCCGAATGCTCCTTAC**TTTCATTTGTAAAGAAGATGAATTCGACCACCCGAA  
TTCCATGGACTTGCTTGAGATGTCAATAAACGACTTGGTTATTGAGGGACATCTGGAGGAAG  
AAAAATTGGATAGCTTCAATGTTCCAATCTATGCACCTTCAACAGAAGAAGTAAAGCGCAT  
AGTTGAGGAGGAAGGTTCTTTTGAAATTTTATACCTGGAGACTTTTTATGCCCTTATGATG  
CTGGCTTCTCTATTGATGATGATTACCAAGGAA **GATCCCATCCCTGTATCCTG**CGATGAA  
CATGCTAGAGCAGCGCTGTGGCATCTGTCTGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGT  
CATTTTGGAGAAGCTATTTTACCTGACTTATCCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGT  
TCTCCG **TCGGGCAAAGGCTTCTAT**GATAGTGTATCATTTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAA  
GGCAGACATGTA AAAAGTTTGT TTTT TAGTTGGTTTTTGTGTTGTGGTTTTGTTTTTAGATATG

Figura 8- Sequências do cDNA da cafeína sintase. Em vermelho estão representadas as sequências dos oligos “Forward” e “Reverse” abrangendo a maior parte do transcrito. Em amarelo estão representadas as sequências de oligos que apresentaram um padrão diferencial da expressão do gene CCS1. Em azul estão as sequências fragmentadas na região 5' do gene da CCS1, os oligos são F2, F3, F4, F5 e F6.

Para as plantas AC as fases de desenvolvimento estudadas foram chumbinho, expansão, verde, verde-cana e cereja e para a cultivar Mundo Novo as fases foram ovário, chumbinho, expansão, verde, verde-cana e cereja.

O padrão de expressão do gene da cafeína sintase na cultivar Mundo Novo se mantém constante em praticamente todas as fases de desenvolvimento estudadas, com picos de expressão nas fases de expansão e verde, como pode ser observado na figura 9. Além disso, para o par F2 foram observados dois transcritos distintos, nas fases finais de desenvolvimento: um do tamanho esperado (833pb) e outro menor com 350 pb. O transcrito de 350 pb não é observado em outras fases de desenvolvimento, e tampouco é detectado com as outras combinações de oligos. Assim, estes resultados sugerem que este transcrito não possui a região compreendida entre os oligos F3 a F6. As diferenças observadas entre o nível de transcritos amplificados para cada um dos pares de oligos podem ser decorrentes de condições experimentais, particularmente a diferença de temperatura ótima para cada par de oligos, e também pode ser devido a ocorrência de splicing alternativo nessa região.

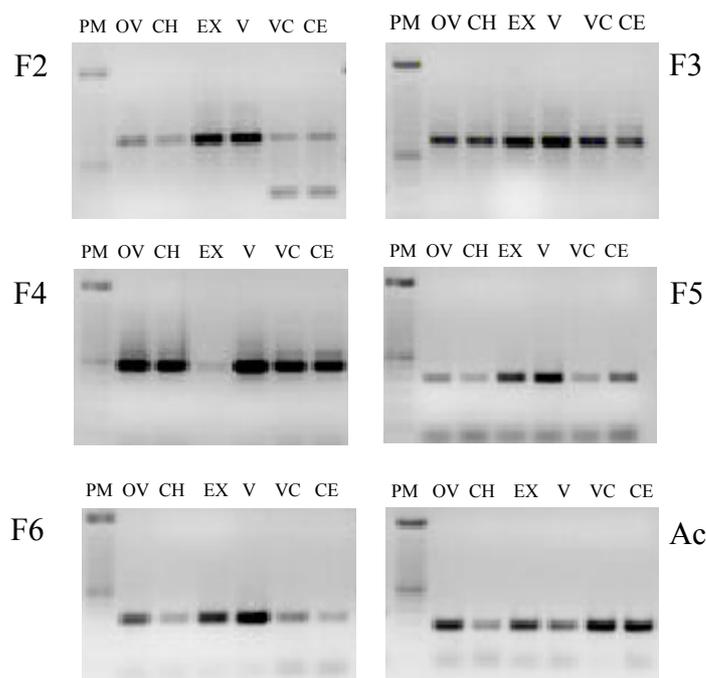


Figura 9- Amplificação de transcritos de Cafeína sintase, a partir de RT-PCR na cultivar MN, utilizando os pares de oligos F2, F3, F4, F5 e F6. OV- ovário, CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

O padrão de expressão em frutos AC1 mostra um acúmulo de transcritos no estágio cereja em todos os pares de oligos avaliados, com exceção do par F6, onde transcritos não amplificaram. Para os fragmentos correspondentes aos pares F3 e F4

foram amplificados transcritos também no estágio verde. Para o par F6 não foram detectados transcritos em nenhum estágio de desenvolvimento, como pode ser observado na figura 10. Além disso, os resultados obtidos com o par F2 mostram a amplificação de um fragmento de tamanho menor ao esperado, com 350 pb, semelhante ao transcrito extra observado em frutos de Mundo Novo (Figura 9). Em frutos AC1 foi observada a amplificação do fragmento com 833 pb em apenas uma das repetições, e mesmo nesta análise, a intensidade do fragmento é muito pouco intensa, indicando se tratar de um transcrito raro (dados não mostrados).

Com esse resultado pode-se verificar que existe uma maior concentração de transcritos do gene da cafeína sintase na última fase de desenvolvimento dos frutos de café em todos os fragmentos obtidos.

Comparando esses resultados com os obtidos para a cultivar MN, pode-se verificar que existe uma variação de expressão desse gene, observada para todos os oligos avaliados. Em frutos da planta AC1 a expressão do gene da cafeína sintase é mais significativa ao final da maturação. Além disso, o transcrito pode estar alterado, uma vez que o par de oligos F6 não é capaz de amplificar nenhum fragmento, e o par F2 amplifica um fragmento menor do que o esperado. Também, o fragmento amplificado pelo par F2 em AC1 é similar ao transcrito extra amplificado em MN e observado nas fases finais de desenvolvimento.

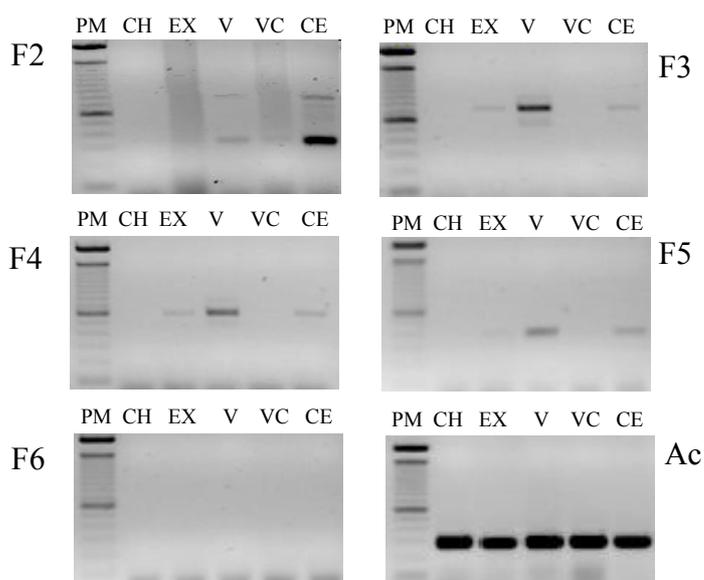


Figura 10- Amplificação de transcritos de Cafeína sintase, a partir de RT-PCR na planta AC1, utilizando os pares de oligos F2, F3, F4, F5 e F6. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

A Figura 11 apresenta os resultados da planta AC2. As fases de desenvolvimento estudadas foram expansão, verde, verde-cana e cereja. Frutos de AC2 apresentaram praticamente o mesmo padrão de expressão para todas as combinações dos oligos, com amplificação de transcritos nas fases iniciais de desenvolvimento.

O par de oligos F2 apresentou fraca amplificação de transcritos na fase expansão e verde cana. Para o par F6 é observado uma amplificação, porém diminuída desse gene na fase verde.

Diferentemente do padrão de expressão observado em frutos AC1, os frutos AC2 apresentaram expressão do gene da cafeína sintase nas fases iniciais de desenvolvimento. Além disso, o par F6 é capaz de amplificar fragmentos ao menos nas fases iniciais do desenvolvimento. Já o par F2, apesar de revelar um número reduzido de transcritos, amplifica fragmentos do tamanho esperado, inclusive o transcrito extra de 350 pb.

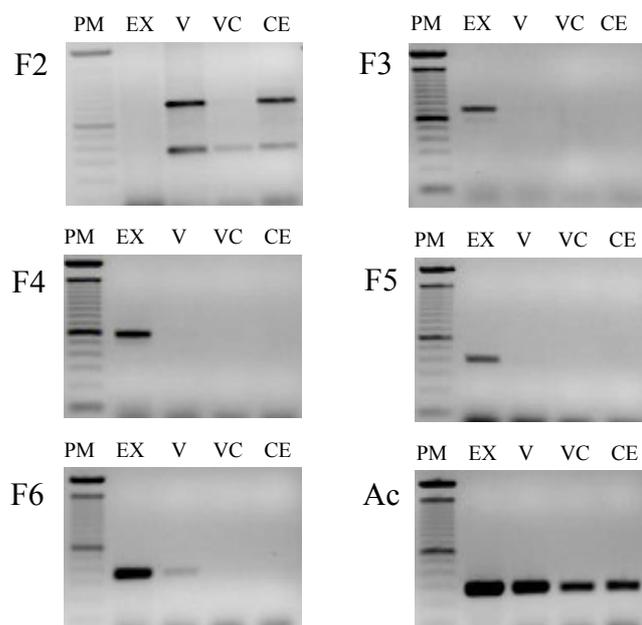


Figura 11- RT-PCR da planta AC2. Combinações dos pares de oligos F2, F3, F4, F5 e F6. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo ubíquo.

Os resultados das análises dos frutos AC3 estão apresentados na Figura 12. As fases de desenvolvimento estudadas foram chumbinho, expansão, verde, verde-cana e cereja.

Para o par F2, observou-se acúmulo de transcritos nas fases expansão e verde. Esse par de oligos também amplificou dois fragmentos como observado anteriormente (Figura 9). Porém, em AC3 os dois transcritos são observados em todas as fases avaliadas.

Os pares F3 e F5 amplificaram transcritos, nas fases expansão, verde e cereja. Para o par F4, foram observados poucos transcritos nas fases verde e cereja. Já para o par F6 foram observados fragmentos nas fases expansão, verde cana e cereja, como observado para AC1.

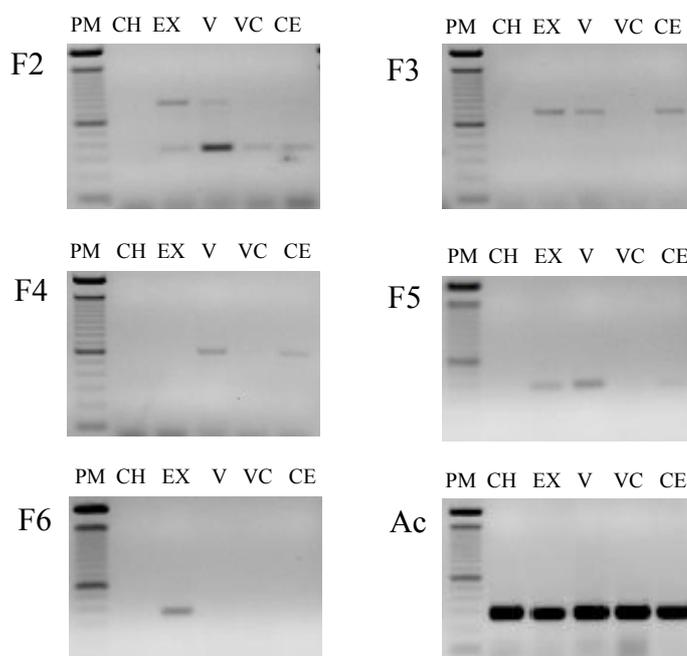


Figura 12- RT-PCR da planta AC3. Combinações dos pares de oligos F2, F3, F4, F5 e F6. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Com esses resultados pode-se verificar que as plantas AC apresentam resultados bem diferentes quando comparados entre si. Para a planta AC1 a expressão do gene da cafeína sintase oscila entre as fases de desenvolvimento estudadas de forma bastante irregular e aparece com maior intensidade no fruto cereja. Além disso, não há amplificação de transcritos com o par F6 e pode ser observado o fragmento extra de

350 pb. Já para a planta AC2 o padrão de expressão se mantém praticamente o mesmo em todos os pares de oligos, com exceção do par F2, onde é observado um menor acúmulo de transcritos e também apresenta o fragmento menor de 350 pb para esse par de oligos. Quando compara-se AC1 e AC3 verifica-se que essas duas plantas apresentaram um padrão de expressão do gene da cafeína sintase muito semelhante durante o desenvolvimento do fruto. Há expressão gênica nas fases intermediárias e na fase final de desenvolvimento. A planta AC3 apresenta amplificação de transcritos extra para o par F2, como observado em MN (Figura 9). No entanto, em AC3 esse transcrito é observado desde as fases iniciais de desenvolvimento.

KOSHIRO et al., (2006) observaram que transcritos correspondentes à enzima cafeína sintase foram observados em todas as fases de desenvolvimento de frutos da cultivar Mokka, havendo uma diminuição da expressão na última fase de desenvolvimento (cereja), quando comparado com as outras fases estudadas.

Esses pesquisadores também avaliaram esse gene em sementes e em pericarpo no estágio de desenvolvimento expansão. Eles observaram que a atividade desse gene se apresentou alta tanto nas sementes como no pericarpo.

Esses pesquisadores analisaram o gene cafeína sintase também em *C. canephora*, eles verificaram que na primeira fase de desenvolvimento estudada (ovário), não foi observada expressão gênica, porém nas demais fases de desenvolvimento foi detectada a amplificação do gene de mesma intensidade.

Com os resultados obtidos neste estudo pode-se observar que existe uma alteração no último passo da via biossintética da cafeína em dois níveis. O primeiro está associado à irregularidade da expressão do gene da cafeína sintase. O segundo é o polimorfismo dos transcritos observados nessas plantas, provavelmente resultantes de alterações no processamento do transcrito e/ou da proteína fazendo com que esta se apresente inativa (SILVAROLLA et al., 2004).

#### **4.4 Expressão dos Genes da Via Biossintética de Cafeína em *C. canephora* e *C. eugenioides***

Avaliou-se a expressão dos genes da via biossintética da cafeína nas espécies *C. eugenioides* e *C. canephora* para verificar se a alteração na expressão gênica da cafeína sintase também ocorria nessas espécies que originaram *C. arabica*.

A expressão dos genes da via biossintética da cafeína foram avaliados em frutos de *C. eugenioides* nos estádios expansão e cereja.

Quando os frutos foram avaliados para a expressão do gene metilxantosina sintase, foi verificado que não houve expressão de transcritos nos dois estádios de desenvolvimento avaliados, como pode ser verificado na figura 13. Isto sugere que o oligo não foi específico para *C. eugenoides*.

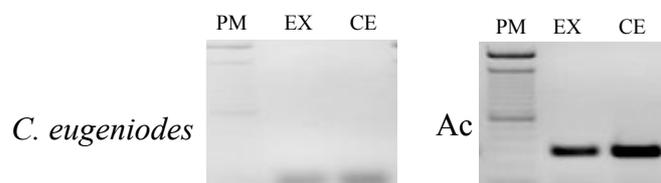


Figura 13- Amplificação de transcritos do gene da metilxantosina sintase em *C. eugenoides*, a partir de RT-PCR., nas fases expansão (EX) e cereja (CE). Ac- actina usada como controle.

Para o gene da teobromina sintase, foi verificado um acúmulo de transcritos nas duas fases de desenvolvimento estudadas, como pode ser observado na figura 14, indicando a especificidade deste oligo também para *C. eugenoides*.

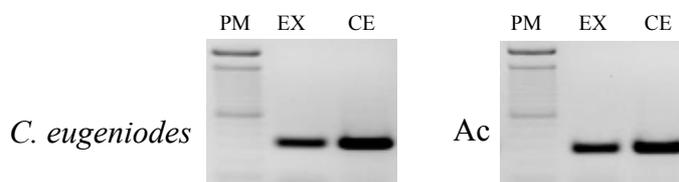


Figura 14- Amplificação de transcritos de teobromina sintase em *C. eugenoides*, a partir de RT-PCR, nas fases expansão (EX) e cereja (CE). Ac- actina usada como controle.

Nas análises utilizando as combinações dos pares de oligos da cafeína sintase, foi observado um acúmulo de transcritos no fruto cereja para todos os pares avaliados, com exceção do par F6, como pode ser verificado na figura 15.

Com o par de oligos F2 pode-se verificar que houve uma amplificação de transcritos de tamanho esperado (833pb) e uma outra amplificação de tamanho menor de cerca de 350 pb, padrão similar ao observado anteriormente em Mundo Novo. No entanto, é importante ressaltar que a intensidade de expressão do transcrito de 350 pb é maior do que a observada para o transcrito de 850 pb. Este padrão de amplificação é similar ao observado em frutos AC1. Além disso, para o par de oligos F6, foi verificado

que o oligo se anelou fracamente, sugerindo uma mutação semelhante a mutação que ocorre na planta AC1.

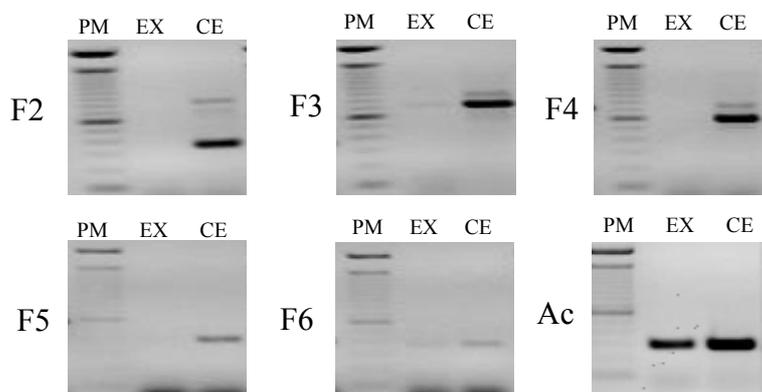


Figura 15- Amplificação de transcritos de Cafeína sintase em *C. eugenioides* utilizando as combinações dos pares de oligos F2, F3, F4, F5, F6, nas fases expansão (EX) e cereja (CE) Ac- actina usada como controle.

Para *C. canephora*, foram avaliadas as fases verde, verde-cana e cereja.

Quando esses frutos foram avaliados usando o gene metilxantosina, foi verificado uma alta intensidade na expressão dos transcritos em todas as fases estudadas, como pode ser verificado na figura 16.

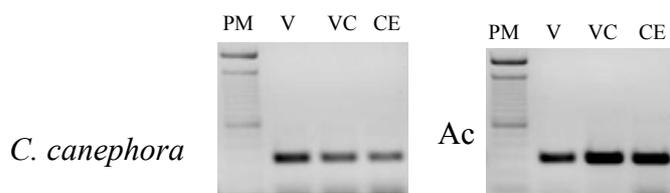


Figura 16- Amplificação de transcritos de metilxantosina sintase em *C. canephora*, a partir de RT-PCR. VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

A avaliação da expressão dos transcritos utilizando o oligo teobromina sintase, também foi observada alta intensidade em todas as fases de desenvolvimento estudadas, podendo ser visualizado na figura 17.

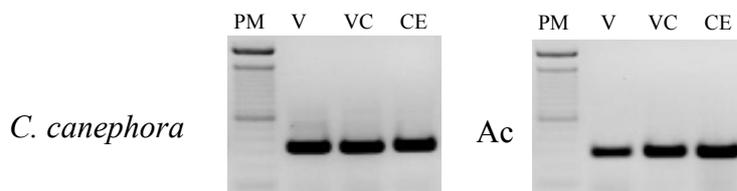


Figura 17- Amplificação de transcritos de teobromina sintase em *C. canephora*, a partir de RT-PCR. VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Os frutos também foram avaliados utilizando as combinações de oligos do gene cafeína sintase. A expressão dos transcritos pode ser observada na figura 18, onde podemos verificar alta intensidade dos pares F3 e F4. Nos pares F5 e F6, pode ser observado o mesmo padrão de expressão gênica. O par F2 apresentou fraca expressão de transcritos, porém não apresentou amplificação do transcrito extra de 350 pb.

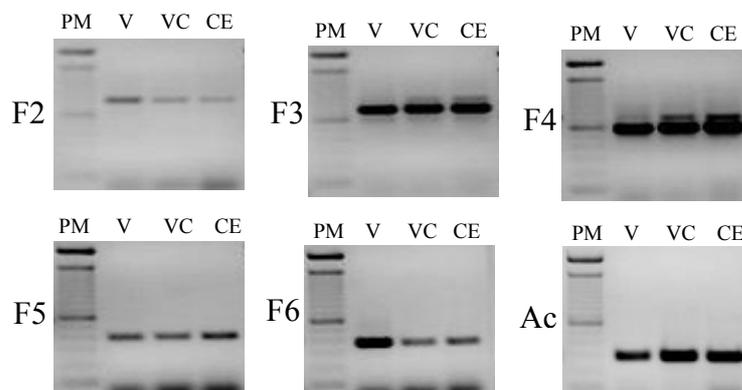


Figura 18- Amplificação de transcritos de cafeína sintase em *C. canephora* utilizando as combinações dos oligos F2, F3, F4, F5, F6, a partir de RT-PCR. VE- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Com a apresentação desses resultados podemos observar que em *C. canephora* a expressão dos genes envolvidos na via biossintética da cafeína é comum a todas enzimas e em todas as fases de desenvolvimento estudadas.

Analisando o conjunto de resultados obtidos para a amplificação de transcritos do gene cafeína sintase nos diferentes genótipos é possível elaborar uma hipótese para explicar a ausência de cafeína em frutos AC.

A síntese de cafeína em frutos de *C. arabica* ocorre ao longo do desenvolvimento do fruto, a partir do estágio expansão. Nos estádios finais, como verde-cana a cereja, no entanto apesar de haver acúmulo de cafeína nos frutos, não há atividade da enzima cafeína sintase (SUZUKI & WALLER, 1984). Neste estudo, foram detectados transcritos do gene cafeína sintase em todos os estádios de desenvolvimento. No entanto, genótipos com teores normais de cafeína, como *C. arabica* cultivar Mundo Novo apresentaram um transcrito extra apenas nos estádios finais. Também, a espécie *C. eugenioides*, que possui baixos teores de cafeína no grão, apresenta um acúmulo expressivo deste transcrito extra em frutos cereja. Já os resultados das plantas AC são variáveis: a planta AC1 apresenta preferencialmente transcritos menores do que o esperado em frutos cereja; as plantas AC2 e AC3 apresentam os dois transcritos em todos os estádios avaliados.

Como as plantas AC não sintetizam cafeína em grãos, e plantas de MN e *C. eugenioides* não sintetizam cafeína nos estádios finais de desenvolvimento, pode-se então associar a presença do transcrito de 350 pb com a inibição da síntese de cafeína, provavelmente a partir da inibição da atividade da enzima cafeína sintase. As bases moleculares desta inibição podem estar associadas a um processamento alternativo do transcrito da cafeína sintase. Neste caso, nos mutantes AC este processamento alternativo poderia estar ativado continuamente em decorrência de uma possível deleção da região F6.

A ocorrência de processamento alternativo como mecanismo para o controle da atividade gênica já foi descrita em plantas. O loco FCA, envolvido no florescimento em *Arabidopsis* é um exemplo (QUESADA et al., 2005). Estudos demonstraram que transcritos de FCA podem sofrer processamentos distintos e originar três tipos de transcritos, sendo apenas um deles funcional (QUESADA et al., 2005).

No caso dos mutantes AC análises da sequência dos transcritos são necessários para confirmar se ambos são resultados de processamento alternativo. Se isso for comprovado, estudos bioquímicos irão mostrar como as possíveis proteínas resultantes destes transcritos interagem para bloquear a síntese de cafeína.

#### **4.5 Expressão dos Genes de Desenvolvimento e Maturação do Fruto**

Um aspecto importante a ser considerado nos mutantes AC é o padrão de desenvolvimento e maturação dos frutos. Uma vez que as características de uniformidade de maturação e qualidade química das sementes são de grande valor agrônômico, para a utilização de plantas AC em programas de melhoramento é fundamental avaliar estes aspectos.

A partir de cruzamentos entre plantas AC e cultivares comerciais mostram que a taxa de pegamento destes cruzamentos é baixa (SILVAROLLA, comunicação pessoal). Além disso, autofecundações destas plantas resultam em uma produção significativa de frutos chochos. Estes resultados preliminares mostram que o desenvolvimento de frutos em plantas AC está alterado.

Análises da expressão de genes relacionados ao processo de desenvolvimento dos frutos foram realizadas em plantas da cultivar Mundo Novo e em plantas AC1, AC2 e AC3 com o objetivo de verificar se as rotas de crescimento, maturação e amadurecimento não foram afetadas por causa dos baixos níveis de cafeína.

Assim, para uma caracterização prévia do desenvolvimento de frutos das plantas AC, a expressão de genes-chave relacionados com os processos de embriogênese e maturação de frutos foi avaliada. Os genes selecionados foram: *ACC oxidase*, *Never ripe*, *Lea*,  *$\alpha$ -galactosidase*, *endo- $\beta$ -mannanase*, *Caffeoyl-CoA metiltransferase*.

A enzima ACC oxidase catalisa o último passo da biossíntese do etileno. Este fitormônio está associado a vários eventos fisiológicos e etapas de desenvolvimento das plantas. Sua atividade pode aumentar durante eventos do desenvolvimento vegetal, como na fase de maturação de alguns frutos, principalmente nos frutos climatéricos, que são aqueles que apresentam um aumento da produção de etileno no final do seu desenvolvimento (CASTRO et al., 2005). Isso indica que o café possui picos climatéricos e por isso pode ser considerado por alguns autores como fruto climatérico.

A expressão do gene da *ACC oxidase* foi avaliada nas plantas AC1, AC2 e AC3. Os resultados desta análise são apresentados na figura 19. Na planta AC2 foi observado um acúmulo de transcritos nos estádios iniciais de desenvolvimento e um decréscimo destes. Esse resultado sugere uma possível deficiência na síntese de etileno nas fases finais do desenvolvimento.

As plantas AC1 e AC3 apresentaram um resultado diferente, como pode ser observado na figura 19. O acúmulo de transcritos aumentou conforme o amadurecimento do fruto, podendo ser observado alta expressão do gene nos frutos cereja. Esse resultado indica que esses frutos possuem a fase de amadurecimento no

período esperado, pois a produção de etileno é observada nas fases finais de desenvolvimento dos frutos.

PEREIRA et al., (2005) verificaram um rápido crescimento na produção de etileno em frutos verde-cana, após o final da formação do endosperma, com um decréscimo nos frutos cereja, indicando uma fase climatérica na maturação. Esses pesquisadores usaram oligonucleotídeos heterólogos, previamente descritos para clonar o gene da ACO (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase) de *C. arabica* (*Ca-ACO*). A sequência de nucleotídeos, assim como a de aminoácidos, demonstrou alta similaridade com ACO de frutos climatéricos. O padrão de transcrição gênica de *Ca-ACO* em frutos em diferentes fases de maturação e em diferentes tecidos foi analisado em Northern Blots. Os frutos verdes apresentaram a menor transcrição de *Ca-ACO*, com um aumento a partir dos frutos verde-cana, havendo pouca alteração nas etapas subsequentes de maturação, sugerindo a atuação de mecanismos de controle pós-transcricionais.

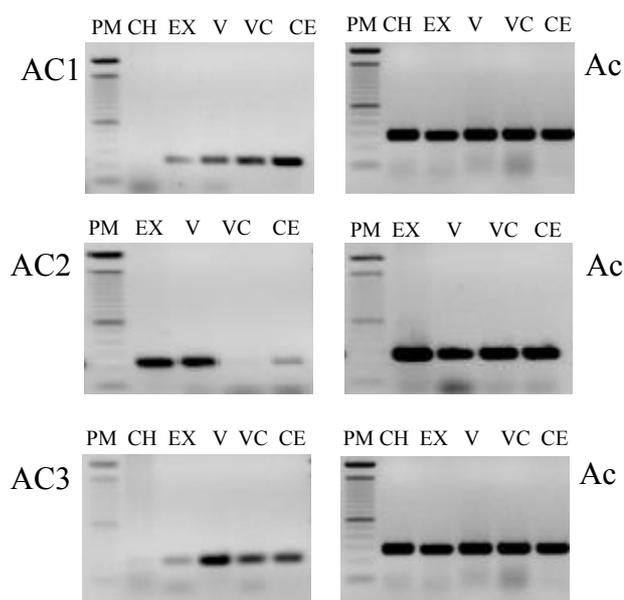


Figura 19- Avaliação de transcritos de *ACC oxidase*, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Um dos genes responsáveis pelo processo de maturação do fruto em diferentes espécies é o *never ripe*. Este gene codifica um receptor de etileno. A expressão do gene *never ripe* que ocorre durante o amadurecimento do fruto é controlado pelo hormônio

etileno. O mutante do gene *never ripe* prejudica o amadurecimento do fruto por ser insensível ao hormônio etileno. (WILKINSON et al., 1995).

As análises da expressão deste gene em plantas AC são apresentadas na figura 20.

Em AC1, observa-se um maior número de transcritos na fase verde com um declínio na fase cereja. Em AC2, é observada expressão ao longo do desenvolvimento. Na planta AC3, verifica-se maior número de transcritos nas fases verde e cereja e um leve declínio na fase verde-cana.

Os resultados obtidos nas plantas AC1 e AC3 indicam que a expressão do gene *never ripe* ocorre nas mesmas fases em que a expressão de *ACC oxidase* é observada (Figura 19), sugerindo que a maturação nestes frutos é semelhante genótipos melhorados. Por outro lado, a expressão de *never ripe* ao longo do desenvolvimento dos frutos AC2 indica que este passo na transdução de sinal está ativado, apesar de uma possível deficiência de etileno decorrente da ausência de expressão da enzima *ACC oxidase* nas fases finais de maturação (Figura 19).

Em MN, como já foi feita seleção para restringir alguns genes de interesse, a expressão de transcritos do gene *never ripe* ocorre nas últimas fases de desenvolvimento, como é natural por ser um gene responsável pelo amadurecimento do fruto (dados não mostrados).

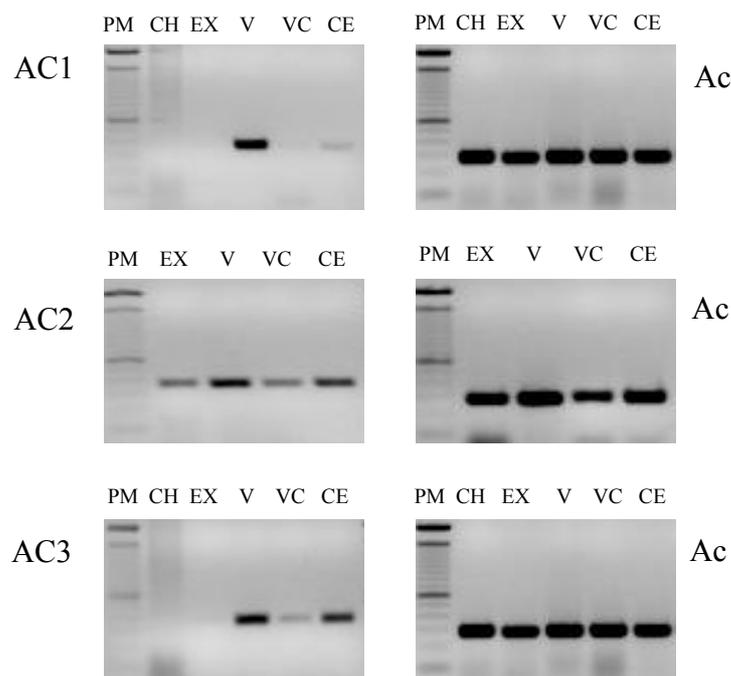


Figura 20- Avaliação de transcritos de *never ripe*, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Uma família de genes importante associada com a maturação de frutos é a família *Lea*. Os genes da família *Lea* codificam para um grupo diverso de proteínas envolvidas com a proteção à dessecação e induzidas durante o estágio de pós-absorção do desenvolvimento tardio do embrião. Os genes *Lea* também são induzidos por estresse hídrico, osmótico e estresse a baixas temperaturas (ZEGZOUTI et al., 1997).

Os resultados da expressão de um *Lea* gene podem ser observados na figura 21. Por ser uma proteína relacionada com maturação do fruto, esta se apresentou de forma semelhante ao esperado. Pode-se observar que a partir das fases finais de desenvolvimento a enzima se expressa com maior intensidade.

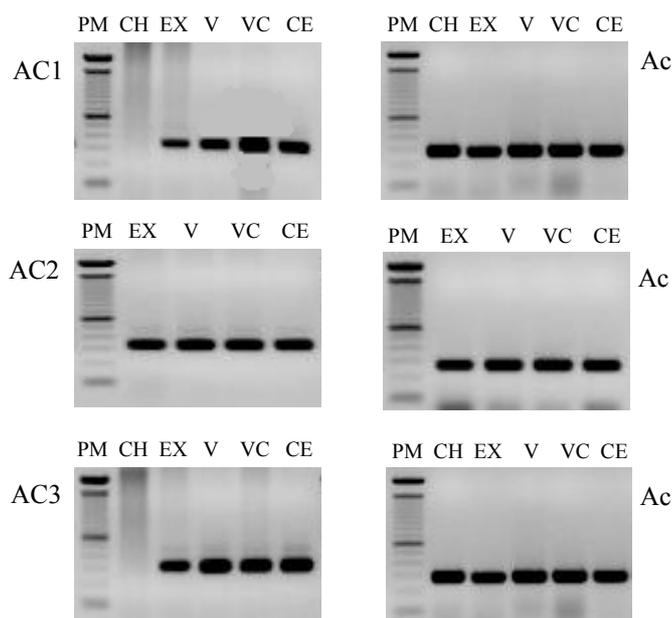


Figura 21- Avaliação de transcritos de *late maturation accumulated* a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Outro gene avaliado é o que codifica a enzima  $\alpha$ -galactosidase. Esta é uma das três principais enzimas envolvidas na modificação ou degradação da parede celular. Além disso, está envolvida na síntese de carboidratos em frutos e está presente durante o processo de desenvolvimento e maturação dos frutos (ZHU & GOLDSTEIN, 1994).

A sequência utilizada neste estudo apresenta 97% de homologia com a sequência descrita por ZHU & GOLDSTEIN, 1994.

Os resultados da expressão de  $\alpha$ -galactosidase nas plantas AC estão representados na figura 22. Em AC1 observa-se apenas um acúmulo de transcritos na fase verde. Em AC2, são observados transcritos em todas as fases de desenvolvimento estudadas, sendo observado um maior acúmulo do transcrito na fase verde. Em AC3 pode ser observado acúmulo de transcritos a partir da fase verde, com um declínio na fase verde-cana e uma baixa expressão no fruto cereja.

MARRACINI et al., (2001), avaliando tanto a expressão do gene quanto a atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase em frutos de *C. arabica* variedade Caturra, observaram uma atividade máxima da enzima na fase verde-cana. O pico de acúmulo de transcritos foi observado também neste estágio, sendo que em frutos maduros não foi detectada expressão de  $\alpha$ -galactosidase.

GASPARI-PEZZOPANE et al., (2005) avaliaram  $\alpha$ -galactosidase em cultivar MN e observaram acúmulo de transcritos a partir de frutos em expansão, e esta se manteve presente até a fase de fruto cereja.

Estes resultados indicam genótipos com diferentes padrões de acúmulo de açúcares durante o desenvolvimento do fruto, resultando em possíveis diferenças entre as plantas AC e as cultivares de *C. arabica* com relação à composição final de carboidratos dos frutos.

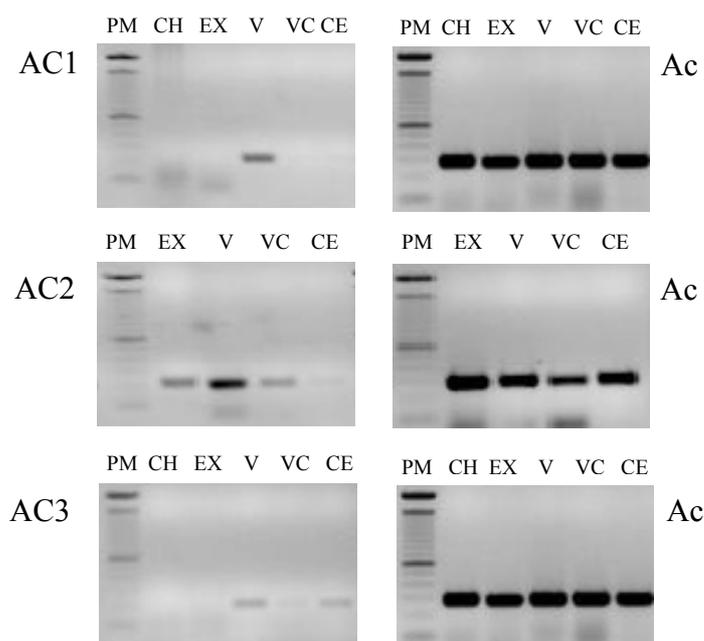


Figura 22- Avaliação de transcritos de  $\alpha$ -galactosidase, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Outro gene avaliado é o que codifica a enzima *endo- $\beta$ -mannanase*. A atividade desta enzima é um dos principais passos no metabolismo da parede celular de mananos (grupo de carboidratos) durante a germinação do fruto do café. A sequência do gene *endo- $\beta$ -mannanase* utilizado neste estudo apresenta 60% de homologia com a descrita por Marraccini et al., (2001).

A expressão do gene foi observada em frutos AC1, AC2 e AC3 (Figura 23). Em todas as plantas foi verificada um acúmulo de transcritos a partir do estágio de desenvolvimento expansão.

Em análises anteriores, MARRACINI et al., (2001) observaram um padrão de expressão distinto para esse gene, e a expressão de *endo- $\beta$ -mannanase* foi detectada somente em sementes após a germinação na variedade Caturra.

GASPARI-PEZZOPANE et al., (2005) fizeram análises semelhantes utilizando a cultivar Mundo Novo e observaram a presença de transcritos deste gene em todas as fases de desenvolvimento estudadas.

No presente trabalho, pode ser observado que a expressão desse gene ocorre ao longo da maturação do fruto. Verifica-se que o padrão de expressão dos transcritos do gene da *endo- $\beta$ -mannanase* em plantas AC obedecem o mesmo padrão apresentado pela cultivar MN (dados não mostrados).

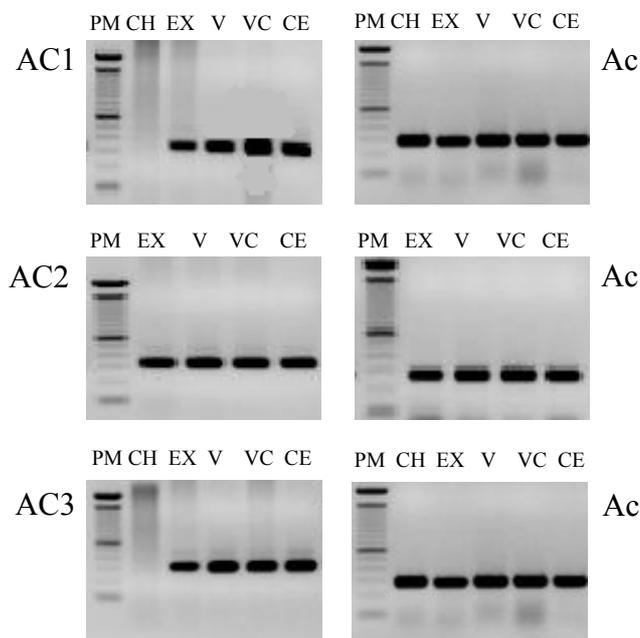


Figura 23- Avaliação de transcritos de *endo- $\beta$ -mannanase*, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

A *PAL* é uma enzima precursora da síntese de compostos fenólicos, incluindo flavonóides, coumarins, hidroxiquinnamóil ésteres (HAHLBROCK & SUHEEL, 1989). Sua atividade é aumentada por fatores ambientais, tais como: baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por agentes patogênicos diversos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Os resultados da análise de expressão do gene *PAL* (Phenilalanine liase) estão apresentados na figura 24.

Nesse trabalho pode-se verificar que houve diferença na expressão do gene *PAL* entre as plantas AC. Estudos anteriores mostram que em MN não é observado acúmulo do transcrito nas fases iniciais de desenvolvimento, só nas fases finais (GASPARI-PEZZOPANE et al., 2007).

Na planta AC2 pode ser observado que houve expressão de transcritos em todas as fases de desenvolvimento (Figura 24). Já as plantas AC1 e AC3 apresentam picos de expressão na fase verde demonstrando um polimorfismo na expressão do gene *PAL* entre as plantas AC.

Estes resultados sugerem que a síntese e acúmulo de compostos fenólicos pode variar entre os frutos AC. Assim, a planta AC2 apresenta um padrão de expressão do gene *PAL* similar ao observado em frutos da cultivar Mundo Novo.

O gene *PAL* possui vários parálogos, os quais diferem tanto na sequência quanto na regulação da expressão (KAO et al, 2002; MAHESH et al., 2006). Os oligos da enzima *PAL* foram obtidos de ESTs presentes em apenas frutos do café. Existe a possibilidade do oligo ser específico para apenas um determinado parálogo expresso em frutos. Assim, uma hipótese para explicar a diferença observada na expressão do gene *PAL* é a que o gene avaliado possa estar submetido a diferentes controles genéticos entre as plantas AC.

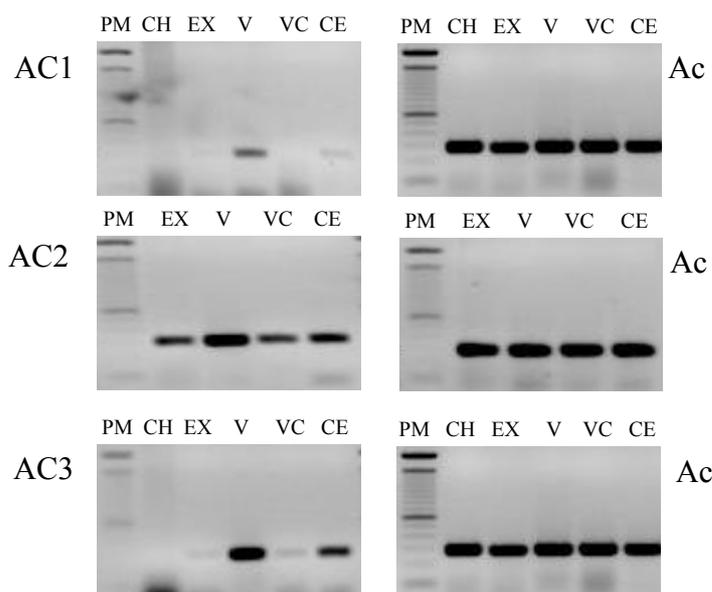


Figura 24- Avaliação de transcritos de fenilalanina-amônia-liase, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verdecana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Outro gene avaliado e relacionado com a síntese de compostos químicos no fruto é o que codifica a enzima *caffeoyl-CoA metiltransferase*. Os resultados desta análise estão presentes na figura 25. A enzima *caffeoyl-CoA metiltransferase* é precursora da síntese de ácidos clorogênicos.

Em MN foi observada a expressão desse gene em praticamente todas as fases de desenvolvimento estudadas, com exceção da fase verde.

Nas plantas AC foi observada expressão do gene em todas as fases de desenvolvimento (Figura 25).

Esses resultados mostram que as plantas AC apresentam um padrão de expressão similar a genótipos melhorados.

Um aspecto interessante é o declínio da expressão deste gene na fase cereja, em frutos AC1. Estudos anteriores indicam que a concentração de cafeína e ácidos clorogênicos, e especialmente os di-CQAs, é balanceada (Revisto em Baumann, 2006). Além disso, em espécies de *Coffea* sem cafeína, como *C. pseudozanguebaire* não foram detectados di-CQAs em frutos maduros. Em vista disso, pode-se sugerir que o declínio da expressão do gene da *caffeoyl-CoA metiltransferase* no mutante AC1 pode ser decorrente da ausência de cafeína nos frutos maduros.

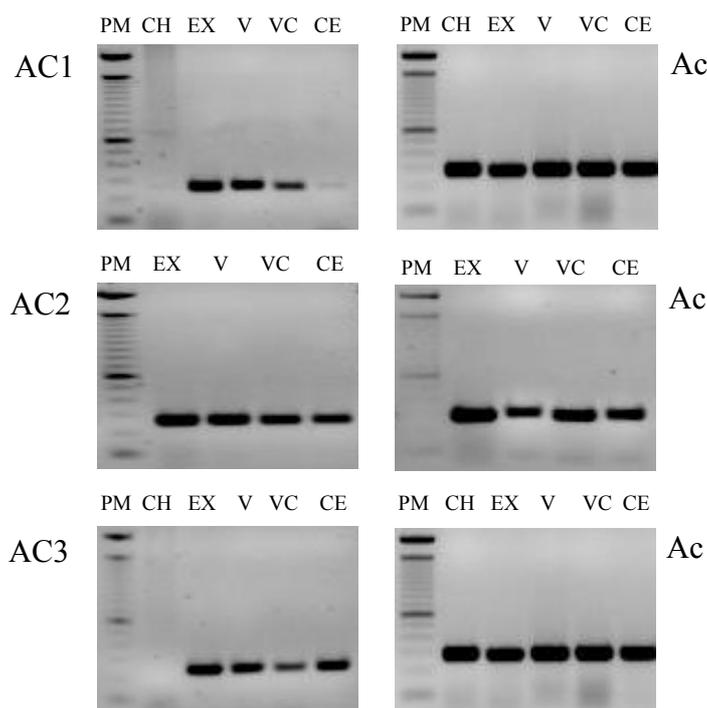


Figura 25- Avaliação de transcritos de *caffeoyl-CoA metiltransferase*, a partir de RT-PCR, nas plantas AC1, AC2 e AC3. CH- chumbinho, EX- expansão, V- verde, VC- verde-cana e CE- cereja. Ac- actina, controle positivo.

Neste estudo foi proposto caracterizar os frutos das plantas AC, a partir da avaliação da expressão de genes relacionados com a síntese de cafeína, açúcares e fenóis com a maturação de frutos.

A partir das análises de expressão dos genes envolvidos na síntese de cafeína pode-se concluir que estes não apresentam níveis de transcritos similares aos observados em cultivares comerciais para as enzimas metilxantosina sintase e teobromina sintase. Diferenças na uniformidade da expressão ao longo do desenvolvimento do fruto, como observado neste estudo, são esperados de se encontrar

entre genótipos selvagens e melhorados, uma vez que o processo de seleção leva à homozigose de grande parte dos locos, cujo resultado é uniformidade fenotípica.

Além disso, os resultados da expressão do gene cafeína sintase em frutos AC indicam que a ausência de cafeína nestas plantas pode ser resultado de alterações tanto no processo pós-transcricional quanto em deleções na região 5' do gene, como por exemplo o que ocorre com o par de oligos F6. Outra hipótese é que os mutantes AC2 e AC3, assim como a cultivar MN, fossem heterozigotos para o loco cafeína sintase devido a presença do transcrito extra de 350 pb. No entanto, como o transcrito menor foi observado apenas em algumas fases do desenvolvimento do fruto, esta hipótese é pouco provável.

As avaliações dos genes de maturação e de síntese de compostos sugerem que, de modo geral, estes processos metabólicos se desenvolvem em frutos AC de maneira similar aos genótipos cultivados. Novamente aqui as diferenças no padrão de expressão são esperadas entre acessos selvagens e cultivados. No entanto, resultados da expressão da enzima *ACC oxidase*, sugerem que a maturação em AC2 pode estar alterada, levando à precocidade de maturação.

Considerando-se estes resultados, pode-se sugerir que o programa de melhoramento concentre esforços para transferência da característica de ausência de cafeína, na planta AC1 uma vez que esta apresenta evidências de maturação regular, acúmulo de outros compostos químicos e de ser homozigota para a mutação no gene cafeína sintase.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

a) As plantas AC acumulam transcritos correspondentes aos três genes da via biossintética da cafeína ao longo da maturação do fruto.

b) Transcritos correspondentes ao gene da cafeína sintase, apresentam deleções na região 5' nas plantas AC. Esta deleção pode resultar na síntese de uma proteína alterada, não-funcional.

c) A partir do padrão de expressão de genes específicos, sugere-se que a maturação dos frutos AC1 e AC3 se apresentem de acordo com o padrão esperado.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2006  
[http://www.abic.com.br/arquivos/abic\\_prevconab\\_Isafra0607\\_28ago06.pdf](http://www.abic.com.br/arquivos/abic_prevconab_Isafra0607_28ago06.pdf), (29 de Novembro de 2006).

ABIC- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2007  
<http://www.abic.com.br/estatisticas.html>, (10 de Fevereiro de 2007).

AGUIAR, A.T.E. Descritores para caracterização de cultivares e linhagens de café tipo arábica. 2001. xvi, 98 f. Tese (Mestrado). Instituto Agronômico de Campinas. 2001.

AGUIAR, A.T.E.; FAZUOLI, L.C.; SALVA, T.J.G.; FAVARIN, J.L. Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea canephora*. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, 577-582 p., 2005.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MEYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 5, 403-410 p. 1990.

ANTHONY, F. Les ressources génétiques des caféiers. Collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. Thèses et Documents Microfichés TDM n° 81, Orstom Éditions. 320p. 1992.

ASHIHARA, H. & CROZIER A. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. **J. Agric. Food Chem.** v. 8, 3425-3431 p., 1999.

BAUMANN, T.W. Some thoughts on the physiology of caffeine in coffee – and a glimpse of metabolite profiling. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, 243-251 p., 2006.

BAUMANN, T.W., KOETZ, R.; MORATH, P. N-Methyltransferase activities in suspension cultures of *Coffea arabica* L. **Plant Cell Rep.**, v. 2, 33-35 p., 1983.

BRIDSON, D. M. Studies in Coffea in Psilanthus (Rubiaceae Sub fam. Cinchonoideae) for part 2 of Flora Tropical East Africa: Rubiaceae. **Kew Bulletin** v. 36, n. 4, 817-859 p., 1982.

BRIDSON, D. M. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe *Coffeae*). **Kew Bulletin**, 42(2):453-460, 1987.

BRADBURY, A.G.W. Carbohydrates, in R.J. Clarke, O.G. Vitzthum (eds.), *Coffee: recent developments*, Blackwell Science, Oxford, 1-17 p. 2001.

BRIDSON, D.M. & VERDCOURT, B. “Flora of tropical East África – Rubiaceae (Part 2)”, **Poehill R. M.** (eds), 727 p. 1988.

BRIDSON, D.M. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe *Coffeae*). **Kew Bulletin**, 42, v. 2, 453-460 p., 1994.

CARVALHO, A., MÔNACO, L. C. Transferência do fator caturra para o cultivar ‘Mundo Novo’ de *Coffea arabica*. *Bragantia*, Campinas, 31: 379-399, 1972.

CARVALHO, A., ANTUNES FILHO, H., MENDES, J.E.T., LAZZARINI, W., REIS, A.J., ALOISI SOBRINHO, J., MORAES, M.V., NOGUEIRA, R.K., ROCHA, T.R. Melhoramento do cafeeiro. XIII - Café Bourbon Amarelo. *Bragantia*, Campinas, v.6, n.1, p.411-454, 1957.

CARVALHO, A., FAZUOLI, L.C., MAZZAFERA, P. Melhoramento do cafeeiro. XLII. Produtividade de progênies derivadas de hibridação dos cultivares Laurina e Mundo Novo. *Bragantia*, Campinas, v.47, n.2, p.213-222, 1988.

CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O.; LIMA, M.M.A. Aspectos genéticos do cafeeiro. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, 135-183 p. 1991.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C. Café. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P.(Eds). O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico. Campinas: Instituto Agronômico, v. 1, 29-76 p., 1993.

CARVALHO, A.; SONDAHL, M.R.; SLOMAN, C. Teor de cafeína em seleções de café. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 10., Poços de Caldas, **Anais. IBC-GERCA**, p. 111-113, Rio de Janeiro, 1983.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. Manual de Fisiologia Vegetal: Teoria e Prática. Ed. Agronômica Ceres, 650p. Piracicaba. 2005.

CHARRIER, A. La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). **Mémoires ORSTOM**, Paris, n°87, 223p, 1978.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botical classi

Froehner. Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo. v. 20, n. 34. 1961.

CROSS, J. Implications phylogénétiques des variations de l'ADN chloroplastique chez les caféiers (genres *Coffea* L. Et *Psilanthus* Hook. F.). 1994. Tese (Doutorado) – Université Montpellier II, Montpellier, 1996.

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

DESCOBERTA de variedade de café sem cafeína pode revolucionar o mercado. O Agrônômico, v.55, n.2, p.38, 2003.

DENTAN, E. Etude microscopique du développement et de la maturation du grain de café. Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee, Lomé, International Scientific Association on Coffee, Paris, 381-198 p. 1985.

EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). 2001. [http://www22.sede.embrapa.br/cafe/consorcio/home\\_4.htm](http://www22.sede.embrapa.br/cafe/consorcio/home_4.htm), (02 de Dezembro de 2006).

ENCARNAÇÃO, R.O.; LIMA, D.R. Café & Saúde humana. **Documentos 1**. Embrapa, 1-64 p. Brasília, 2003.

FARAH, A. & DONANGELO, C.M. Phenolic compounds coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v. 18(1). 23-26p. 2006.

FAZUOLI, L. C. Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência a *Hemileia vastatrix*. Campinas, 322 p. (Tese de Doutorado-Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP). 1991.

FAZUOLI, L. C.; MEDINA FILHO. H. P.; GUERREIRO FILHO, O.; GONÇALVES, W.; SILVAROLA, M. B.; LIMA, M. M. A.de; CARVALHO, A. Cultivares de Café. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. (**Fôlder**).

FAZUOLI, L.C., MEDINA FILHO, H.P., GONÇALVES, W., GUERREIRO FILHO, O., SILVAROLLA, M.B. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônômico de Campinas. In: Zambolim, L. (Ed). O estado de arte de tecnologias na produção de café. Viçosa, p. 163-215, 2002.

FAO Report: Coffee mission to Ethiopia 1964-1965 (Food and Agriculture Organization, Rome). 178p. 1968.

FERRÃO, R.G., FONSECA, A.F.A., FERRÃO, M.A.G., DE MUNER, L.H., VERDIN FILHO, A.B., VOLPI, P.S., MARQUES, E.M.G., ZUCATELI, F. Café Conilon. Técnicas de Produção com variedades melhoradas. 2ª. Ed. Vitória (ES): Incaper, Circular Técnica 3-I. 60p., 2004.

GASPARI-PEZZOPANE, C; MALUF, M.P. ; PINTO, F.O. Expressão gênica diferencial em frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes estádios de desenvolvimento e maturação. VI Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil. Londrina. v. CD. 2005.

HAHLBROCK, K. e SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Ann Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Bio.** v. 40, 347-369p. 1989.

HIGGINS, D.; THOMPSON J.; GIBSON T.; THOMPSON J. D.; HIGGINS D. G.; GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22, p.4673-4680, 1994.

HUANG, T.H.; YANG, R.S.; HSIEH, S.S.; LIU, S.H. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young wister rats. **Bone**, New York, v. 30, n. 1, 293-299 p. 2002.

KAO, Y-Y.; HARDING S.A.; TSAI, C-J. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. **Plant Physiology**. v. 130, 796-807 p. 2002.

KATZ, S.N. Decaffeination of coffee. In: Colloque International Sur La Chimie Des Cafés Verts, Torréfiés Et Leurs Dérivés, **Paris, Association Scientifique Internationale du Café**, London, v. 9, 295-302 p. 1980.

KING, C.J. The utility of chemical engineering principles in coffee processing technology. In: Colloque International Sur La Chimie Des Cafés Verts, Torréfiés Et Leurs Dérivés, **Paris, Association Scientifique Internationale du Café**, London, v. 9, 237-250 p. 1980.

KOSHIRO, Y.; ZHENG, X.Q.; WANG, M.L.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. **Plant Science**. 171, 242-250 p. 2006.

KRUG, C.A., MENDES, J.E.T., CARVALHO, A. Taxonomia de *Coffea arabica* L.: descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo. Campinas, Instituto Agrônômico, 1939. 57p. (Boletim técnico, 62).

LEVY, F.A., BOGDAN, I., FERRAZ, J.T., DELLA TORRE, M.A. & CARVALHO, A. Precocidade de maturação no cafeeiro. 15º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Maringá, Paraná, Brasil, 26-29. **Instituto Brasileiro do Café** (Rio de Janeiro), p.155-157, 1989.

LIMA, D.R. Cuidado!!! O popular café e a poderosa mulher...podem fazer bem à saúde. Petrópolis: Medikka Ed. Científica, 111 p. 2001.

LIN, C.; MUELLER, L.A.; Mc CARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PÉTIARD, V.; TANKSLEY, S. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theor. Appl. Genet.** v. 112, 114-130 p. 2005.

MAHESH,V.; RAKOTOMALALA, J.J.; LE GAL, L.; VIGNE, H.; KOCHKO, A.; HAMON, S.; NOIROT, M.; CAMPA, C. Isolation and genetic mapping of a *Coffea canephora* phenylalanine ammonia-lyase gene (*CcPAL1*) and its involvement in the accumulation of caffeoyl quinic acids. **Plant Cell Rep.** v. 25, 986-992 p. 2006.

MARRACCINI, P.; ROGERS, W.J.; ALLARD, C.; ANDRÉ, M.L; CAILLET, V.; LACOSTE, N.; LAUSANNE, F.; MICHAUX. S. Molecular and biochemical characterization of endo- $\beta$ -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. **Planta**. v. 214, 296-308p. 2001.

MAZZAFERA, P. & A. CARVALHO A cafeína do café. **Documentos IAC**. 25: p. 1-22. 1991.

MAZZAFERA, P. & A. CARVALHO Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea L.*) by interspecific hybridization. **Euphytica**,. 59: p. 55-60, 1992.

MAZZAFERA, P., A. CROZIER; G. SANDBERG Studies on the metabolic control of caffeine turnover in developing endosperms and leaves of *Coffea arabica* and *Coffea dewevrei*. **J. Agric. Food Chem.** 42(7): p. 1423, 1994.

MAZZAFERA, P.; SOAVE, D.; ZULLO, M.A.T.; GUERREIRO-FILHO, O. Oil content of green beans from some coffee species. *Bragantia*, v. 57, n. 1, 1998.

MEDINA FILHO, H.P., CARVALHO, A., MEDINA, D.M. Germoplasma de *C. racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. *Bragantia*, Campinas, v.36, p.XLIII-XLVI, 1977.

MENDES, J.E.T., BRIEGER, F.G., KRUG, C. A., CARVALHO, A. Melhoramento de *Coffea arabica* L. var Bourbon. Estudo das produções individuais de 1107 cafeeiros no período de 1933 a 1939 e resultados parciais de algumas de suas progênies. *Bragantia*, Campinas, v.1, n.1, p.1-191, 1941.

MENDES, A.J.T. Cytological observations in *Coffea* VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. **Am. J. Bot.** v. 28, 784-789 p. 1942.

MICHAUD, D.S.; GIOVANNUCCI, E. ; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A.; FUCHS, C.S. Coffee and alcohol consumption and risk of pancreatic cancer in two prospective united states cohorts. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 10, n. 5, 429-437 p. 2001.

MICHELS, K.B.; HOLMBERG, L. ; BERGKVIST, L.; WOLK, A. Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of swedish women. **Annals of Epidemiology**, New York, v. 12, 21-26 p. 2002.

MIZZUNO, K.; OKUDA, A.; KATO, M.; YONEYAMA, N.; TANAKA, H.; ASHIHARA, H.; FUJIMURA, T. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). **FEBS Letters** 534: p. 75-81, 2003.

MOISYADI, S., K.R. NEUPANE; J.I. STILES Cloning and characterization of a cDNA encoding xanthosine-N<sup>7</sup>-methyltransferase from coffee (*Coffea arabica*). **Acta Hort.**, 461: p. 367-377. 1998.

OGAWA, M.; HERAI, Y.; KOIZUMI, N.; KUSANI, T.; SANO, H. 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 276, n° 11, p. 8213-8218, 2001.

OGITA, S., et al., *Producing decaffeinated coffee plants*. **Nature**, 423(6942): p. 823-823, 2003.

ORMOND, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FILHO, P.F. Café: (Re) Conquista dos Mercados. BNDS Setorial, Rio de Janeiro, n° 10, p. 3-58, 1999.

PAILLARD M, LASHERMES P AND PÉTIARD V. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theor Appl Genet*, 93, p. 41-47, 1996.

PEREIRA, L.F.P.; GALVÃO, R.M.; KOBAYASHI, A.K.; CAÇÃO, S.M.B.; VIEIRA, L.G.E. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, n. 3, 283-289 p. 2005.

PEZZOPANE, J.R.M.; JÚNIOR, M.J.P.; THOMAZIELLO, R.A.; CAMARGO, M.B.P Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia**, v.62, n.3, p.499-505, Campinas, 2003.

QUESADA, V.; DEAN, C.; SIMPSON, G.G. Regulated RNA processing in the control of *Arabidopsis* flowering. **Int. J. Dev. Biol.** v. 49, 773-780 p. 2005.

RAKOTOMALALA, J.J.R. Diversité Biochimique des caféiers : Analyse des acides hydroxycinnamiques, bases puriques et diterpènes glycosidiques. Particularités des caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea* Chev.) **Collection TDM, ORSTOM** (ed), Paris, n°99, 213p, 1992.

ROBERTS, M.F. & WALLER, G.R. N-methyltransferases and 7-methyl-N<sup>9</sup>-nucleoside hydrolase activity in *Coffea arabica* and the biosynthesis of caffeine. **Phytochemistry**, 1979. **18**: p. 451-455, 1979.

SAKAMOTO, W.; NISHIHARA, J.; FUJIE, K. et al. Effect of coffee consumption on bone metabolism. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 28, 332-336 p. 2001.

SEGATTO, C. A revanche do cafezinho. *Época*, v. 1, n. 50, 2 p. 1999.

SECRETARIA de ESTADO da AGRICULTURA, ABASTECIMENTO e PESCA. <http://www.seag.es.gov.br/cafe.htm> (09 de Fevereiro de 2007).

SILVAROLLA, M.B., MAZZAFERA, P., LIMA, M.M.A. Caffeine content of Ethiopian *Coffea arabica* beans. **Gen. Mol. Biol**, 23(1), p. 213-215, 2000.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, London, v.429, p.826, 2004.

SIVETZ, M. Coffee and its influence on consumers: physiological effects of coffee and caffeine. In: DESROSIER, N. W., eds. *Coffee Technology*. Westport, **AVI Publishing**, p. 575-621, 1979.

SUZUKI, T.; WALLER, G.R. Biosynthesis and biodegradation of caffeine, theobromine, and theophylline in *Coffea arabica* L. Fruits. **J. Agric. Food Chem.** v. 32, 845-848 p. 1984.

TANAY, A. E. História do café no Brasil Imperial 1822-1972. Rio de Janeiro, Departamento Nacional do Café, v.3, 1939.

TANGO, J.S., CARVALHO, A. Teor de óleo e cafeína em variedades de café. *Bragantia*, Campinas, v.22, n.2, p.793-798, 1963.

TAVANI, A.; PREGNOLATO, A.; LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.; TALAMINI, R.; FRANCESCHI, S. Coffee and tea intake and risk of cancers of the colon and rectum: a study of 3,530 cases and 7,057 controls. **International Journal of Cancer**, New York, v. 73, 193-197 p. 1997.

TAVANI, A.; LA VECCHIA, C. Coffee and cancer: a review of edpidemiological studies. **European Journal of Cancer Prevention**, London, v. 9, n. 4, 241-256 p. 2000.

TAVANI, A.; GALLUS, S.; DAL MASO, L. ; FRANCESCHI, S.; MONTELLA, M.; CONTI, E.; LA VECCHIA, C. Coffee and alcohol intake and risk os ovarian cancer: an italian case-control study. **Nutrition and Cancer**, Nahwar, N. J. v. 39, n.1, 29-34 p. 2001.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)