



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Análise da expressão dos genes envolvidos na via de síntese de cafeína em plantas de café (*Coffea arabica*) apresentando diferentes teores de cafeína

Aline Gomes Tavares

Botucatu- SP

2010

Análise da expressão dos genes envolvidos na via de síntese de cafeína em plantas de café (*Coffea arabica*) apresentando diferentes teores de cafeína

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Botucatu (SP), para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mirian Perez Maluf

Botucatu-SP

2010

Dedicatória

A Bernadete.
Sem seu trabalho e dedicação
esta dissertação não existiria.

Agradecimientos

A Deus, sem Ele nada é possível;

Aos meus pais, Elisa e Antonio, e irmão André que sempre me deram todo apoio;

Aos meus avós pelo carinho e zelo;

A Mimi, que acreditou em mim;

Ao Ivan, que me deu a oportunidade do mestrado;

Ao Lucas, que aturou meus momentos de loucura, medo, terror, agonia, pânico e desespero sempre me apoiando;

Minha tia Fátima por tentar me avisar que vida de biólogo não é fácil, meu tio Wagner por sempre me apoiar nas loucuras e meus tios Zé e Tânia pelas batatadas ;

As meninas do lab: Rebeca a Dory, Dani a Pós- Dory e a Val, sem vocês para rir, chorar e tomar sorvete eu já teria desistido;

A mamãe Ju, Mari e Kênia apesar de pouco tempo um carinho enorme;

A todos do IAC, que sempre foram muito bons pra mim;

Ao Branda, que me apresentou a Mimi e me colocou no IAC;

As minhas amigas de São Paulo: Ka, Juju, Lalinha, Re, Loira e Roro. Agora vocês entendem os sábado que disse que não podia sair?

Ao Biro, muha, chu, Bê, Billy, Rex e Kennedy (in memorian) pelo amor incondicional e o carinho nos momentos tensos de redação;

Ao Felipe Rodrigues por ter complicado ainda mais a bioinformática;

Finalmente, a todos que tornaram possível este trabalho e auxiliaram de alguma forma.

Sumário

Lista de tabelas.....	11
Lista de figuras.....	13
Resumo.....	16
Abstract.....	19
1. Introdução.....	22
1.1 História do Café e sua Importância econômica.....	23
1.2 O café.....	24
1.3 Cafeína.....	25
1.4 Café descafeinado.....	28
1.5 Estudos genéticos e moleculares.....	31
2. Objetivos.....	36
3. Materiais e Métodos.....	38
3.1 Local de Experimentação.....	39
3.2 Material Vegetal.....	39
3.3 Data mining e desenho de primers específicos.....	40
3.4 Extração de RNA total de folhas e síntese de cDNA.....	41
3.5 Análise da expressão gênica.....	42
3.6 Race- PCR, clonagem e sequenciamento.....	44
3.7 Extração de DNA genômico de café.....	47
3.8 Southern Blot.....	48
4. Resultados.....	50

4.1. Data mining e desenho dos primers específicos.....	51
4.2 Extração e integridade do RNA total, síntese e Validação da integridade do cDNA.....	51
4.3 Presença/Ausência do transcrito menor extra em folhas.....	52
4.4 Análise da expressão do gene da cafeína sintase.....	54
4.5 Extração de DNA e Southern Blot.....	56
4.6 Race PCR e sequenciamento.....	61
5. Discussão e perspectivas.....	75
5.1 Expressão do gene da cafeína sintase em folhas de café.	76
5.2 Expressão dos genes das enzimas da via de biossíntese da cafeína- Metilxantosa e teobromina.....	78
5.3 Transcrito menor extra em folhas.....	79
5.4 Análise nos mutantes <i>Semperflorens e abramulosa</i> 1 e 2.....	81
5.5 Análise das regiões 5' e 3' - UTR do gene da cafeína sintase	83
6. Conclusões.....	86
7. Bibliografia.....	88

Lista de Tabelas

Tabela 1. Material vegetal utilizado para experimentação	39
Tabela 2. Genes, e respectivos primers, cuja expressão foi analisada por RT-PCR	41
Tabela 3. Genes, e respectivos primers cuja expressão foi analisada por RT-qPCR.	41
Tabela 4. Primers utilizados para amplificação da região não traduzida da cafeína sintase usando a técnica de RACE-PCR.	45
Tabela 5. Regiões 5'UTR e 3'UTR clonadas e número de clones obtidos	61
Tabela 6. Características fenotípicas observadas em mutantes <i>Sempreflorens</i> e <i>Abramulosa</i> 1 e 2 (segundo Carvalho et al., 1991)	76

Lista de Figuras

Figura 1. Via biossintética da cafeína mostrando as diferentes N-metiltransferases envolvidas. Modificado de Ashirara <i>et al.</i> , 2008.	26
Figura 2. Via de degradação da cafeína. Modificado de Ashirara <i>et al.</i> , 2008	27
Figura 3. Amplificação por RT-PCR de um transcrito único correspondente ao gene da actina. O produto esperado de 300 pb foi observado em todas as amostras analisadas. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo e fotodocumentadas.	52
Figura 4. Amplificação por RT-PCR dos transcritos correspondentes à cafeína sintase em folhas jovens e senescentes do cultivar MN, dos mutantes AC1, AC2 e AC3 e de Et4. Transcrito maior de aproximadamente 800 pb e o transcrito menor extra de aproximadamente 300 pb	53
Figura 5. Amplificação por RT-PCR dos transcritos correspondentes à cafeína sintase nos em filhas jovens dos mutantes <i>semperflores</i> e <i>abramulosa</i> , em MN e em AC1.	53
Figura 6. Quantificação da expressão relativa das metiltransferases em folhas jovens de café.	55
Figura 7. Quantificação da expressão relativa da cafeína sintase em folhas jovens de café. Expressão de CS nas 3 plantas ACs do banco de germoplasma de café, em MN, Et4 e nos mutantes <i>semperflores</i> e <i>abramulosa</i> 1 e 2.	55
Figura 8. Quantificação da expressão relativa da cafeína sintase em folhas novas (FN) e senescentes (FM) do cultivar MN, dos mutantes AC1, Ac2 e AC3 e do Et4.	56
Figura 9. Integridade do DNA genômico extraído de folhas jovens de plantas AC1 e MN. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo e fotodocumentadas.	57
Figura 10. Amostras de DNA genômico extraído de plantas MN e AC1 digeridas durante 16 h com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>MboI</i>	58
Figura 11. <i>Southern</i> blot de DNA genômico de café (MN e AC1) digerido com as enzimas <i>MboI</i> e <i>EcoRI</i> usando sonda para a cafeína sintase.	59
Figura 12. Amplificação a partir de DNA genômico e de amostras de cDNA obtidas de plantas MN e AC1 do transcrito de menor tamanho da cafeína sintase.	60
Figura 13. Quantificação da expressão relativa do transcrito menor extra em	

folhas de café. A: expressão do transcrito menor extra em folhas jovens das 3 plantas ACs, em MN e Et4. B: expressão do transcrito menor extra em folhas senescentes das 3 plantas ACs, em MN e Et4.	61
Figura 14. Alinhamento dos clones 5'UTR AC1 Folha e 5'UTR AC1Frutos	62
Figura 15. Alinhamento dos clones 5'UTR MN Folha e 5'UTR MN Frutos	63
Figura 16. Alinhamento dos clones 5'UTR MN Fruto e 5'UTR AC1 Frutos	64
Figura 17. Alinhamento dos clones 5'UTR MN Folha e 5'UTR AC1 Folha	65
Figura 18. Alinhamento dos clones 5'UTR AC1 Fruto	66
Figura 19. Alinhamento dos clones 3'UTR AC1 Fruto e Folha com as sequência de referência	68
Figura 20. Alinhamento dos clones 3'UTR MN Fruto e Folha com as sequência de referência	70
Figura 21. Alinhamento dos clones 3'UTR AC1 Fruto e 3'UTR AC1 Folha	71
Figura 22. Alinhamento dos clones 3'UTR MN Fruto e 3'UTR MN Folha	72
Figura 23. Alinhamento dos clones 3'UTR MN Folha e 3'UTR AC1 Folha	73
Figura 24. Alinhamento dos clones 3'UTR AC1Fr e 3'UTR MN Fruto	52
Figura 25. Representação esquemática do gene da cafeína sintase em plantas AC1 (clone genômico), do transcrito normal e do transcrito alternativo.	74

Resumo

A cafeína é um alcalóide do grupo das metilxantinas. Em café, sua síntese depende da ação de três enzimas: Metilxanthosina sintase (MS), Teobromina sintase (TS) e Cafeína sintase (CS). A crença de que o consumo de cafeína pode trazer problemas à saúde como também a sensibilidade aos efeitos da cafeína, em alguns consumidores, determinou um crescimento do mercado dos cafés descafeinados em pelo menos 10%. O processo de descafeinização hoje é baseado no uso de solventes, que acarreta em significativa perda de compostos essenciais ao sabor e qualidade de bebida. Recentemente, foram descobertas três plantas de *Coffea arabica* naturalmente descafeinadas no banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Estas plantas foram nomeadas AC. Análises bioquímicas nas folhas de AC1 mostraram que esta planta acumula teobromina, precursor da cafeína, não sendo detectada atividade da cafeína sintase. Maluf em 2009 descreveu, a existência de transcritos extras em todas as fases de desenvolvimento de frutos de AC1. Estes transcritos também estão presentes nos estágios verde-cana e cereja de frutos do cultivar mundo novo. Esses resultados obtidos sugerem que o transcrito extra está relacionado ao mecanismo de não produção de cafeína em frutos maduros. Tais resultados representam a possibilidade do desenvolvimento de um cultivar naturalmente descafeinado, e estratégias de melhoramento vêm sendo utilizadas para a transferência desta característica para outros cultivares.

O presente trabalho caracterizou as plantas com baixos teores de cafeína através de análises genéticas e moleculares. Através da análise da regulação da expressão do gene *caffeine synthase* (CCS), em folhas de café com teores normais e baixos de cafeína. As quantificação dos níveis de expressão, analisados via PCR quantitativo em tempo real revelaram baixa expressão do gene em folhas dos mutantes naturalmente descafeinados Ac1, Ac2 e Ac3 quando comparados aos níveis expressos pela cultivar Mundo Novo e do Etiópia 04, planta da mesma cultivar que os mutantes ACs. As análises da expressão do gene revelaram ainda um baixo acúmulo dos transcritos do mutante abramulosa, comparando-se ao acúmulo no cultivar mundo novo, já o mutante semperflorens apresentou acúmulo normal do transcrito. A expressão do gene da cafeína sintase foi também analisado durante o desenvolvimento de folhas jovens e senescentes, através RT-PCR semi-quantitativo. Foi observada a presença do transcrito extra somente nas fases de senescência das folhas, estes resultados corroboram com os resultados descritos que relacionam a presença do transcrito com a não produção da cafeína. A fim de compreender a regulação do gene da cafeína sintase e do transcrito

extra, um cDNA cobrindo toda a região codificadora, 5' e 3' foi obtido através da técnica RACE, determinando sua sequência.

Abstract

Caffeine is an alkaloid from the methylxanthine group. In coffee the synthesis of caffeine is carried out by three enzymes, methylxanthosine synthase (MS), theobromine synthase (TS) and caffeine synthase (CS).

Due to the belief that the caffeine could cause health problems and also to consumers sensitivity to caffeine, the consumption of decaffeinated coffee increased in about 10%. The decaffeination process is based on the use of solvents, this process results in a loss of essential compounds of flavor and cup quality. Recently, three coffee plants with extremely low levels of caffeine were identified in the IAC *Coffea* Germoplasm Collection, among non-cultivated *C. arabica* accessions. They are named AC's. Biochemistry assays in AC1 leaves show theobromine accumulation, caffeine precursor, no activity of caffeine synthase was detected.

Maluf in 2009 described the existence of extra transcript in all development of AC1 fruit. Those transcripts are also present on latter development stages, yellowish-green and cherry. The Author suggest that this extra transcript is related to non-synthesis of caffeine in mature fruits of cultivar MN and during the development of AC1 fruits. These results represent the possibility of the development of low-caffeine cultivars and coffee breeding programs are been used due to transfer this characteristic to others cultivars.

In this work, the naturally caffeine free plants have been characterized by molecular and genetics assays. Through the characterization of the regulation of caffeine synthase gene expression. The quantification of expression by qRT PCR show low expression in leaves of ACs plants comparing the expression of MN and ET4, same cultivar of AC. Expression assays show that *abramulosa* mutant has low expression comparing to MN cultivar but *seperflorens* mutant showed a normal expression. Caffeine expression was also studied through leaves development by RT PCR. The extra transcript was observed in mature leaves, this results corroborate with those described of non-synthesis of caffeine. To understand role regulation of caffeine synthase gene and extra transcript, a cDNA of all UTR region was cloned by RACE PCR and the sequence was determined.

1.

Introdução

1.1. História do café e sua importância econômica

O café é uma planta perene de porte arbustivo nativa da Etiópia no continente africano, onde ainda hoje faz parte da vegetação natural. Foi a Arábia a responsável pela propagação da cultura do café. Somente no século XVI, na Pérsia, os primeiros grãos de café foram torrados para se transformar em bebida.

As primeiras sementes de café chegaram ao Brasil em 1727 no Estado do Pará. Devido às condições climáticas favoráveis, o cultivo de cafeeiros se espalhou rapidamente. Em sua trajetória pelo Brasil o café passou pelo Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, expandindo-se pela Serra do Mar até atingir o Vale do Paraíba (Carvalho, 1993). A cultura espalhou-se para todo o Sudoeste Brasileiro, passando de uma posição relativamente secundária para a de produto-base da economia brasileira em 1780, destacando-se como o mais importante da história do Brasil.

Por quase um século, o café foi a grande riqueza brasileira e as divisas geradas pela economia cafeeira aceleraram o desenvolvimento do Brasil e o inseriram nas relações internacionais de comércio. A cultura do café ocupou vales e montanhas, possibilitando o surgimento de cidades e a dinamização de importantes centros urbanos por todo o interior do Estado de São Paulo, Sul de Minas Gerais e Norte do Paraná.

A exportação brasileira do café começou a crescer a partir de 1816. Na década de 1830-1840, o produto assumiu a liderança das exportações do país, com mais de 40% do total. Em 1840, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de café. Deu-se início ao período áureo do ciclo de café em que as exportações chegaram a representar 70 % das exportações do país (Taunay, 1939).

A área ocupada de cafeeiros em produção, em nosso país, ocupa 2,3 milhões de hectares empregando sete milhões de empregos diretos e indiretos, sobressaindo-se

como o setor que mais emprega no Brasil. A cadeia produtiva do café brasileiro ocupa uma posição dominante no mercado internacional. Segundo o Departamento do Café da Secretaria de Produção e Agroenergia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), o café representou 6,9% de todas as exportações brasileiras do agronegócio no acumulado dos cinco primeiros meses (janeiro a maio) deste ano em receita. No acumulado de 2010 (até maio), as exportações totais de café renderam US\$ 1,9 bilhão, com volume total de 12,4 milhões de sacas. O consumo brasileiro de café em 2010 é estimado em 19,3 milhões de sacas, com aumento de 4,9% no comparativo com o consumo de 2009, que foi de 18,4 milhões de sacas. A primeira estimativa total da safra 2010 indica que o País deverá colher entre 45,89 e 48,66 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado (Estatístico Oficial Conab 2010).

1.2. O café

O café pertence à família das Rubiaceae, de porte arbustivo. O gênero *Coffea* possui cerca de 100 espécies, dentre as quais se destacam duas, *C. arabica* (café arábica) e *C. canephora* (café robusta) devido a sua importância econômica. *C. arabica* é responsável por 70% da produção mundial de café, e *C. canephora* pelos 30% restantes.

C. arabica é a única espécie alotetraplóide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) do gênero sendo predominantemente autofértil em aproximadamente 90% das flores, apresentando um comportamento meiótico de um diplóide normal (Lashermes *et al.*, 2000). Já *C. canephora* e as outras espécies conhecidas do gênero *Coffea* são diplóides ($2n = 2x = 22$ cromossomos) e autoincompatíveis, multiplicando-se exclusivamente por fecundação cruzada (Fazuoli *et al.*, 1999; Berthaud, 1980). O café arábica é originário

de regiões de altitude, entre 1300 a 2000m, tem apenas uma haste ortotrópica, é suscetível às principais pragas e doenças da cultura, e tem alto custo de produção. Por outro lado, *C. canephora* é originária das florestas úmidas e de baixa altitude da África tropical, se estendendo da Guiné à Uganda e Angola. Já no Brasil, essa espécie é cultivada essencialmente no Estado do Espírito Santo. São plantas vigorosas e tolerantes às pragas, com ramos ortotrópicos em maior número, mais produtivas e com menor custo de produção.

Apesar de somente *C. arabica* e *C. canephora* terem importância econômica ativa no mercado mundial, algumas espécies selvagens como *C. congensis*, *C. recemosa*, *C. liberica var. dewevrei* apresentam uma grande importância adaptativa, sendo fontes importantes de variabilidade genética. Estas espécies não são cultivadas comercialmente mas possuem características altamente vantajosas como resistência a doenças e pragas, tolerância à seca e a outras alterações ambientais (Fazuoli *et al.*, 1999).

Por se tratar de uma planta perene de período juvenil longo, o melhoramento clássico do cafeeiro tem alto custo, demanda muito tempo e requer grande espaço físico. Entre as primeiras hibridizações até a obtenção de um novo cultivar pode-se levar no mínimo 20 anos. Nesse contexto, a engenharia genética pode acelerar o processo de obtenção de plantas genotipicamente superiores em um curto espaço de tempo, sendo de grande interesse para o setor agrícola, e em especial para o setor cafeeiro (Borém, 1998).

Diversos programas de melhoramento do cafeeiro vêm sendo desenvolvidos visando características agrônômicas tais como resistência a pragas e doenças, melhoria da qualidade de bebida, grãos com maiores ou menores teores de cafeína, entre outros.

1.3. Cafeína

A cafeína é um alcalóide purínico que se acumula em vários tecidos do cafeeiro por causa do seu baixo catabolismo (revisado em Ashihara e Crozier, 1999). A substância é sintetizada a partir da xantosina, um intermediário nas vias catabólicas das purinas. Três genes, que codificam para N-metiltransferases, estão envolvidos na biossíntese de cafeína: *7-metilxantosina sintase (MS)*, *teobromina sintase (TS)* e *cafeína sintase (CS)* (Figura 1). A metilação dos substratos ocorre no primeiro, terceiro e quarto passos da via biossintética. No segundo passo ocorre a remoção da ribose por uma nucleosidase (revisado em Kato e Mizuno, 2004; Ogita *et al.*, 2005).

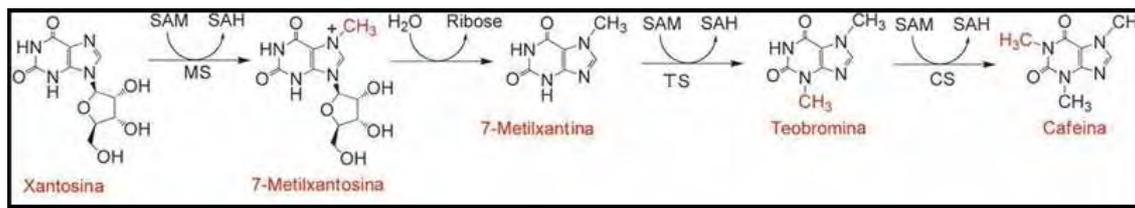


Figura 1. Via biossintética da cafeína mostrando as diferentes N-metiltransferases envolvidas. Modificado de Ashirara *et al.*, 2008.

A principal via de degradação de cafeína (Figura 2) foi elucidada como sendo: cafeína → 1,3-dimetilxantina (teofilina) → 3-metilxantina → xantina → ácido úrico → alantoína → ácido alantóico → uréia → CO₂+NH₄. Alternativamente, a cafeína pode degradar-se para teobromina, e desta para 3-metilxantina.

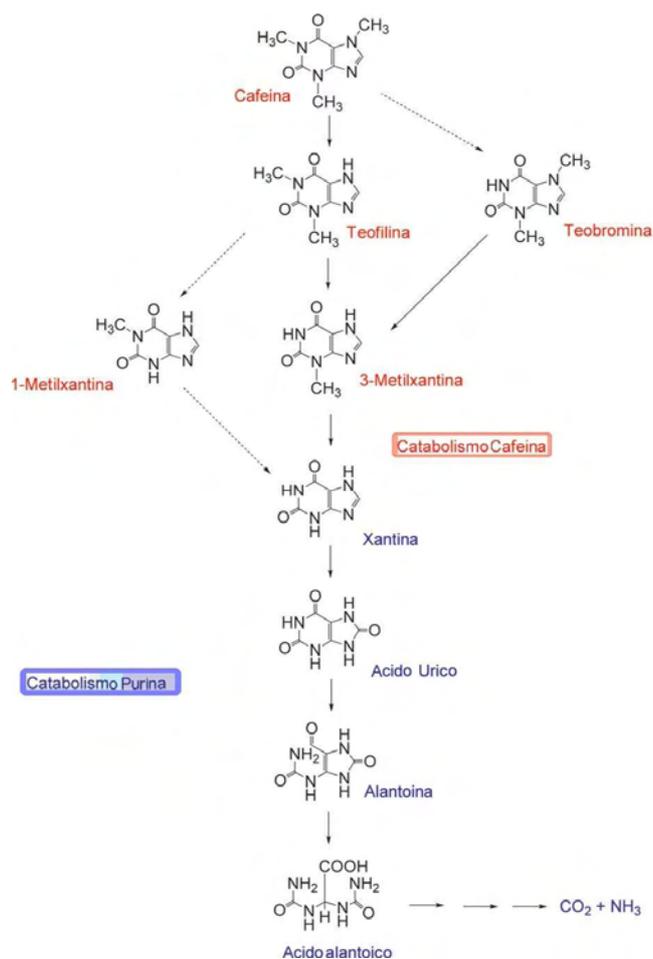


Figura 2. Via de degradação da cafeína. Modificado de Ashirara *et al.*, 2008.

Os primeiros estudos com as enzimas envolvidas na via de 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 conversão de 7-metilxantosina para 7-metilxantina, e desta para teobromina, era provavelmente a mesma. Outra metiltransferase é responsável pela metilação da xantosina para 7-metilxantosina. Estas enzimas foram purificadas, e os genes que as codificam foram clonados e sequenciados em diferentes espécies, incluindo o café (Moisyadi *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2001). A clonagem e o sequenciamento de cDNAs destas enzimas (Ogawa *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 2003; Uefuji *et al.*, 2003) demonstrou que elas são

muito similares, apresentando mais de 80% de identidade de seqüência (revisado em Kato e Mizuno, 2004).

A cafeína é conhecida pelos seus efeitos estimulantes. Quando consumida de forma moderada (4 a 5 xícaras por dia) não causa danos a saúde, exceção feita aos indivíduos que apresentam sensibilidade ao composto ou históricos de sintomas cardiovasculares, gastrointestinais ou neurológicos. Devido principalmente ao efeito estimulante da cafeína, a demanda por cafés descafeinados cresceu gradualmente desde 1970, representando, nos dias atuais, 12% do mercado mundial de cafés, gerando recursos de mais de US\$ 4 bilhões (Hielmann, 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 pela intervenção molecular em um dos passos das vias de biossíntese, ou pela utilização de genes marcadores na seleção assistida em programas de melhoramento genético.

1.4. Café descafeinado

A composição química do café cru depende não só da espécie e da variedade como também de outros fatores tais como práticas agrícolas, grau de maturação do fruto do café, processamento primário e condições de estocagem (Toledo *et al.*, 1997). Durante a torrefação dos grãos ocorrem consideráveis mudanças químicas que são responsáveis pelo aroma e sabor final da bebida, sendo o café um dos produtos que mais sofre modificações durante o processamento. Um dos principais compostos que se modificam durante esse processo são os ácidos clorogênicos, que são responsáveis pelo aroma e sabor da bebida final. Além disso, os ácidos clorogênicos atuam como um

potente inibidor da proteína integrase codificada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) (Robinson *et al.*, 1996) e como potente antioxidante em eritrócitos humanos (Lekse, 2001).

Os primeiros métodos de descafeinação datam do começo do século 20. A descafeinação é realizada nos grãos crus inteiros, antes do processo de torrefação. A maioria dos métodos de descafeinação existentes utiliza solventes para extração da cafeína, como diclorometano, tricloroetileno, benzeno, clorofórmio, álcool, acetona, água, entre outros (Ramalakshmi *et al.*, 1999), sendo o diclorometano o mais utilizado no Brasil. Existem dois métodos básicos para a produção de café descafeinado usando solventes: a extração direta pelo solvente, ou pelo uso da água seguida pelo uso de percoladores. Neste último, a água separa a cafeína associada ao ácido clorogênico fazendo com que o solvente tenha fácil acesso à cafeína, facilitando a sua saída pela parede celular do grão (Menthe *et al.*, 1985).

O processo de descafeinação com diclorometano modifica a composição química dos grãos das espécies *C. arabica* e *C. canephora*, ocasionando redução dos teores de ácidos clorogênicos, sacarose e proteínas. Tais modificações químicas podem resultar na alteração das características sensoriais da bebida (Toci *et al.*, 2006).

Em 1970, a extração pelo método CO₂ supercrítico começou a ser utilizada. Este método consiste em alterar a temperatura e a pressão de CO₂ acima dos seus valores críticos, aumentando assim a solvência e a difusibilidade, e diminuindo a viscosidade. Tem como aspectos positivos, a capacidade de não alterar os componentes da bebida, a não toxicidade, e a ausência de componentes cancerígenos e inflamáveis. Porém, o custo das instalações e de manutenção é muito alto.

A busca por cafeeiros produtores de grãos naturalmente descafeinados ou com baixos teores de cafeína vem sendo utilizada como alternativa para atender o mercado

de descafeinados sem que ocorra perda na qualidade de bebida. Como resultado, espécies de *Coffea* da região de Madagascar naturalmente desprovidas de cafeína foram descritas (Charrier & Berthaud, 1985; Charrier, 1978; Rakatomalala *et al.*, 1992), mas barreiras genéticas dificultam a transferência dessa característica para cultivares de *C. arabica*. Buscas em bancos de germoplasmas revelaram variabilidade nos teores de cafeína *i.e.* ao redor de 0,6% no cultivar Laurina (Tango & Carvalho, 1963) e ao redor de 1,2% em *Coffea arabica* (Mazzafera & Carvalho, 1992). O cultivar Laurina foi utilizado 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). 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 com reduzido valor agrônomo.

Silvarolla e colaboradores (2004) estudaram trezentos acessos selvagens de *C. arabica* provenientes da Etiópia, centro de origem e diversificação da espécie, e observaram que as plantas denominadas AC1, AC2 e AC3, apresentaram níveis muito baixos de cafeína (por volta de 0.06%). Uma vez que foi observado o acúmulo de teobromina, precursor imediato da via de síntese da cafeína, nas folhas de plantas AC1, os autores sugeriram que uma deficiência na enzima que age na conversão da teobromina para cafeína poderia ser responsável pelos baixos teores de cafeína. Para testar esta hipótese, os autores introduziram nas plantas AC1 e Mundo Novo (MN), cafeína e/ou adenina marcadas radioativamente a fim de monitorar a degradação e a conversão da cafeína. Essa análise foi feita utilizando HPLC em tempos de 4, 21 e 48 horas de incubação. A cafeína exógena marcada radioativamente foi degradada na planta AC1 e MN. Na planta AC1, porém, houve um acúmulo de teobromina, indicando

a existência de um problema na via de síntese da cafeína. Os autores sugeriram que o baixo nível de cafeína em AC1, comparado com MN, não está relacionado com a degradação da cafeína, e verificaram que não foi detectada a atividade de cafeína sintase em folhas.

Cabe ressaltar que as plantas ACs são menos vigorosas, apresentam baixa produção e arquitetura incomum a *Coffea arabica*, além de um desenvolvimento não uniforme (dados não publicados). Em 2004, um novo programa de melhoramento foi iniciado no Instituto Agronômico de Campinas visando a transferência da característica “naturalmente descafeinada” das plantas ACs para plantas mais vigorosas e produtivas. Tal transferência tem se mostrado complicada e demorada (dados não publicados), e em paralelo, técnicas genéticas e moleculares vêm sendo empregadas para compreender e acelerar a obtenção desta nova cultivar.

1.5. Estudos genéticos e moleculares

Como ressaltado anteriormente, 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 molecular em um dos passos da via de síntese, ou pela utilização de genes marcadores na seleção assistida em programas de melhoramento genético.

Mazzafera e colaboradores (1994) através do uso de marcadores radioativos, e da dosagem de enzimas em *C. liberica var. dewevrei* e nos cultivares Mundo Novo e Laurina de *C. arabica* (1%, 1,2% e 0,6%, de cafeína nas sementes, respectivamente), concluíram que a proporção entre as taxas de síntese e degradação de cafeína variavam durante a maturação e entre as cultivares, determinando assim o teor final na semente.

Polimorfismos em genes envolvidos na via de biossíntese da cafeína têm importância destacada no melhoramento do cafeeiro. Mizuno *et al.* (2003) obtiveram um cDNA que codifica uma cafeína sintase em frutos de *Coffea arabica* e verificaram que este apresenta cerca 40% de identidade com genes que codificam outras metiltransferases em plantas, sugerindo a ocorrência de polimorfismo gênico. Em relação ao chá, o cDNA clonado em café apresenta 80% de similaridade com a teobromina sintase e 40% de similaridade com a cafeína sintase, respectivamente. Os autores sugeriram que estes genes podem auxiliar no desenvolvimento de transgênicos de *C. arabica* com baixo teor de cafeína através do uso da tecnologia de RNA antisenso ou pelo silenciamento gênico.

Ogita e colaboradores (2003) produziram plantas transgênicas de *C. canephora* com redução de até 70% do teor de cafeína em folhas. A estratégia utilizada foi a de silenciar o gene que codifica a enzima teobromina sintase por meio da técnica de RNAi (RNA interference; Ogita *et al.*, 2003). Tais plantas, entretanto, ainda não tiveram os seus frutos avaliados quanto ao teor de cafeína.

Koshiro e colaboradores (2006) avaliaram a expressão dos genes metilxantosina (*CmXRS1*), teobromina (*CTS2*) e cafeína sintase (*CCS1*) em diferentes estágios de desenvolvimento de frutos de *C. arabica* cultivar Mokka e em *C. canephora*. Os resultados mostraram a expressão regular de *CmXRS1* e *CCS1*, e irregular de *CTS2*, durante o desenvolvimento do fruto. Picos de acúmulo de transcritos de *CTS2* foram observados no estágio de expansão dos frutos, enquanto que a acumulação de transcritos dos genes *CmXRS1* e *CCS1* declinou durante a maturação. Esses autores concluíram que a síntese de cafeína ocorre em frutos não maduros, no estágio verde. Nos estágios posteriores, verde-cana e cereja, a enzima cafeína sintase não tem atividade, apesar dos frutos apresentarem teores estáveis de cafeína.

Por outro lado, Nagai e colaboradores (2008) desenvolveram um híbrido de *C.eugenioides*, *C. canephora* e *C.arabica* com baixos teores de cafeína e teobromina. Os autores sugeriram que estas plantas possuem baixa atividade de biossíntese de cafeína em folhas e frutos.

De forma similar ao grupo de Koshiro, nosso grupo estudou a expressão desses genes em frutos de plantas AC1 em diferentes estágios de desenvolvimento. Foi observado que a acumulação de transcritos do gene *CTS2* é baixa nos primeiros estágios de desenvolvimento dos frutos, enquanto que os transcritos do gene *CCSI* estão presentes em níveis significativamente baixos em todos os estágios (Maluf et. al., 2009). Sugeriu-se que devido ao acúmulo de teobromina nos frutos de AC1 ocorre um possível mecanismo de regulação por *feedback*, em que a transcrição de *CTS2* é reprimida (Maluf et. al., 2009). A expressão dos genes envolvidos na via de biossíntese foi também analisada, via RT-PCR quantitativo e semiquantitativo, em frutos de *C. arabica* cv. Mundo Novo, *C. eugenioides* e *C. canephora*. Curiosamente, em amostras de *C. arabica* cv. Mundo Novo, *C. eugenioides* e *C. canephora*, além do transcrito correspondente à cafeína sintase, foi observado também um transcrito extra, de menor tamanho e intensidade, presente somente nos estágios finais de desenvolvimento dos frutos. Da mesma maneira, em frutos de plantas AC1 observou-se apenas a presença do transcrito de menor tamanho.

A presença desse transcrito extra em todas as fases de desenvolvimento dos frutos AC (que tem baixos teores de cafeína), e nos frutos já maduros de Mundo Novo e *C. eugenioides*, sugere que o mesmo possa estar diretamente envolvido com a regulação da via de síntese da cafeína nos frutos. A presença ou não desse transcrito em outros órgãos/tecidos de café pode auxiliar a desvendar tal possibilidade.

Uma hipótese plausível sobre a origem de tal transcrito é que o mesmo seja derivado do processamento alternativo do transcrito primário da cafeína sintase. O processamento alternativo como um mecanismo de regulação gênica é bastante comum em plantas. A auto-regulação da expressão de um gene (*FCA*) relacionado com a regulação floral em *Arabidopsis* é um exemplo. Estudos demonstraram que os transcritos de *FCA* são processados via *splicing* alternativo e poliadenilação, originando quatro tipos de RNA, dos quais apenas um é biologicamente funcional (revisado por Quesada *et al.*, 2005). Recentemente em café foi observado que os transcritos do gene *etr1* (que codifica um receptor de etileno) são processados de forma alternativa (Bustamante-Porras *et al.*, 2007). Os autores identificaram diferentes tipos de transcritos durante os estágios de desenvolvimento de frutos das espécies *C. canephora* e *C. pseudozangebariae*. Outra explicação é a ocorrência de um alelo alternativo da cafeína sintase, mas a clonagem e sequenciamento do transcrito menor não elucidaram tal questão (Maluf *et al.*, 2009).

As análises realizadas até então pelo nosso grupo sugerem que um evento de *splicing* alternativo possa estar envolvido com a regulação da expressão da cafeína sintase no final do desenvolvimento dos frutos, fato que estaria diretamente correlacionado com o fim da produção de cafeína (Maluf *et al.*, 2009). Nos mutantes AC, entretanto, esse processamento alternativo parece ocorrer em todas as fases de desenvolvimento dos frutos, possivelmente inibindo a via de síntese da cafeína em toda a planta.

Neste estudo foi também descrita a existência de polimorfismos na sequência de AC1. Substituições de nucleotídeos com alterações na sequência primária de aminoácidos são observadas, com destaque para: uma substituição de G para C no exon 2 do gene da cafeína sintase, e outra na posição 266 do exon 3 desse mesmo gene, que

determina a substituição de uma isoleucina, presente na enzima do cultivar MN, para uma valina, em AC1.

Os baixos teores de cafeína observados nas plantas AC1 podem ser, portanto, resultantes de dois mecanismos distintos: um associado à regulação transcricional e pós-transcricional, e o outro referente à atividade da enzima. Entretanto, novos estudos são necessários para entender as bases moleculares dos mutantes AC e assim estabelecer uma estratégia de melhoramento para torná-la uma cultivar viável.

2. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos:

- Analisar a expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na via de síntese de cafeína em folhas de plantas de *C. arabica* com teores normais e reduzidos de cafeína (AC) nos frutos.

- Comparar o perfil de expressão dos genes da via biossintética da cafeína em folhas de variedades de *C. arabica* e mutantes.

- Verificar se o transcrito extra observado em frutos AC é resultado de um processamento alternativo do transcrito do gene *CCSI*, ou resultado de expressão de outro alelo.

- Caracterizar as regiões não traduzidas (UTR) do gene da cafeína sintase.

3. Material e Métodos

3.1 Local de Experimentação

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

3.2 Material Vegetal

O material vegetal utilizado está descrito na Tabela a seguir:

Tabela 1. Material vegetal utilizado para experimentação

Material	sigla	Tipo de folha coletada
<i>C.arabica</i> cv. Mundo novo	MN	Folhas Jovens e Folhas Senescentes
<i>C.arabica</i> AC1	AC1	Folhas Jovens e Folhas Senescentes
<i>C.arabica</i> AC2	AC2	Folhas Jovens e Folhas Senescentes
<i>C.arabica</i> AC3	AC3	Folhas Jovens e Folhas Senescentes
<i>C.arabica</i> ET4	ET4	Folhas Jovens e Folhas Senescentes
<i>C.arabica</i> var. <i>semperflorens</i>	SF	Folhas Jovens
<i>C.arabica</i> var. <i>abramulosa</i> ar1	AR1	Folhas Jovens
<i>C.arabica</i> var. <i>abramulosa</i> ar2	AR2	Folhas Jovens

As plantas MN e ET4 foram utilizadas como controles, já que MN é uma cultivar com teores normais de cafeína enquanto ET4 é do mesmo acesso que as plantas ACs, mas possui teores normais de cafeína nos frutos. Todas folhas foram lavadas com

água Milli-Q, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior extração de DNA e RNA.

3.3 *Data mining* e desenho dos primers gene-específicos

Seqüências públicas dos genes que codificam a cafeína sintase (*CS*) (*CCSI* - n°. AB086414, 1203pb; *CaDXMT1* – n°. AB084125, 1155pb), a metilxantosina sintase (*MS*) (*CaXMT1* - n°. AB048793, 1316pb), e a teobromina sintase (*TS*) (*CaMXMT1* - n°. AB048794, 1298pb), disponíveis no GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), foram utilizadas para identificar EST específicos no Banco de Seqüências Expressas (EST) do Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) através da ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Uma vez que estas proteínas apresentam mais de 80% de similaridade entre si, somente ESTs que apresentaram 100% de similaridade com a seqüência de determinada enzima foram utilizados.

Contigs com os ESTs selecionados foram montados para cada uma das proteínas alvo com ferramentas desenvolvidas pela equipe de Bioinformática do projeto Genoma Café. O aplicativo ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) foi utilizado para a confirmação das seqüências com relação às proteínas em questão, através do alinhamento das seqüências dos contigs entre si e com as seqüências públicas anteriormente mencionadas.

A maioria dos *primers* específicos foi desenhada manualmente com base na seqüência dos contigs montados, tanto para o PCR quantitativo (Tabela 2) quanto para a análise em PCR semiquantitativo (Tabela 3).

Tabela 2. Genes, e respectivos *primers*, cuja expressão foi analisada por RT-PCR

Gene	Sequência dos <i>primers</i>
Cafeína sintase F2	F- 5' ATA CAA GAA TTG TTG CGG 3' R- 5' CAG GATA CAG GGG AAT GGG ATC 3'
Transcrito menor da cafeína sintase	F- 5' ATT CAG GGA CGT CTG GAG GAA GAA3' R- 5' ACT GGT TAT CAT CAA TGG AGA AAG C 3'
Actina	F- 5' GAC CTC ACA GAT CAC CTC AT3' R- 5' GTA GTC TCG TGG ATA CCA GC3'

Tabela 3. Genes, e respectivos *primers*, cuja expressão foi analisada por RT-qPCR.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>
Cafeína sintase	F- 5' GTG CAT TTA CTC TTC CAA AGC AAG T 3' R- 5' CGA ATG AAT CCT AAG AAA TGT GGT AA 3'
Metilxantosina sintase	F- 5' ATGCCCGGCTCTTTCTACAG3'; R- 5' CGGGCGTCTAATTCAACTCCT3'.
Teobromina sintase	F- 5' CCCGTCCAGAAGGCATATTT3'; R- 5' GAGAAGGCAGCATCATAATGGG3'
GAPDH	F- 5' TTG AAG GGC GGT GCA AA 3' R- 5' AAC ATG GGT GCA TCC TTG CT 3'
Transcrito menor da cafeína sintase	F- 5' ATT CAG GGA CGT CTG GAG GAA GAA3' R- 5' ACT GGT TAT CAT CAA TGG AGA AAG C 3'

3.4 Extração de RNA total de folhas e síntese de cDNA

Folhas jovens, do segundo par foliar, e folhas senescentes foram colhidas e maceradas em nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos Falcons contendo tampão de extração 2% CTAB; 2% PVP; 100 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 25 mM EDTA; 2 M NaCl e 2% β -mercaptoetanol. O macerado foi homogeneizado ao tampão e incubado a 65°C por 20 minutos. Adicionou-se 1 volume de clorofórmio e a mistura foi centrifugada a 11000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado para novo tubo. O processo de adicionar 1 volume de clorofórmio seguido de centrifugação foi repetido algumas vezes até que não fosse observado precipitado na interface entre as fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi recolhida para um novo tubo e uma solução de LiCl 12 M foi adicionada até a concentração final de LiCl 2,5 M. Os tubos foram incubados a 4°C por 12 h. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 11000xg a 4°C por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o sedimento foi lavado com 500 μ L de LiCl 2,5 M e centrifugado a 11000 xg a 4°C por 10 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante. O sedimento foi seco a temperatura ambiente e depois ressuspendido em 100 μ L de água tratada com Diethyl pyrocarbonate (DEPC).

O RNA total extraído foi submetido à eletroforese em agarose e quantificado em espectrofotômetro, medindo-se a absorvância entre 220 -280 nm. Posteriormente, as amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNaseI (RNase QI - promega), para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico restante do processo da extração.

3.5 Análise da expressão gênica

Sintetizou-se cDNA a partir de 400 ng de RNA total. As condições para a síntese estão descritas no Kit *SuperScript III First – Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen). O cDNA sintetizado foi quantificado em espectrofotômetro, medindo-se a absorvância em 220-280 nm. A expressão dos genes alvo foi analisada por RT-PCR semiquantitativo e quantitativo.

Testes de expressão do gene que codifica a cafeína sintase foram feitos em PCR semi- quantitativo a partir do cDNA sintetizado. Para a reação de 25 µL de volume final, foram utilizados: 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 1 pmol dos primers específicos e 0,25 u Taq DNA polimerase. A reação de PCR foi constituída da seguinte condição de ciclagem: 5 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto à temperatura de anelamento específica para cada *primer* e 1 minuto a 72°C. Os fragmentos obtidos foram separados em gel de agarose 1,5%.

O RT-PCR quantitativo foi realizado usando um termociclador modelo AB7300 System (Applied Biosystems) utilizando *Sybr Green Kit* (Invitrogen), que contem *syber green* e a referência passiva ROX. Dois µl do cDNA das amostras de interesse foram adicionados à seguinte reação (concentração final): 7,5 µl de *Maxima SYBR Green qPCR SuperMix with ROX*, 0,3 µM de cada oligonucleotídeo gene-específico (forward e reverse), 4,9 µl de água ultra pura livre de RNase para um volume final da reação de 15 µl. Cada reação foi feita em triplicata para cada amostra. Para a certificação da ausência de qualquer tipo de contaminação, o controle negativo foi realizado adicionando-se água livre de RNase ao invés de cDNA. Para confirmar a presença de amplicons únicos, os produtos do PCR foram submetidos à curva de dissociação com temperatura variando entre 60°C e 95°C. Os resultados foram analisados através do software SDS version 1.3.1 (Applied Biosystems), e a frequência dos transcritos foi estimada através do uso dos parâmetros *threshold*, *baseline* e Ct (Iskandar *et al.*, 2004). O gene que codifica uma

GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de café foi usado como controle endógeno e o cultivar MN como calibrador.

O cálculo para a determinação da expressão gênica foi o do ΔCt (Livak e Schmittgen, 2001), que utiliza a expressão $QR = 2^{-\Delta Ct}$, na qual QR representa o nível de expressão gênica; Ct o ciclo de amplificação de cada amostra; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene controle, e $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse e o ΔCt da amostra de referência.

Para confirmar os resultados, as amostras foram analisadas em triplicadas, cada análise foi feita três vezes e uma repetição biológica, em anos diferentes, foram realizadas.

3.6 RACE- PCR, clonagem e sequenciamento

As seqüências completas dos cDNAs da cafeína sintase de frutos e folhas de AC1 e MN foram obtidas usando a técnica 5' e 3'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*). Para desenho dos *primers* foram usadas as seqüências de nucleotídeos dos ESTs da cafeína sintase de MN e de AC1 disponíveis no banco de ESTs do café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Quatro *primers* específicos foram desenhados junto às porções 3' e 5' destes ESTs. Destes primers, dois (denominados 5'GSP1 e 5'GSP2) foram sintetizados para frutos de MN e AC1 e para folhas de MN e AC1, respectivamente, e outros dois (3'GSP2 e 3'GSP3) para MN e para AC1, respectivamente (Tabela 4). A porção faltante foi amplificada empregando o kit *GeneRacer® Kit with AMV RT and TOPO TA Cloning® kit for Sequencing* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 4. *Primers* utilizados para amplificação da região não traduzida da cafeína sintase usando a técnica de RACE-PCR.

Nome	Sequência dos <i>primers</i>
5'GSP1	R- 3' CCG CAA CAA TTC TTG TAT GCA TT 5'
5'GSP2	R- 3'AAA ATG TGT TTG GTC CAG AAG CG 5'
3'GSP2	F- 5'TTT ATG CCC CTT ATG ATG CTG G 3'
3'GSP3	F- 5' ATT CCC CAG TAT CCT GCG ATG A 3'

Os fragmentos resultantes da amplificação por 5'e 3'-RACE foram verificados em gel de agarose e então isolados do gel com o auxílio de uma lâmina descartável. Esses fragmentos foram purificados utilizando-se o kit *QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen) de acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante. Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor de clonagem TOPO TA 2.1 (Invitrogen) seguindo as informações dadas pelo fabricante.

Os plasmídeos recombinantes foram então inseridos em células competentes da cepa DH5 α de *Escherichia coli* preparadas conforme protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001). A transformação foi realizada empregando choque térmico segundo protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 2001). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de Select Agar em água deionizada, pH7,0) adicionado de 100 μ g/ml de ampicilina; 24 mg/ml de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e 50 mg/ml de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-

indolil- β -Dgalactosídeo). As placas de Petri foram deixadas em estufa a 37°C por 16 horas.

Foram escolhidas colônias de “coloração branca” para confirmação da presença do vetor recombinante e posterior sequenciamento do inserto. Para purificação dos plasmídeos, as colônias isoladas foram inoculadas em 3 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (100 μ g/ml) e mantidas sob agitação constante de 220-250 rpm a 37°C durante 14-16 horas. Após esse período, o meio líquido contendo as bactérias foi transferido para microtubos. Estes tubos foram submetidos à centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi utilizado para a extração de DNA plasmidial usando o *Qiaprep Spin Miniprep* kit como descrito pelo protocolo do fabricante (Qiagen).

Para confirmar a inserção, os plasmídeos recombinantes foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas) e os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,1 μ g/ml). As digestões foram realizadas a 37°C durante 16 horas na presença de tampão de reação 1X, 100 ng de DNA plasmidial e água Milli-Q autoclavada.

O sequenciamento dos clones selecionados foi realizado utilizando o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Para preparar a reação foi utilizada água Milli-Q autoclavada, 4 μ l de plasmídeo (500 ng), 0,5 μ M dos oligos M13 reverse e M13 forward (Invitrogen), 2 μ l do mix de BigDye™ e 2 μ l de tampão *Save Money* (10 % (v/v) com MgCl₂ 50 mM e 20 % (v/v) de Tris-HCl pH 9,0). A reação ocorreu em termociclador usando as seguintes condições: 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos, compondo um ciclo, o qual foi repetido 25 vezes. Após a reação, as amostras foram purificadas com a adição de isopropanol 65% e a placa ficou em repouso e ao abrigo de luz por 15 minutos. Após esse período a placa

foi centrifugada a 4000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado. Foi adicionado etanol 70%, e a placa foi novamente submetida a centrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi descartado. As placa ficou a temperatura ambiente a ao abrigo da luz até secar. Após esse período, as amostras foram ressuspendidas em 10 µl de formamida deionizada (Hi-di; Applied Biosystems). Imediatamente antes do seqüenciamento, as amostras foram desnaturadas em termociclador a 90°C por 3 minutos e incubadas em gelo por 5 minutos. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI PRISM 377 (AppliedBiosystems), e uma seqüência consenso foi obtida a partir da seqüência de nucleotídeos de cada clone usando o programa MEGA. A seqüência consenso **das regiões 5'e 3'UTR** resultante foi submetida à pesquisa junto ao banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) utilizando BLAST e BLASTx (Altschul *et al.* 1990, 1997).

3.7 Extração de DNA genômico de café

A extração de DNA genômico foi realizada empregando folhas jovens, do segundo par foliar, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos Falcon contendo tampão de extração (2% CTAB; 2% PVP40; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 2 M NaCl e 0,2% β-mercaptoetanol). Ao homogeneizado foi adicionado 25 mg de carvão ativado por grama de tecido, agitando-se gentilmente. Os tubos foram incubados a 60°C por 60 minutos. Após esse período adicionou-se 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram agitados. A mistura foi submetida à centrifugação, 10000xg por 20 minutos, e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Foi adicionado 2/3 do volume de

isopropanol gelado e os tubos foram incubados por 1 h no freezer. Após esse período, os tubos foram submetidos à centrifugação, 10000xg por 30 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se ao sedimento 10 ml de tampão de lavagem por grama de tecido (80% etanol e 10 mM acetato de amônio). Os tubos foram agitados em shaker vertical por 30 min. Após esse período, foram novamente centrifugados a 3200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento ressuspenso em TE, e o volume resultante foi transferido para tubos de 2 ml. Foi adicionada RNase e os tubos foram incubados a 37°C. Adicionou-se 400 µl de TE, sendo em seguida acrescentado um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e os tubos foram novamente submetidos à centrifugação, 12000xg por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este se adicionou 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 0,8 volume de isopropanol absoluto gelado. Os tubos foram incubados a 4°C por cerca de 12 a 18 h. Após esse período, os tubos foram submetidos novamente a centrifugação, (12000xg por 20 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70%. Os tubos foram novamente centrifugados e o sedimento ressuspenso em água Milli-Q autoclavada.

3.8 Southern Blot

O DNA genômico extraído de folhas foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MboI* (fermentas), sendo incubado por 16 h em banho Maria a 37°C. O DNA digerido foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) a 30v durante 12 h. O DNA foi transferido para membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham Pharmacia) visando a hibridização seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (2001).

A sonda não radioativa foi construída utilizando o *PCR Dig Probe Synthesis* kit (Roche), seguindo o protocolo do fabricante. Para construção da sonda foi utilizada a seqüência do transcrito menor da cafeína sintase que tem aproximadamente 300 pares de base (pb). A eficiência da marcação foi determinada aplicando-se diluições de DNA controle e da sonda desejada em membrana Hybond N⁺ e comparando os sinais obtidos. A membrana foi colocada em saco plástico vedado contendo solução de pré-hibridização sendo mantida a 42°C sob agitação constante por um período de 5 h. Após esse período, a solução foi retirada e adicionou-se à membrana a solução de hibridização contendo a sonda marcada e desnaturada. O saco foi novamente vedado e a membrana incubada a 42°C com agitação constante por 16 h. Após o período de hibridização, a membrana foi lavada duas vezes com tampão de lavagem I (Uréia 2 M, SDS 0,1% e SSC 0,5X) a 55°C. A membrana foi então transferida para um recipiente limpo e lavada em tampão de lavagem II (Tris 1 M e NaCl 2 M) a temperatura ambiente por 5 min. Após as lavagens, a membrana foi submetida ao processo de geração e detecção de sinal. Para tal foi utilizado o *Dig Nucleic Acid Detection* kit (Roche) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

4. Resultados

4.1. *Data mining* e desenho dos primers específicos

Em análises no banco ESTs do Projeto Genoma Café, Maluf *et al.* (2009) sintetizaram seis pares de *primers* específicos para o gene da cafeína sintase, dos quais, os primers CS-F2 e Caxmrt-R foram utilizados neste trabalho. A fim de obter a sequência completa do gene da cafeína sintase, as extremidades 3' e 5' faltantes foram amplificadas por RACE-PCR, e os produtos obtidos foram sequenciados.

Para verificar a existência do transcrito menor em folhas, como observado por Maluf *et al.* (2009) em diferentes fases de desenvolvimento de frutos de café, *primers* para amplificação específica desse transcrito foram desenhados com base na sequência obtida por esses autores.

4.2 Extração de RNA total, síntese e validação da integridade do cDNA

Amostras de RNA total foram extraídas de folhas de café em diferentes estágios de desenvolvimento provenientes de plantas controle e mutantes. Os respectivos cDNAs foram sintetizados com o uso da enzima *Superscript III* e Oligo-dT (Invitrogen). Para confirmar a integridade e a qualidade dos cDNAs sintetizados, uma amplificação prévia foi realizada empregando-se *primers* específicos para o gene que codifica uma actina em café. Nesse caso, foi observado um produto único de amplificação no tamanho esperado (300 pb) em todas as amostras extraídas (Figura 3A e 3B), demonstrando a viabilidade do cDNA sintetizado.

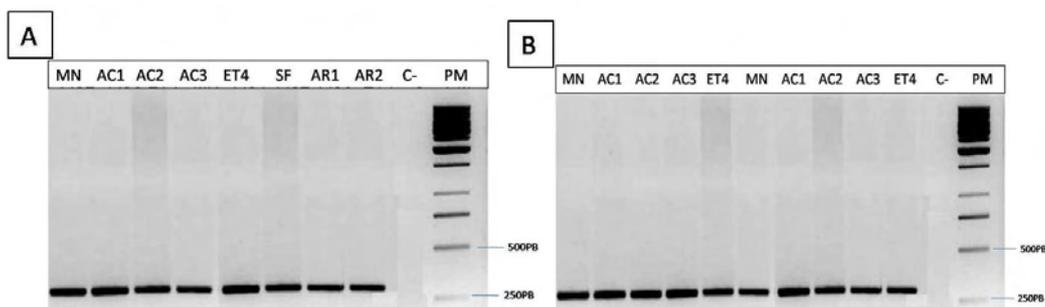


Figura 3. Amplificação por RT-PCR de um transcrito único correspondente ao gene da actina. O produto esperado de 300 pb foi observado em todas as amostras analisadas. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo e fotodocumentadas. A: Folhas jovens de MN, AC1, AC2, AC3 e Et4 (controles de cafeína), os mutantes semperflores e abramulosas 1 e 2, controle negativo (c-) e marcador molecular (PM) B: Amostras de folhas novas e folhas senescentes de MN, AC1, AC2, AC3 e Et4, controle negativo (c-) e marcador molecular (PM).

4.3 Presença/Ausência do transcrito menor extra em folhas

Maluf *et al.* (2009) descreveram a existência de um transcrito menor extra relacionado ao gene da cafeína sintase nas primeiras e últimas fases de desenvolvimento de frutos de MN e em todas as fases de frutos AC1. Os autores julgaram que este transcrito estaria diretamente ligado a uma sinalização de não-síntese de cafeína nessas fases de desenvolvimento dos frutos. Com o intuito de verificar se tal transcrito está presente, e apresenta o mesmo comportamento em folhas de café, um ensaio de RT-PCR foi realizado. As análises de RT-PCR semiquantitativo revelaram a presença de um transcrito extra de menor intensidade, e de mesmo tamanho que o descrito por Maluf e colaboradores (2009), em folhas senescentes de todos os acessos investigados, e em folhas jovens e senescentes de AC1 e ET4 (Figura 4).

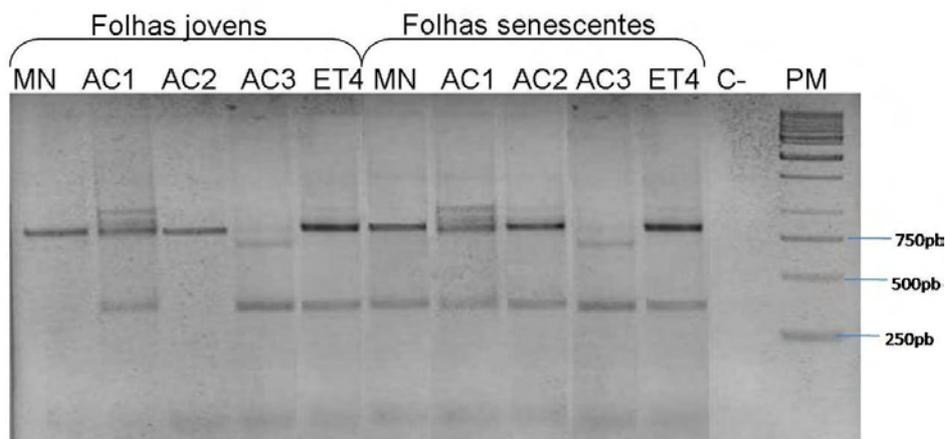


Figura 4. Amplificação por RT-PCR dos transcritos correspondentes à cafeína sintase em folhas jovens e senescentes do cultivar MN, dos mutantes AC1, AC2 e AC3 e de Et4. Transcrito maior de aproximadamente 800 pb e o transcrito menor extra de aproximadamente 300 pb. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo e fotodocumentadas. C-: controle negativo e PM: marcador molecular.

De mesma maneira foi analisada a presença/ausência do transcrito menor extra nos mutantes Semperflorens e Abramulosa. Nesse caso, as análises de RT-PCR semiquantitativo revelaram a existência do transcrito maior de aproximadamente 800 pb correspondente à região codificadora da cafeína sintase, mas não do transcrito menor extra (Figura 5).

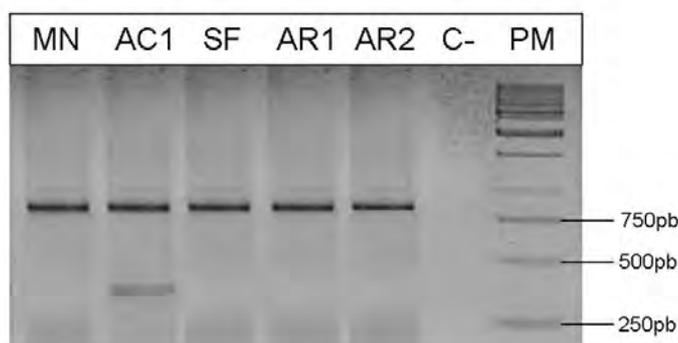


Figura 5. Amplificação por RT-PCR dos transcritos correspondentes à cafeína sintase nos em filhas jovens dos mutantes semperflorens e abramulosa, em MN (controle c/ cafeína normal) e em AC1 (controle com baixa cafeína). O transcrito maior de aproximadamente 800 pb é visível em MN, semperflorens e abramulosas, enquanto que o transcrito menor extra de aproximadamente 300 pb está presente somente em AC1. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo e fotodocumentadas. C-: controle negativo e PM: marcador molecular.

4.4 Análise da expressão relativa dos genes que codificam metiltransferases em café

A quantificação da expressão relativa dos genes que codificam metiltransferases em café foi avaliada em folhas do cultivar MN, que apresenta teores normais de cafeína em frutos, bem como nos mutantes *semperflorens* e *abramulosas* 1 e 2 e em ET4 . Estas análises tiveram como objetivo investigar o padrão de expressão deste gene em folhas de diferentes genótipos, para comparação com o padrão de expressão observado em folhas de plantas AC1.

A expressão dos genes que codificam a cafeína sintase, a metilxantosina sintase e a teobromina sintase, respectivamente, foi avaliada em folhas jovens e senescentes através da metodologia de RT-qPCR (PCR em tempo real quantitativo). Nesses ensaios, o gene *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno. Para cada par de *primers* foram realizadas pelo menos três repetições de RT-qPCR. Uma repetição biológica foi realizada a fim de confirmar os resultados obtidos na primeira análise.

Como observado para frutos, o acúmulo de transcritos correspondentes ao gene da cafeína sintase (CS) é reduzido em folhas jovens das plantas AC (Figura 6C). Observou-se ainda um maior acúmulo de transcritos da teobromina sintase (TS) em MN que em AC (Figura 6B), e um maior acúmulo de transcritos da metilxantosina sintase (MS) em AC que em MN (Figura 6A). Observa-se também que os mutantes *semperflorens* e *abramulosas* apresentam menor acúmulo de transcritos da cafeína sintase, comparando-se ao cultivar MN, sendo que o perfil de expressão no mutante

abramulosa 1 mostrou-se semelhante ao perfil de expressão observado em AC3 (Figura 7).

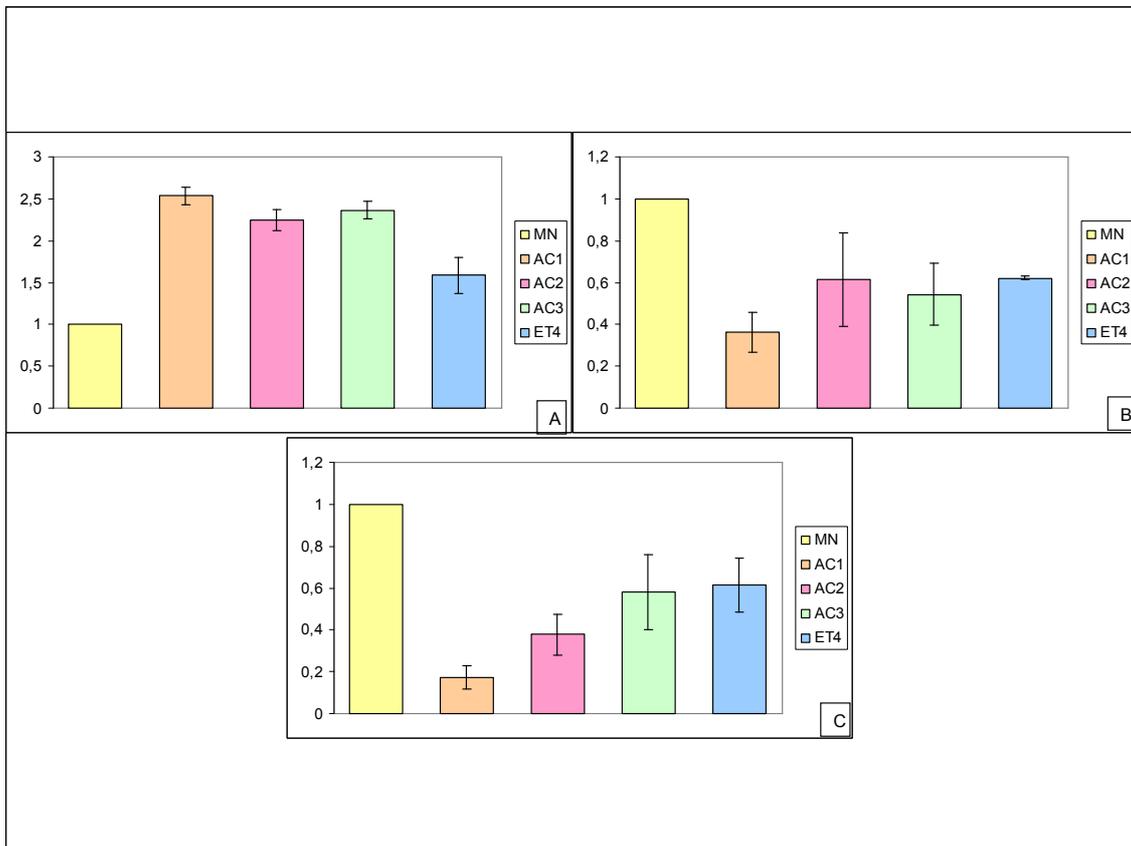


Figura 6. Quantificação da expressão relativa das metiltransferases em folhas jovens de café. A: expressão de MS nas 3 plantas ACs do banco de germoplasma de café, em MN e Et4. B: expressão de TS nas plantas ACs, MN e Et4. C: expressão de CS nas plantas ACs, Et4 e MN. MN foi usado como calibrador para os três experimentos.

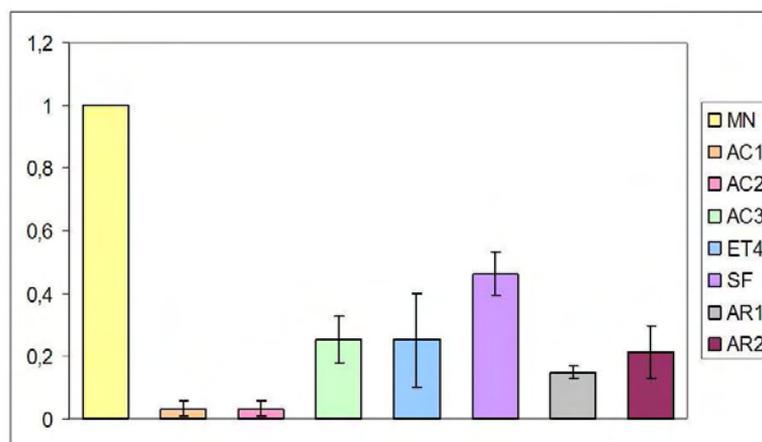


Figura 7. Quantificação da expressão relativa da cafeína sintase em folhas jovens de café. Expressão de CS nas 3 plantas ACs do banco de germoplasma de café, em MN, Et4 e nos mutantes *semperflorens* e *abramulosa* 1 e 2. MN foi usado como calibrador para os três experimentos.

A fim de validar os resultados descritos anteriormente e obtidos usando-se RT-PCR semiquantitativo, a expressão do gene da cafeína sintase em folhas novas (FN) e senescentes (FM) do cultivar MN, das três plantas ACs e do Et4 foi avaliada por RT-qPCR. Como pode ser observado na Figura 8, a expressão em folhas senescentes mostrou-se significativamente baixa, com exceção do ET4.

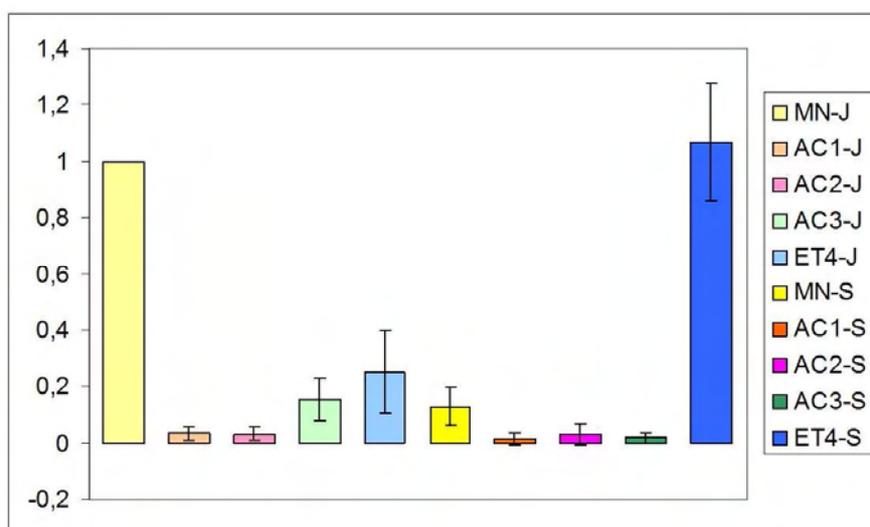


Figura 8. Quantificação da expressão relativa da cafeína sintase em folhas novas (FJ) e senescentes (FS) do cultivar MN, dos mutantes AC1, Ac2 e AC3 e do Et4. MN foi usado como calibrador para os três experimentos.

4.5 Extração de DNA e Southern Blot

Ensaio de *Southern blot* foram realizados com o objetivo de verificar o número de cópias do gene que codifica a cafeína sintase em café. Para tal, procedeu-se a extração de DNA genômico de folhas provenientes do segundo par foliar de plantas MN e AC1 (Figura 9). Os DNAs genômicos extraídos foram submetidos ao processo de

digestão empregando-se duas enzimas de restrição, *EcoRI* e *MboI*, sendo que a enzima *EcoRI* tem um sítio de reconhecimento no meio do gene da cafeína sintase.



Figura 9. Integridade do DNA genômico extraído de folhas jovens de plantas AC1 e MN. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo e fotodocumentadas. PM – marcador de peso molecular.

A reação de digestão do DNA extraído foi realizada a 37°C durante 16 h. Para verificar se a digestão ocorreu de forma completa, uma alíquota dos DNAs digeridos foi submetida a eletroforese em gel de agarose (Figura 10).



Figura 10. Amostras de DNA genômico extraído de plantas MN e AC1 digeridas durante 16 h com as enzimas *EcoRI* e *MboI*, respectivamente. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo e fotodocumentadas.

Após eletroforese em gel de agarose por um período de 12 h, o DNA genômico digerido foi transferido para membrana de nylon Hybond N+ (Amersham pharmacia) visando a hibridização. Para verificar a eficiência de marcação da sonda, um teste foi realizado aplicando-se diluições de DNA controle em membrana, sendo essa submetida então aos tratamentos de pré-hibridização, hibridização e revelação. Os sinais obtidos foram comparados.

Sabendo-se a eficiência da sonda construída, a membrana contendo o DNA genômico extraído das plantas MN e AC1 foi hibridizada, e o resultado obtido está representado na Figura 12. Esse resultado, porém, não foi conclusivo, já que não foram observadas bandas nos diferentes materiais analisados.

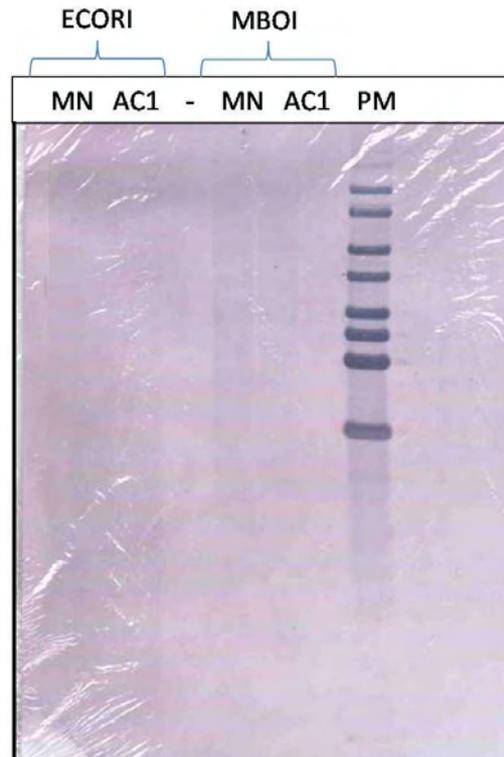


Figura 12. *Southern* blot de DNA genômico de café (MN e AC1) digerido com as enzimas *MboI* e *EcoRI* usando sonda para a cafeína sintase. PM - marcador molecular.

Uma nova estratégia foi então estabelecida com base no uso de *primers* específicos para o transcrito menor extra da cafeína sintase (Tabela 3). Análises utilizando PCR de DNA genômico, RT-PCR e RT-qPCR foram realizadas seguindo as condições já descritas. A análise inicial empregando PCR de DNA genômico e RT-PCR revelou a existência de um fragmento de mesmo tamanho e intensidade, que foi amplificado a partir de amostras de DNA genômico bem como de amostras de cDNA de plantas MN e AC1 (Figura 13).

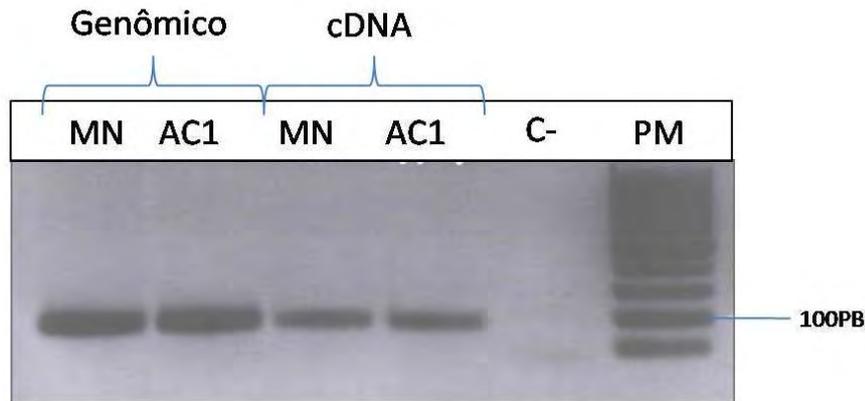


Figura 13. Amplificação a partir de DNA genômico e de amostras de cDNA obtidas de plantas MN e AC1 do transcrito de menor tamanho da cafeína sintase. C-: controle negativo e PM: marcador de peso molecular (Fermentas). As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo e fotodocumentadas.

A quantificação da expressão relativa desse transcrito por RT-qPCR revelou o padrão esperado de acúmulo de transcritos nas plantas investigadas. Ou seja, maior acúmulo de transcritos em folhas jovens de AC1, AC2 e AC3 em comparação a MN (Figura 14A). A planta ET4 apresentou maior acúmulo que o observado em MN, mas menor em relação as plantas ACs. Já o acúmulo de transcritos em folhas senescentes foi maior em todas as plantas analisadas quando comparado ao acúmulo observado em folhas jovens (Figura 14B).

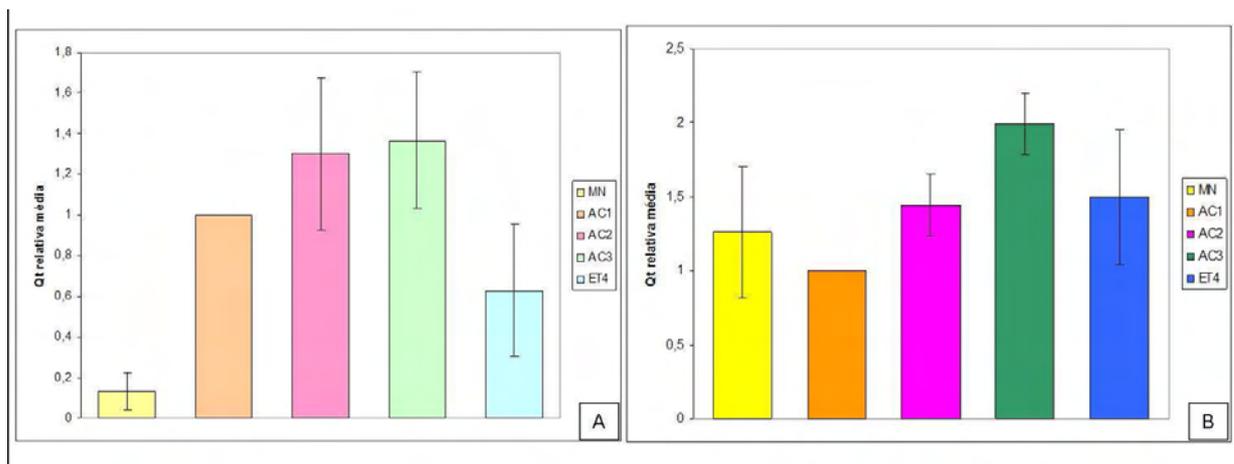


Figura 14. Quantificação da expressão relativa do transcrito menor extra em folhas de café. A: expressão do transcrito menor extra em folhas jovens das 3 plantas ACs, em MN e Et4. B: expressão do transcrito menor extra em folhas senescentes das 3 plantas ACs, em MN e Et4.

4.6 RACE PCR e sequenciamento

A fim de obter a sequência completa do cDNA correspondente ao gene da cafeína sintase, as extremidades 3'UTR e 5'UTR foram amplificadas por RACE-PCR. Os produtos obtidos foram purificados e inseridos em vetor de clonagem, a presença do inserto foi verificada através de digestão a 37°C com a enzima ECORI. Foi observada inserção dos fragmentos amplificados em 62 clones e estes foram sequenciados. A análise *in silico* das sequências revelou que estas podiam ser agrupados em 27 contigs mostrados na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5. Regiões 5'UTR e 3'UTR clonadas e número de clones obtidos

Região	Contigs	Número de clones
5'UTR AC1 Fruto	5Fr1	1
	5Fr2	1
	5Fr3	1
	5Fr4	1
	5Fr5	1
	5Fr6	8
	5Fr7	7
5'UTR AC1 Folha	5Fo1	3
	5Fo2	2
	5Fo3	4
	5Fo4	1
5'UTR MN Fruto	5Fr8	5
5'UTR MN Folha	5Fo5	2
	5Fo6	2
	5Fo7	1
3'UTR AC1 Fruto	3Fr1	4
	3Fr2	2
	3Fr3	1
	3Fr4	1
	3Fr5	2
3'UTR AC1 folha	3Fo1	4
	3Fo2	1
3'UTR MN Fruto	3Fr6	2
	3Fr7	1
3'UTR MN Folha	3Fo3	2
	3Fo4	1

	3Fo5	1
--	------	---

Os contigs foram comparados seguindo a seguinte regra: seqüências amplificadas a partir de folhas de AC1 foram comparadas com seqüências de frutos de AC1; seqüências amplificadas a partir de folhas MN foram comparadas com seqüências de frutos de MN. Depois, as seqüências de folhas de AC1 foram comparadas com seqüências de folhas de MN e as seqüências de frutos de AC1 foram comparadas as seqüências de frutos de MN e os resultados são mostrados abaixo:

- Comparação dos contigs 5'UTR_AC1Fruto com 5'UTR_AC1Folha (Figura 15)

O alinhamento das seqüências correspondentes à região anterior ao códon de iniciação de cada contig revelou que, todos contigs de 5'UTR AC1folha e três contigs de 5'UTR AC1fruto (5Fr1, 5Fr2 e 5Fr5) apresentaram uma inserção de 9 pares de bases "TATGTACAA". A seqüência dos contigs 5Fr1, 5Fr2 e 5Fr5 são idênticas à todas seqüências de 5'UTR Fo. Os demais contigs de 5'UTR frutos (5Fr6 e 5Fr7) apresentam algumas trocas de bases que só ocorrem nestes contigs. Já o contig 5Fr4 é muito semelhante aos contigs que contem a inserção de 9 bases, porém esta região está incompleta neste contig,. Observam-se ainda apenas duas alterações de bases nas seqüências de 5'UTR Fr5 e 5'UTR Fr2.

```

5AC1Fr2 -----TTAACGGACACCTTCTTTGGCAGTCTCAATTGATTTATGTACAAGTCCTGCATA 55
5AC1Fr7 GTAGAAAAACAGACACCTTCTTTAGCAGTCGCAATTGATT-----GTCCTGCATA 51
5AC1Fr1 -----TTAAGGGACACCTTCTTTGGCAGTCCCAATTTGATTTATGTACAAGTCCTGCATA 55
5AC1Fo2 -----ATGTACAAGTCCTGCATA 18
5AC1Fo4 -----CAAGTCCTGCATA 13
5AC1Fo3 -----AGGGACACCTTCTTTGGCAGTCCCAATTTGATTTATGTACAAGTCCTGCATA 52
5AC1Fo1 -AAAGGAAAGGGACACCTTCTTTGGCAGTCCCAATTTGATTTATGTACGAGTCCTGCATA 59
*****

5AC1Fr2 TGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCTGCGGATGAATGGAGGTGAAGGCGATACAAGCTACGCC 115
5AC1Fr7 TGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCTGCATATGAATGAAGGTGAAGGCGATACAAGCTACGCC 111
5AC1Fr1 TGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCTGCGGATGAATGGAGGCGAAGGCGATACAAGCTACGCC 115
5AC1Fo2 TGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCTGCGGATGAATGGAGGCGAAGGCGATACAAGCTACGCC 78
5AC1Fo4 TGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCTGCATATGAATGGAGGCGAAGGCGATACAAGCTACGCC 73
5AC1Fo3 TGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCTGCGGATGAATGGAGGCGAAGGCGATACAAGCTACGCC 112
5AC1Fo1 TGAATGGAGCTCCAAGAAGTCCTGCGGATGAATGGAGGCGAAGGCGATACAAGCTACGCC 119
*****

5AC1Fr2 AAGAATTCAGCCTACAATCATATGGTTTCATAACAAGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGC 175
5AC1Fr7 AAGAATGCATCCTACAATC---IGGCTCTTGCCAAGGTGAAACCTTTCCTTGAACAATGC 168
5AC1Fr1 AAGAATTCAGCCTACAATC---TGGCTCTTGCCAAGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGC 172
5AC1Fo2 AAGAATTCAGCCTACAATCAACTGGTTCTCGCCAAGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGC 138
5AC1Fo4 AAGAATTCATCCTTCAATCAACTGGTTCTCGCCAAGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGC 133
5AC1Fo3 AAGAATTCAGCCTACAATCAACTGGTTCTCGCCAAGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGC 172
5AC1Fo1 AAGAATTCAGCCTACAATCAACTGGTTCTCGCCAAGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGC 179
*****

5AC1Fr2 ATACAATAATTGTTGCGG----- 193
5AC1Fr7 ATACAAGAATTGTTGCGG----- 186
5AC1Fr1 ATACAAGAATTGTTGCGG----- 190
5AC1Fo2 GTACGGGAATTGTTGCGGGCCAACCTTGCCCAACATCAACAAGTGCATTAAAGTTGCGGAT 198
5AC1Fo4 GTAGGGGAATTGTTGCGGGCCAACCTTGCCCAACATCAACAAGTGCATTAAAGTTGCGGAT 193
5AC1Fo3 GTACGGGAATTGTTGCGGGCCAACCTTGCCCAACATCAACAAGTGCATTAAAGTTGCGGAT 232
5AC1Fo1 GTACGGGAATTGTTGCGGGCCAACCTTGCCCAACATCAACAAGTGCATTAAAGTTGCGGAT 239
** *****

5AC1Fr2 -----
5AC1Fr7 -----
5AC1Fr1 -----
5AC1Fo2 TTGGGATGCGCTTCTGGACCAAACACATTTT 229
5AC1Fo4 TTGGGATGCGCTTCTGGACCAAACACATTTT 224
5AC1Fo3 TTGGGATGCGCTTCTGGACCAAACACATTT- 262
5AC1Fo1 TTGGGATGCGCTTCTGGACCAAACACATTTT 270

```

Figura 15. Alinhamento dos clones 5'UTR AC1 Folha e 5'UTR AC1Frutos

- Comparação dos contigs 5'UTR_MNFr com 5'UTR_MN1Fo (Figura 16)

O alinhamento das sequências correspondentes às regiões anteriores ao códon de iniciação de cada contig revelou que os contigs Fo6, Fo7 e Fr8 apresentam a mesma inserção de 9 bases observada nos contigs de 5'UTR_AC1Fo e 5'UTR_AC1Fr. Duas

alterações que ocorrem de forma isolada nas sequências de Fo5 e Fo7 puderam ser constatadas

```

5MNFo5      ---AACAGACACCTTCTTTAGCAGTCGCAATTCGATT-----GTCCTGCATATGAA 48
5MNFo7      ----ACAGACACCTTCTTTAGCAGTCCCAATTCGATTTATGTACGAGCCCTGCATATGAA 56
5MNFr8      ATTAACAGATACCTTCTTTAGCAGTCCCAATTCGATTTATGCACAAGTCCTGCGTATGAA 60
5MNFo6      ---AACAGATACCTTCTTTAGCAGTCCCAATTCGATTTATGCACAAGTCCTGCGTATGAA 57
          ***** * *****

5MNFo5      TGGAGCTCCAAGCAGTCCTGCATATGAATGGAGGTGAAGGCGATACAAGCTACGCCAAGA 108
5MNFo7      TGGAGCTCCAAGAAGTCTGCATATGAATGGAGGCGAAGGCGATGCAAGCTACGCCAAGA 116
5MNFr8      TGGAGCTCCAAGAAGTCTGCATATGAATGGAGGCGAAGGCGATACAAGCTACGCCAAGA 120
5MNFo6      TGGAGCTCCAAGAAGTCTGCATATGAATGGAGGCGAAGGCGATACAAGCTACGCCAAGA 117
          *****

5MNFo5      ATTCACTCTACAATC---TGGCTCTTGCCCAAGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGCATAC 165
5MNFo7      GTTCATCCTTCAATCAACTGGTTCTGCCCAAGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGCGTAG 176
5MNFr8      ACTCATCTACAATC---TGTTCCTCATCAGGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGCATAC 177
5MNFo6      GCTCATCTACAATC---TGTTCCTCATCAGGGTGAAACCTGTCCTTGAACAATGCATAC 174
          ***** ** ** ** *****

5MNFo5      GAGAATTGTTGCGGGCCAACTTGCCCAACATCAACAAGTGCATTAAAGTTGCGGATTTGG 225
5MNFo7      GGGAATTGTTGCGGGCCAACTTGCCCAACATCAACAAGTGCATTAAAGTTGCGGATTTGG 236
5MNFr8      AAGAATTGTTGCGG----- 191
5MNFo6      AAGAATTGTTGCGGGCCAACTTGCCCAACATCAACAAGTGCATTAAAGTTGCGGATTTGG 234
          *****

5MNFo5      GATGCGCTTCTGGACCAAAACACATTTT 252
5MNFo7      GATGCGCTTCTGGACCAAAACACATTTT 263
5MNFr8      -----
5MNFo6      GATGCGCTTCTGGACCAAAACACATTTT 261

```

Figura 16. Alinhamento dos clones 5'UTR MN Folha e 5'UTR MN Fruto

- Comparação dos contigs 5'UTR_AC1Fr com 5'UTR_MNFR (Figura 17)

O alinhamento das sequências correspondentes às regiões anteriores ao códon de iniciação de cada contig (posição 60 da sequência de referência genômica) revelou que não há diferenças expressivas entre as regiões 5'-UTR isoladas a partir de AC1 e MN, além da já identificada inserção de 9 pares de base. São observadas variações de deleção/inserção de 3 pares de base nos contigs 5AC1Fr5, 5AC1Fr2 e 5AC1Fr3, após o códon de iniciação, portanto dentro da região codificadora.

variações de deleção/inserção de 3 pares de base nos contigs MNFo4, MNFo7, AC1Fo2, AC1Fo3 e AC1Fo1 após o códon de iniciação, portanto dentro da região codificadora.



Figura 18. Alinhamento dos clones 5'UTR MN Folha e 5'UTR AC1 Folha

- Comparação da região 3'UTR_AC1 com sequência de referência AC1 genômico e da região 3'UTR_MN com sequência de referência MN genômico (Figura 19)

O alinhamento das regiões 3'UTR com as sequências de referências utilizadas na síntese dos primers, revela que as sequências clonadas apresentam muitas diferenças. Provavelmente as regiões clonadas não são correspondentes ao gene da cafeína sintase.

```

3AC1Fr2 -----ATTCCCAGTATCCT----GCGATGAA-CATGCTAGAGC- 34
3AC1Fr5 -----ATCCCCAGTATCCT----GCGATGAA-CATGCTAGAGC- 34
3AC1Fr4 -----TATCCCCAGTATCCT----GCGATGAA-CATGCTAGAGC- 37
3AC1Fo2 CCGCGAATTTTCGCCCTTTATTTCCCAGTATCCT----GCGATGAA-CATGCTAGAGC 125
3AC1Fr1 -----ATTCCCAGTATCCT----GCGATGAA-CATGCTAGAGC- 34
3AC1Fr3 -----ATTCCCAGTATCCTCGCTGTATAGAA-CATGCTAGAGC- 38
3AC1Fo1 -----ATTCCCAGTATCCT----GCGATGAA-CATGCTAGAGC- 34
seq_ac1g CCGAATGCTCCTTACTTTTCATTTGCAAAAGAAGATGAA-TTCGGCAACCCGAATTCATGG 1019
          * * * * *

3AC1Fr2 -AGCGCATGTGGCATCTGTCTGTAGATCAGTTTACGAACCCATCC-TCCGAGGTCATTTT 92
3AC1Fr5 -AGCGCATGTGGCATCTGTCTGTAGATCAGTTTACGAACCCATCC-TCCGAGGTCATTTT 92
3AC1Fr4 AGCCCGCATGTGGCATCATTAAATAGATCAGTTTACGAACCCATCC-TAGCAAAGTCATTTT 96
3AC1Fo2 AGCCCGCATGTGGCATCATTAAATAGATCAGTTTACGAACCCATCCCTAGCAAAGTCATTTT 185
3AC1Fr1 -AGCGCATGTGGCATCATTAAATAGATCAGTTTACGAACCCATCC-TAGCAAAGTCATTTT 92
3AC1Fr3 -AGCGCATGTGGCATCATTAAATAGATCAGTTTACGAACCCATCC-TAGCAAAGTCATTTT 96
3AC1Fo1 -AGCGCATGTGGCATCATTAAATAGATCAGTTTACGAACCCATCC-TAGCAAAGTCATTTT 92
seq_ac1g ACTTACTTGAGATGTCATAAACGACTTGGTTTATGAGGTTATCATTTCCTGTCTATTT 1079
          * * * * *

3AC1Fr2 GGAGA--AGCTATTTTCCC--T-GACTT-ATCCCACAGGATTGAGAAGAA--TGCAGCAA 144
3AC1Fr5 GGAGA--AGCTATTTTCCC--T-GACTT-ATCCCACAGGATTGAGAAGAA--TGCAGCAA 144
3AC1Fr4 GGAGA--AGCTATTATACC--T-GACAT-ATCCCACAGGTTTCCGACGAA--TGCAGCAA 148
3AC1Fo2 GGAGA--AGCTATTATACC--TTGACATTATCCACAGGTTTCCGACGAAA--TGCAGCAA 240
3AC1Fr1 GGAGA--AGCTATTATACC--T-GACAT-ATCCCACAGGTTTCCGACGAA--TGCAGCAA 144
3AC1Fr3 GGAGA--AGCTATTATACC--T-GACAT-ATCCCACAGGTTTCCGACGAA--TGCAGCAA 148
3AC1Fo1 GGAGA--AGCTATTATACC--T-GACAT-ATCCCACAGGTTTCCGACGAA--TGCAGCAA 144
seq_ac1g GATGATCAGATGCTCGATCAGTTAGCTGGTTTATTCGGGTTTCTACCTTAGCTGCAAAAT 1139
          * * * * *

3AC1Fr2 AGGTTTTCCGCTC-GGGCAAAGGCTTT-TATGATAGTCTTATCATTTC----TCTCGCCA 198
3AC1Fr5 AGGTTTTCCGCTC-GGGCAAAGGCTTT-TATGATAGTTTTATCATTTC----TCTCGCCA 198
3AC1Fr4 AGGTTATCCGCTT-GGGCAAAGGCTTC-TATAATAATCTTATCATTTC----TCTCGCCA 202
3AC1Fo2 AGGTTATCCGCTT-GGGCAAAGGCTTC-TATAATAATCTTATCATTTC----TCTCGCCA 295
3AC1Fr1 AGGTTATCCGCTT-GGGCAAAGGCTTC-TATAATAATCTTATCATTTC----TCTCGCCA 198
3AC1Fr3 AGGTTATCCGCTT-GGGCAAAGGCTTC-TATAATAATCTTATCATTTC----TCTCGCCA 202
3AC1Fo1 AGGTTATCCGCTT-GGGCAAAGGCTTC-TATAATAATCTTATCATTTC----TCTCGCCA 198
seq_ac1g GGGAGCCAATTTATCCTCGTAACTTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1199
          * * * * *

3AC1Fr2 AAAAGCCAGAGAAGTCAGACATG--TAAAAGTTTGGTTTAAAGTTGGTTGCTGTTGTTG 256
3AC1Fr5 AAAACCCAGAGAAGTCAGACATG--TAAAAGTTTGGTTTAAAGTTGGTTGCTGTTGTTG 256
3AC1Fr4 AAAAACCAGAGAAGTCAGACATA--TAAAAGCTTGTTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTATGG 260
3AC1Fo2 AAAAACCAGAGAAGTCAGACATA--TAAAAGCTTGTTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTATGG 353
3AC1Fr1 AAAAACCAGAGAAGTCAGACATA--TAAAAGCTTGTTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTATGG 256
3AC1Fr3 AAAAACCAGAGAAGTCAGACATA--TAAAAGCTTGTTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTATGG 260
3AC1Fo1 AAAAACCAGAGAAGTCAGACATA--TAAAAGCTTGTTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTATGG 256
seq_ac1g TATCAGATGGTAGTAACCTTTAATTTGGAAGGTAGGTCACACAACTTCCAAATACAGTAA 1259
          * * * * *

3AC1Fr2 TTTGTTTTAGATATGGGAAAAGGATTTAACCGGTTTCGGGGTCTATG-GGGTATTGTAT 315
3AC1Fr5 TTTGTTTTAGATATGGGAAAAGGATTTAACCGGTTTCGGGGTCTATG-GGGTATTGTAT 315
3AC1Fr4 GTTGTTTTTGATACGGGGAAAAGGATTCAGTGCGGTTGGGGTCTATCCGAGTATTGTAC 320
3AC1Fo2 GTTGTTTTTGATACGGGGAAAAGGATTCAGTGCGGTTGGGGTCTATCCGAGTATTGTAC 413
3AC1Fr1 GTTGTTTTTGATACGGGGAAAAGGATTCAGTGCGGTTGGGGTCTATCCGAGTATTGTAC 316
3AC1Fr3 GTTGTTTTTGATACGGGGAAAAGGATTCAGTGCGGTTGGGGTCTATCCGAGTATTGTAC 320
3AC1Fo1 GTTGTTTTTGATACGGGGAAAAGGATTCAGTGCGGTTGGGGTCTATCCGAGTATTGTAC 316
seq_ac1g GATAATTCITTTCAAAGTTAGAAAATATAGGGGATTTAAATGT---CATCTATCTTTT 1316
          * * * * *

3AC1Fr2 TTTT-TAT-ATTATTTGGTGTATAATTATATTATATTATCTTATATTGTAGTAAA 373
3AC1Fr5 TTTT-TAT-ATTATTTGGTGTATAATTATATTATATTATCTTATATTGTAGTAAA 373
3AC1Fr4 TTTTATATTATTAGTTGGTGTATAATTAT--TATGTTACATTGTTATATTGGTAATAAA 378
3AC1Fo2 TTTTATATTATTAGTTGGTGTATAATTAT--TATGTTACATTGTTATATTGGTAATAAA 471
3AC1Fr1 TTTTATATTATTAGTTGGTGTATAATTAT--TATGTTACATTGTTATATTGGTAATAAA 374
3AC1Fr3 TTTTATATTATTAGTTGGTGTATAATTAT--TATGTTACATTGTTATATTGGTAATAAG 378
3AC1Fo1 TTTTATATTATTAGTTGGTGTATAATTAT--TATGTTACATTGTTATATTGGTAATAAA 374
seq_ac1g TTTCCCCCATT--TTGGT-TAAAAGGTTATGGAAAAATAATAAT--GAACATAA 1371
          * * * * *

3AC1Fr2 AGTGGCGTATAAGAATAAAAT-ITTTGACAAAAATA----- 408
3AC1Fr5 AGTGGCGTATAAGAATAAAAT-ITTTGACA----- 402
3AC1Fr4 AGTGACGTACAAAAATAAAATATTTTCATATATTGTAA----- 417
3AC1Fo2 AGTGACGTACAAAAATAAAATATTTTCAA----- 500
3AC1Fr1 AGTGACGTACAAAAATAAAATATTTTCATAAAA----- 407
3AC1Fr3 AGTGACGTACAAAAATAAAATATTTTCATAAAAACAAGAAGAG----- 422
3AC1Fo1 AGTGACGTACAAAAATAAAATATTTTCATAAAA----- 409
seq_ac1g AGC-ACAAGTAATAATAATATTTTCATATTTGAAATTAAGGAAAAAACTGTTCTGTTTTT 1430
          * * * * *

3AC1Fr2 -----
3AC1Fr5 -----
3AC1Fr4 -----
3AC1Fo2 -----
3AC1Fr1 -----
3AC1Fr3 -----
3AC1Fo1 -----
seq_ac1g TTTCTAGAGTTGACGTTTTAGCAAAATGGCTGATTTCCAAGTCTTGTACGTCAGTAAT 1490

3AC1Fr2 -----
3AC1Fr5 -----
3AC1Fr4 -----
3AC1Fo2 -----
3AC1Fr1 -----
3AC1Fr3 -----
3AC1Fo1 -----
seq_ac1g TCGAATTGACTTGTCTGATTGGCATATGTATGTATACAGGGGCATCTGGAGGAAGAAAAAT 1550

```

Figura19: Alinhamento sequência de 3' UTRFo e Fr com a sequência de referência

- Comparação da região 3'UTR_MN com sequência de referência MN genômico (Figura 20)

Nota-se que as sequências de MN são muito semelhantes a sequência de referência, sendo possível notar 7 trocas que ocorrem de forma isoladas e uma deleção também de forma isolada. Detaca-se a presença de uma sequência de 5 pares de bases que em Fo6, Fo5 e Fo3 é “GTTTG”, em Fo4 na mesma posição “GAGAAA” e em Fr7 “AACAC”. Porém estas últimas são sequências mais curtas e logo após estas 5 pares de bases começa a sequência de poli-A.

Mesmo as sequências de MN não apresentarem diferenças significativas e AC1 não parecer ser a extremidade faltante do gene da cafeína, as sequências foram submetidas as mesmas análises que a porção 5'UTR e os resultados estão dipostos nas figuras abaixo.

```

3MNFo3      TACCAAGGAAGATCCCATTCCCTGTATCCCTGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATG 102
3MNFo5      TACCAAGGAAGATCCCATTCCCTGTATC--TGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATG 100
3MNFo4      TACCAAGGAAGATCCCATTCCCTGTATCC-TGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATG 99
seq_mng     TACCAAGGAAGATCCCATTCCCTGTATCC-TGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATG 1737
3MNFr6      -----AAGATCCCATTCCCCAGTATCC-TGCGATGACACATGCTAGAGCAGCGCATG 51
3MNFr7      -----AAGATCCCATTCCCCAGTATCC-TGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATG 50
              *****
              *****

3MNFo3      TGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTA 162
3MNFo5      TGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTA 160
3MNFo4      TGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTA 159
seq_mng     TGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTA 1797
3MNFr6      TGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTA 111
3MNFr7      TGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTA 110
              *****

3MNFo3      TTTTACCTGACTTATCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCA 222
3MNFo5      TTTTACCTGACTTATCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCA 220
3MNFo4      TTTTACCTGACTTATCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCA 219
seq_mng     TTTTACCTGACTTATCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCA 1857
3MNFr6      TTTTACCTGACTTATCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCA 171
3MNFr7      TTTTACCTGGCTTATCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCA 170
              *****

3MNFo3      AAGGCTTCTATGATAGTGTATCATTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGT 282
3MNFo5      AAGGCTTCTATGATAGTGTATCATTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGT 280
3MNFo4      AAGGCTTCTATGATAGTGTATCATTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGT 279
seq_mng     AAGGCTTCTATGATAGTGTATCATTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGT 1917
3MNFr6      AAGGCTTCTATGATAGTGTATCATTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGT 231
3MNFr7      AAGGCTTCTATGATAGTGTATCATTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGT 230
              *****

3MNFo3      AAAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTAGATATGGGAAAGGAT 342
3MNFo5      AAAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTAGATATGGGAAAGGAT 340
3MNFo4      AAAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTAGATATGGGAAAGGAT 339
seq_mng     AAAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTAGATATGGGAAAGGAT 1977
3MNFr6      AAAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTAGATATGGGAAAGGAT 291
3MNFr7      AAAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTTTGTTTTAGATATGGGAAAGGAT 290
              *****

3MNFo3      TTAATGCGGTTGGGGTCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTTGGTGTATGATTAT 402
3MNFo5      TTAATGCGGTTGGGGTCCATCGGGTATTGTACTTTTTGTATTATTTGGTGTATGATTAT 400
3MNFo4      TTAATGCGGTTGGGGTCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTTGGTGTATGATTAT 399
seq_mng     TTAATGCGGTTGGGGTCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTTGGTGTATGATTAT 2037
3MNFr6      TTAATGCGGTTGGGGTCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTTGGTGTATGATTAT 351
3MNFr7      TTAATGCGGTTGGGGTCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTTGGTGTATGATTAT 350
              *****

3MNFo3      ATTGTATTATTATTTGTATTGTAAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAAGATGTTTGACAT 462
3MNFo5      ATTGTATTATTATTTGTATTGTAAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAAGATGTTTGACAT 460
3MNFo4      ATTGTATTATTATTTGTATTGTAAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAA-ATGAGAAAAA- 457
seq_mng     ATTGTATTATTATTTGTATTGTAAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAAGATGTTTGACAT 2097
3MNFr6      ATTGTATTATTATTTGTATTGTAAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAAGATGTTTGACAT 411
3MNFr7      ATTGTATTATTATTTGTATTGAAATAAAAAGTGGAGTACTTGATTAA-ATAACACAAAA 409
              *****

3MNFo3      ATATTTAATAACAATAA----- 478
3MNFo5      ATATTTAATAACAATAA----- 476
3MNFo4      -----
seq_mng     ATATTTAATACAAAAAAAAAAAAA----- 2121
3MNFr6      ATATTTAATACAAAAAAAAAAAAA----- 437
3MNFr7      AAAAA----- 455

```

Figura 20: Alinhamento 3' UTR Folha e Fruto com sequência de MN genômico


```

3MNFo4 --TTTATGCCCC-TTATGATGCTGGCTTCTCTATTGATGATGATTACCAAGGAAGATCCC 57
3MNFo5 -TTTTATGCCCCATTATGATGCTGGCTTCTCTATTGATGATGATTACCAAGGAAGATCCC 59
3MNFo3 TTTTAAAGCCCC-TTATGATGCTGGCTTCTCTATTGATGATGATTACCAAGGAAGATCCC 59
3MNFr6 -----AAGATCCC 8
3MNFr7 -----AAGATCCC 8
*****

3MNFo4 ATCCCTGTATCC-TGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATGTGGCAICTGTCGTTAG 115
3MNFo5 ATCCCTGTATCC-TGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATGTGGCAICTGTCGTTAG 116
3MNFo3 ATCCCTGTATCCCTGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATGTGGCAICTGTCGTTAG 118
3MNFr6 ATCCCTGATATCC-TGCGATGACACATGCTAGAGCAGCGCATGTGGCAICTGTCGTTAG 67
3MNFr7 ATCCCTGATATCC-TGCGATGA-ACATGCTAGAGCAGCGCATGTGGCAICTGTCGTTAG 66
***** ***** *****

3MNFo4 ATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTACCTGACTIATC 175
3MNFo5 ATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTACCTGACTIATC 176
3MNFo3 ATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTACCTGACTIATC 178
3MNFr6 ATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTACCTGACTIATC 127
3MNFr7 ATCAATTTACGAACCCATCCTCGCGAGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTACCTGGCTIATC 126
***** *****

3MNFo4 CCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCAAAGGCTTCTATGATAG 235
3MNFo5 CCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCAAAGGCTTCTATGATAG 236
3MNFo3 CCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCAAAGGCTTCTATGATAG 238
3MNFr6 CCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCAAAGGCTTCTATGATAG 187
3MNFr7 CCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCAAAGGCTTCTATGATAG 186
*****

3MNFo4 TGTTATCAITTTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGTAAGGTTTGTITTTAG 295
3MNFo5 TGTTATCAITTTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGTAAGGTTTGTITTTAG 296
3MNFo3 TGTTATCAITTTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGTAAGGTTTGTITTTAG 298
3MNFr6 TGTTATCAITTTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGTAAGGTTTGTITTTAG 247
3MNFr7 TGTTATCAITTTCTCTCGCCAAAAGCCGGAGAAGGCAGACATGTAAGGTTTGTITTTAG 246
*****

3MNFo4 TTGGTTTTTGTGTTGTGGTTTGTITTTAGATAITGGGAAAGGATTTAATGCGGTTGGGGG 355
3MNFo5 TTGGTTTTTGTGTTGTGGTTTGTITTTAGATAITGGGAAAGGATTTAATGCGGTTGGGGG 356
3MNFo3 TTGGTTTTTGTGTTGTGGTTTGTITTTAGATAITGGGAAAGGATTTAATGCGGTTGGGGG 358
3MNFr6 TTGGTTTTTGTGTTGTGGTTTGTITTTAGATAITGGGAAAGGATTTAATGCGGTTGGGGG 307
3MNFr7 TTGGTTTTTGTGTTGTGGTTTGTITTTAGATAITGGGAAAGGATTTAATGCGGTTGGGGG 306
*****

3MNFo4 TCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTGGTGTATGATTATATTGTATTATTATTTT 415
3MNFo5 TCCATCGGGTATTGTACTTTTTGTATTATTGGTGTATGATTATATTGTATTATTATTTT 416
3MNFo3 TCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTGGTGTATGATTATATTGTATTATTATTTT 418
3MNFr6 TCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTGGTGTATGATTATATTGTATTATTATTTT 367
3MNFr7 TCCATCGGGTATTGTACTTTTTATATTATTGGTGTATGATTATATTGTATTATTATTTT 366
*****

3MNFo4 GTATTTGAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAA-ATGAGAAAAA----- 457
3MNFo5 GTATTTGAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAAGATGTTTGACATATATTTAATACAATAA 476
3MNFo3 GTATTTGAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAAGATGTTTGACATATATTTAATACAATAA 478
3MNFr6 GTATTTGAATAAAAAGTGGCGTACAAGAATAAGATGTTTGACATATATTTAATACAATAA 427
3MNFr7 GTATTTGAATAAAAAGTGGGACTTGTATTAA-ATAACAAAAAATAATTATTCTCT 425
***** ***** ***** ** * * * * *

3MNFo4 -----
3MNFo5 -----
3MNFo3 -----
3MNFr6 AAAAAAAAAA----- 437
3MNFr7 GTTATGCCGTTACGAATCGAATCGTTGAAA 455

```

Figura 22. Alinhamento dos clones 3'UTR MN Fruto e 3'UTR MN Folha

- Comparando 3'UTR_MNFo com 3'UTR_AC1Fo (Figura 23)

```

3MNFo3 -----TTTAAATGCCCC-TTATGATGCTGGCTTCT 29
3MNFo5 -----TTTTATGCCCCATTATGATGCTGGCTTCT 29
3MNFo4 -----TTTATGCCCC-TTATGATGCTGGCTTCT 27
3AC1Fo7 -----
3AC1Fo8 GTTTGTAAATATCGACCGCCAGTGAIITGTTAATTACGACTCACTATTAGGCGAATTTGA 60

3MNFo3 CTATTGATGATGATTACCAAGGAAGATCCCATTCCCCTGTATCCCTGCGATGAACATGCT 89
3MNFo5 CTATTGATGATGATTACCAAGGAAGATCCCATTCCCCTGTATC--TGCGATGAACATGCT 87
3MNFo4 CTATTGATGATGATTACCAAGGAAGATCCCATTCCCCTGTATCC-TGCGATGAACATGCT 86
3AC1Fo7 -----ATTCCCAGTATCC-TGCGATGAACATGCT 29
3AC1Fo8 AITTAGCGGCCCGCGAAITTTTCGCCCTTTAATTTCCCAGTATCT-TGCGATGAACATGCT 119
*****

3MNFo3 AGAGC--AGCGCATGTGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCC-TCGCGAGT 146
3MNFo5 AGAGC--AGCGCATGTGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCC-TCGCGAGT 144
3MNFo4 AGAGC--AGCGCATGTGGCATCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCC-TCGCGAGT 143
3AC1Fo7 AGAGC--AGCGCATGTGGCATCATTAAATTAGATCAGTTTACGAACCCATCC-TAGCAAGT 86
3AC1Fo8 AGAGCCAGGCGCATGTGGCATCATTAAATTAGATCAGTTTACGAACCCATCCCTAGCAAGT 179
*****

3MNFo3 CAITTTGGAGAAGCTATTTTACCT-GAC-TTATCCACAGGATTGCGAAGAA-TGCAGCA 203
3MNFo5 CAITTTGGAGAAGCTATTTTACCT-GAC-TTATCCACAGGATTGCGAAGAA-TGCAGCA 201
3MNFo4 CAITTTGGAGAAGCTATTTTACCT-GAC-TTATCCACAGGATTGCGAAGAA-TGCAGCA 200
3AC1Fo7 CAITTTGGAGAAGCTATTTTACCT-GACAT-ATTCCACAGGTTTGCAGCAA-TGCAGCA 143
3AC1Fo8 CAITTTGGAGAAGCTATTTTACCTTGACATTTTCCACAGGTTTGCAGCAAATGCAGCA 239
*****

3MNFo3 GCCGGAGAAGGCAGACATGTAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTGTT 322
3MNFo5 GCCGGAGAAGGCAGACATGTAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTGTT 320
3MNFo4 GCCGGAGAAGGCAGACATGTAAGTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTGTTGTTGTT 319
3AC1Fo7 ACCAGAGAAGTCAGACATATAAAGCTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTATGGGTTGTT 262
3AC1Fo8 ACCAGAGAAGTCAGACATATAAAGCTTGTTTTAGTTGGTTTTGTGTTATGGGTTGTT 359
**

3MNFo3 TTTAGATATGGGAAAGGATTTAATGCGGTTGGGGTCCATC-GGGTATTGTACTTTTTA 381
3MNFo5 TTTAGATATGGGAAAGGATTTAATGCGGTTGGGGTCCATC-GGGTATTGTACTTTTTG 379
3MNFo4 TTTAGATATGGGAAAGGATTTAATGCGGTTGGGGTCCATC-GGGTATTGTACTTTTTA 378
3AC1Fo7 TTCTGATACGGGAAAGGATTCAGTGCAGTTGGGTTCTATCCGAGTATTGTACTTTTTA 322
3AC1Fo8 TTCTGATACGGGAAAGGATTCAGTGCAGTTGGGTTCTATCCGAGTATTGTACTTTTTA 419
**

3MNFo3 TATTATT--IGGTGTATGATTATATTGTAATTATTATTTGTATTGTAATAAAAGTGGC 438
3MNFo5 TATTATT---IGGTGTATGATTATATTGTAATTATTATTTGTATTGTAATAAAAGTGGC 436
3MNFo4 TATTATT--IGGTGTATGATTATATTGTAATTATTATTTGTATTGTAATAAAAGTGGC 435
3AC1Fo7 TATTATTAGTTGGTGTATAATTA--TTATGTTACATTGTTATATTGTAATAAAAGTGGC 380
3AC1Fo8 TATTATTAGTTGGTGTATAATTA--TTATGTTACATTGTTATATTGTAATAAAAGTGGC 477
*****

3MNFo3 GTACAAGAATAAGATGTTTGACATATATTTAATACAATAA 478
3MNFo5 GTACAAGAATAAGATGTTTGACATATATTTAATACAATAA 476
3MNFo4 GTACAAGAATAA-ATGAGAAAA----- 457
3AC1Fo7 GTACAAAAATAAAATATTTTCATAAAAA----- 409
3AC1Fo8 GTACAAAAATAAAATATTTTCAA----- 500
*****

```

Figura 23. Alinhamento dos clones 3'UTR MN Folha e 3'UTR AC1 Folha

- Comparando 3'UTR_MNFr com 3'UTR_AC1Fr (Figura 24)

```

3AC1Fr2 -----ATCCCCAGTATCCT-GCG--ATGA-ACATGCTAGAGCAGC-GCATGTGGCA 47
3AC1Fr5 -----ATCCCCAGTATCCT-GCG--ATGA-ACATGCTAGAGCAGC-GCATGTGGCA 47
3MNF7  AAGATCCCAITCCCCAGTATCCT-GCG--ATGA-ACATGCTAGAGCAGC-GCATGTGGCA 55
3MNF6  AAGATCCCAITCCCCAGTATCCT-GCG--ATGACACATGCTAGAGCAGC-GCATGTGGCA 56
3AC1Fr1 -----ATCCCCAGTATCCT-GCG--ATGAA-CAIGCTAGAGCAGC-GCATGTGGCA 47
3AC1Fr4 -----TATCCCCCAGTATCCT-GCG--ATGAATCATGTTAGAGCAGCCGCATGTGGCA 51
3AC1Fr3 -----ATCCCCAGTATCCTCGCTGATAGAACATGCTAGAGCAGC-GCATGTGGCA 51
          * * * * *
          * * * * *

3AC1Fr2 TCTGTCGTTAGATCAGTTTACGAACCCATCCTCGCAGGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTC 107
3AC1Fr5 TCTGTCGTTAGATCAGTTTACGAACCCATCCTCGCAGGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTC 107
3MNF7  TCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCAGGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTA 115
3MNF6  TCTGTCGTTAGATCAATTTACGAACCCATCCTCGCAGGTCATTTTGGAGAAGCTATTTTA 116
3AC1Fr1 TCATTAATTAGATCAGTTTACGAACCCATCCTAGCAAGTCATTTTGGAGAAGCTATTATA 107
3AC1Fr4 TCATTAATTAGATCAGTTTACGAACCCATCCTAGCAAGTCATTTTGGAGAAGCTATTATA 111
3AC1Fr3 TCATTAATTAGATCAGTTTACGAACCCATCCTAGCAAGTCATTTTGGAGAAGCTATTATA 111
          ** * * * * *

3AC1Fr2 CCTGACTTATCCCACAGGATTGAGAAGAATGCAGCAAAGGTTTTCCGCTCGGGCAAAGGC 167
3AC1Fr5 CCTGACTTATCCCACAGGATTGAGAAGAATGCAGCAAAGGTTTTCCGCTCGGGCAAAGGC 167
3MNF7  CCTGGCTTATCCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCAAAGGC 175
3MNF6  CCTGACTTATCCCACAGGATTGCGAAGAATGCAGCAAAGGTTCTCCGCTCGGGCAAAGGC 176
3AC1Fr1 CCTGACATATCCCACAGGTTTGGCAGCAATGCAGCAAAGGTTATCCGCTTGGGCAAAGGC 167
3AC1Fr4 CCTGACATATCCCACAGGTTTGGCAGCAATGCAGCAAAGGTTATCCGCTTGGGCAAAGGC 171
3AC1Fr3 CCTGACATATCCCACAGGTTTGGCAGCAATGCAGCAAAGGTTATCCGCTTGGGCAAAGGC 171
          **** * * * * *

3AC1Fr2 TTTTATGATAGTCTTATCATTCTCTCGCCAAAAAGCCAGAGAAGTCAGACATGTAAAAG 227
3AC1Fr5 TTTTATGATAGTTTTATCATTCTCTCGCCAAAAACCCAGAGAAGTCAGACATGTAAAAG 227
3MNF7  TTCTATGATAGTGTATCATTCTCTCGCCAAAAAGCCGAGAAGGCAGACATGTAAAAG 235
3MNF6  TTCTATGATAGTGTATCATTCTCTCGCCAAAAAGCCGAGAAGGCAGACATGTAAAAG 236
3AC1Fr1 TTCTATAATAATCTTATCATTCTCTCGCCAAAAACCCAGAGAAGTCAGACATATAAAAG 227
3AC1Fr4 TTCTATAATAATCTTATCATTCTCTCGCCAAAAACCCAGAGAAGTCAGACATATAAAAG 231
3AC1Fr3 TTCTATAATAATCTTATCATTCTCTCGCCAAAAACCCAGAGAAGTCAGACATATAAAAG 231
          ** * * * * *

3AC1Fr2 TTTGCTTTAAGTTGGTTGTCGTTGTTGTTGTTTTAGATATGGGGAAAGGATTTAAC 287
3AC1Fr5 TTTGCTTTAAGTTGGTTGTCGTTGTTGTTGTTTTAGATATGGGGAAAGGATTTAAC 287
3MNF7  TTTGTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTGTTGTTTTAGATATGGGGAAAGGATTTAAT 295
3MNF6  TTTGTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTGTTGTTTTAGATATGGGGAAAGGATTTAAT 296
3AC1Fr1 CTTGTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTATGGGTTGTTTTTGATACGGGGAAAGGATTCAGT 287
3AC1Fr4 CTTGTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTATGGGTTGTTTTTGATACGGGGAAAGGATTCAGT 291
3AC1Fr3 CTTGTTTTAGTTGGTTTTTGTGTTATGGGTTGTTTTTGATACGGGGAAAGGATTCAGT 291
          *** ** * * * * *

3AC1Fr2 GCGGTTGCGGGTCTATG-GGGTATTGTATTTTTT--ATATTATTGGTGTATAAATTATA 344
3AC1Fr5 GCGGTTGCGGGTCTATG-GGGTATTGTATTTTTT--ATATTATTGGTGTATAAATTATA 344
3MNF7  GCGGTTGCGGGTCCATC-GGGTATTGTACTTTTT--ATATTATTGGTGTATGATTATA 351
3MNF6  GCGGTTGCGGGTCCATC-GGGTATTGTACTTTTT--ATATTATTGGTGTATGATTATA 352
3AC1Fr1 GCGGTTGCGGGTCTATCCGAGTATTGTACTTTTTTATATTATTAGTTGGTGTATAAATTAT- 346
3AC1Fr4 GCGGTTGCGGGTCTATCCGAGTATTGTACTTTTTTATATTATTAGTTGGTGTATAAATTAT- 350
3AC1Fr3 GCGGTTGCGGGTCTATCCGAGTATTGTACTTTTTTATATTATTAGTTGGTGTATAAATTAT- 350
          ***** ** * * * * *

3AC1Fr2 TTATATTATTATCTTATATTTGTAGTAAAAGTGGCGTATAAGAATAAAATTTTTGACAAA 404
3AC1Fr5 TTATATTATTATCTTATATTTGTAGTAAAAGTGGCGTATAAGAATAAAATTTTTGACA-- 402
3MNF7  TTGTAATTATTATTTGTATTTGAAATAAAAGTGGAGTACTTGATTAATAACCAAAAAA 411
3MNF6  TTGTAATTATTATTTGTATTTGTAATAAAAGTGGCGTACAAGAATAAGATGTTTGACATA 412
3AC1Fr1 -TATGTTACATTGTTATATTGTAATAAAAGTGGAGTACTTGATTAATAACCAAAAAA 405
3AC1Fr4 -TATGTTACATTGTTATATTGTAATAAAAGTGGAGTACTTGATTAATAACCAAAAAA 409
3AC1Fr3 -TATGTTACATTGTTATATTGTAATAAGAGTGACGTACAAAAATAAAATATTTTCATAA 409
          * * * * *

3AC1Fr2 AATA----- 408
3AC1Fr5 -----
3MNF7  AATAATTATTCTCTGTTATGCGGTTACGAATCGAATCGTTGAAA 455
3MNF6  TATT-TAATACAAAAA----- 437
3AC1Fr1 AA----- 407
3AC1Fr4 AITTGTA----- 417
3AC1Fr3 AAACAAGAAGAG----- 422

```

Figura 24. Alinhamento dos clones 3'UTR AC1Fr e 3'UTR MN Fruto

5. Discussão

5.1 Expressão do gene da cafeína sintase em folhas de café

Como ressaltado anteriormente, métodos que acelerem o processo de melhoramento clássico do café vêm sendo buscados. No caso do cafeeiro descafeinado, uma forma de acelerar a seleção de plantas sem cafeína em frutos seria fazer a seleção precoce das progênies a partir do teor de cafeína em folhas. Dessa maneira, não seria necessário esperar a planta produzir frutos, o que leva em média 4 anos, para selecionar a característica desejada. No entanto análises demonstram que o teor de cafeína nas folhas não apresenta co-relação direta com o teor de cafeína em frutos (Silvarolla, comunicação pessoal). Neste contexto, o objetivo desta dissertação foi avaliar aspectos moleculares da expressão de genes da via biossintética de cafeína em folhas, tanto de plantas com teores normais de cafeína quanto de plantas descafeinadas. A partir destas análises pretendeu-se verificar se ocorrem diferenças na regulação destes genes que possam estar associadas com diferenças no padrão de acúmulo de cafeína em frutos e folhas.

Em 1979, Raju e Gopal descreveram que a cafeína é encontrada em todas as partes do cafeeiro, porém com mais abundância nas flores, nas sementes e nas folhas mais novas. Estudos posteriores conduzidos por Ashirara e colaboradores (1996) revelaram que o catabolismo em folhas de café é muito semelhante ao de frutos, sendo que frutos maduros e folhas velhas têm as menores quantidades de cafeína, enquanto que folhas novas e frutos imaturos têm as maiores. Tal fato pode ser decorrente da diminuição da taxa de síntese e aumento da degradação da cafeína em frutos maduros e folhas velhas, ocorrendo o inverso em folhas novas e frutos imaturos (Ashirara, 1999).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os dados descritos por Raju e Gopal (1979) e Ashirara e colaboradores (1996). No nosso caso, as análises em

PCR quantitativo revelaram maior acúmulo de transcritos do gene da cafeína sintase em folhas jovens que em folhas senescentes de plantas MN, AC1, AC2 e AC3, indicando, portanto, maior expressão deste gene em folhas jovens. Uma exceção para este padrão foi observada apenas em folhas do acesso ET4 senescente que apresentaram elevado acúmulo de transcritos, comparado ao acúmulo de transcritos em folhas jovens.

Os resultados obtidos neste estudo referentes aos níveis de expressão do gene da cafeína sintase ao longo do desenvolvimento de folhas corroborou parcialmente o estudo de expressão desse mesmo gene ao longo do desenvolvimento de frutos de café realizado anteriormente (Maluf et al., 2009). Além disso, o padrão de expressão do gene da cafeína sintase nas folhas jovens de plantas adultas avaliadas aqui estão correlacionadas com o teor do alcalóide nas futuras sementes a serem produzidas.

Os resultados obtidos criaram a expectativa de se correlacionar a presença do transcrito menor extra com a não síntese de cafeína em folhas como descrito em frutos por Maluf *et al.* (2009), viabilizando assim o uso desse transcrito como ferramenta de seleção para a característica “descafeinado”, e acelerando a resposta do melhoramento clássico. Porém o resultado obtido através da análise de PCR semiquantitativo revelou a presença do transcrito menor extra em folhas jovens de plantas apenas em AC1, AC3 e ET4, e em folhas senescentes de plantas MN, AC1, AC2, AC3 e ET4. O fato que em AC2, mutante descafeinado, as folhas jovens não apresentam o referido transcrito, e que o mesmo está presente em folhas jovens de ET4, que tem teor normal de cafeína, parece sugerir uma regulação diferencial entre folhas e frutos. Nesse caso, pode-se concluir que a presença do transcrito menor extra não está relacionada com a não-síntese de cafeína em folhas.

É importante notar que, a planta ET4 apresentou comportamento variável durante os diferentes experimentos, mostrando-se mais influenciável pelas variações

nutricionais e climáticas que as demais plantas. Tal susceptibilidade pode ter sido resultado de efeito pleiotrópico condicionado pela expressão diferencial deste transcrito menor extra. No entanto, estudos mais detalhados necessitariam ser conduzidos para comprovar esta hipótese.

Outro aspecto importante está relacionado com as mutações observadas na região codificadora do gene cafeína sintase de plantas AC. Foram relatadas pelo menos duas alterações importantes relacionadas com o gene da cafeína sintase em AC1: uma implica na redução dos níveis de expressão do gene e a outra é um SNP no exon 3 no aminoácido 266 em que ocorre a troca de uma isoleucina para uma valina, que possivelmente afeta a atividade da enzima. Tais mutações são consideradas “chave” na determinação do mutante descafeinado. O acesso ET4, por ser da mesma progênie das plantas ACs, pode apresentar a mutação relacionada com o nível de expressão do gene, mas não a mutação da atividade da enzima, o que pode explicar as variações encontradas nos experimentos.

5.2 Expressão das enzimas da via de biossíntese da cafeína-Metilxantosina e Teobromina

Outra forma de correlacionar o teor de cafeína em frutos é investigar os níveis de expressão de outras enzimas envolvidas na via de biossíntese da cafeína como a metilxantosina sintase e a teobromina sintase.

Testes de PCR quantitativo revelaram um maior acúmulo de transcritos do gene da metilxantosina sintase em AC1, AC2, AC3 e ET4 que em MN, o que indica alto nível de expressão do gene nestas plantas. Verificou-se também que essas mesmas plantas apresentaram baixo acúmulo de transcritos do gene da teobromina sintase se

comparado com MN, indicando baixa expressão do gene nas plantas. Como era previsto, observou-se também que as plantas AC1, AC2, AC3 e Et4 apresentam baixo acúmulo de transcritos de cafeína comparado ao MN. Tais resultados sugerem que as plantas AC1, AC2, AC3 e ET4 têm menor expressão do gene da cafeína comparado ao MN, sendo que AC1 apresenta a menor expressão e o ET4 apresenta uma expressão pouco mais baixa que MN. O aumento da expressão do gene da metilxantosina sintase, e baixa expressão do gene da teobromina sintase, corroboram o trabalho de Silvarolla *et al.* (2004), no qual os autores verificaram o acúmulo de teobromina nas plantas ACs. Por apresentarem alto acúmulo de teobromina nos frutos, as plantas ACs parecem apresentar um mecanismo de *feedback* que seria capaz de reprimir a expressão do gene da teobromina sintase, suprimindo também a expressão do gene da metilxantosina sintase. O trabalho publicado por Maluf e colaboradores em 2009 também sugeriu a possibilidade de ocorrência de um mecanismo de *feedback* em frutos.

5.3 O transcrito menor extra em folhas

Como já mencionado, Maluf e colaboradores (2009) descreveram a presença de um transcrito menor extra em frutos de café. Estes autores cogitaram a possibilidade deste transcrito ser fruto de *splicing* alternativo do transcrito normal da cafeína sintase, tendo essa hipótese sido elaborada com base na presença dos exons 1 e 3 do gene da cafeína sintase no transcrito menor extra. Nesse caso, durante o processamento alternativo, os introns 1 e 2 seriam processados juntamente com parte do exon 3 (Figura 24).

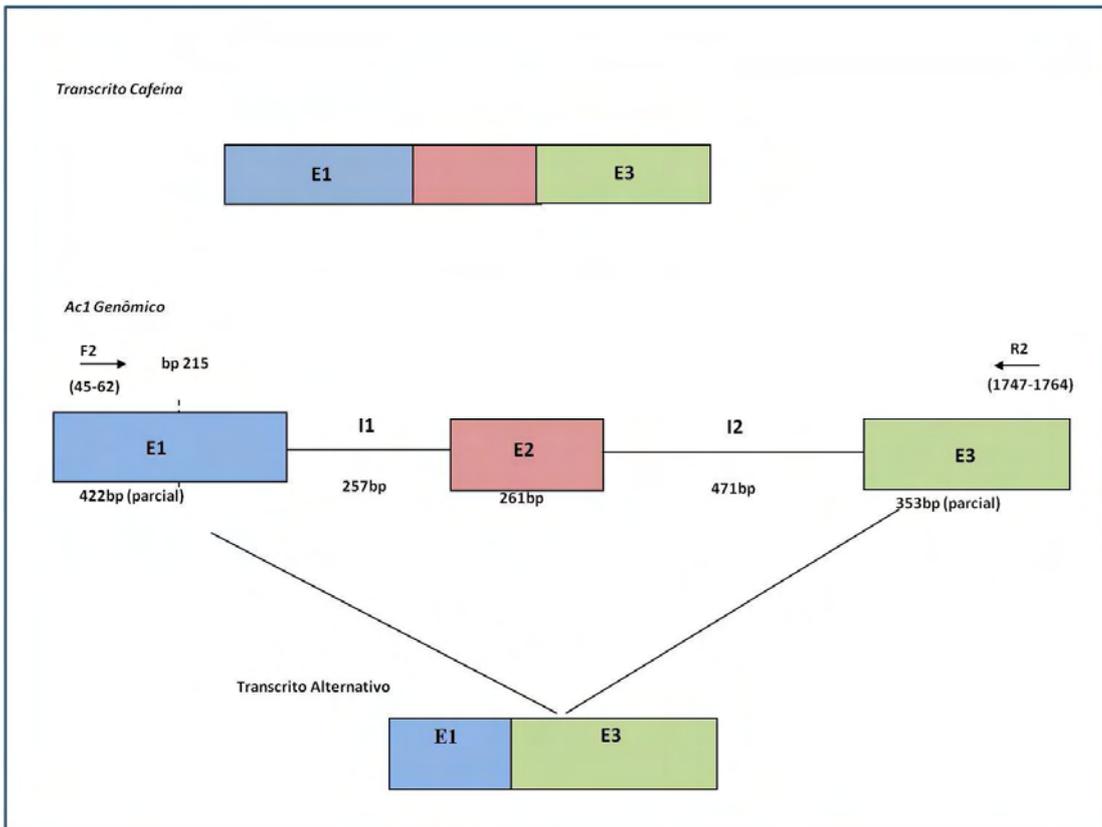


Figura 25: Representação esquemática do gene da cafeína sintase em plantas AC1 (clone genômico), do transcrito normal (E1/E2/E3) e do transcrito alternativo (E1/E3). Os exons (E) são representados pelos retângulos e os Introns (I) pelas linhas, com o tamanho de cada região expresso pares de bases (pb). A posição dos primers (F2 e R2) utilizados na amplificação do transcrito extra está indicada por setas.

A comparação da sequência de nucleotídeos do transcrito menor extra da cafeína sintase clonado de plantas AC1 com a sequência do transcrito maior de plantas MN revelou que, apesar de muito semelhantes, as duas sequências apresentam algumas diferenças pontuais bem como uma troca de base que foi considerada uma mutação chave (Maluf *et al.*, 2009). Devido à presença destas mutações, os autores propuseram que o transcrito menor extra poderia ser produto de expressão de outro alelo do gene da cafeína sintase. Objetivando desvendar tal questão, no presente trabalho foram realizados diversos ensaios de Southern blot empregando DNA genômico de café. Entretanto, o uso de sonda não radioativa não se mostrou eficiente e específico, impossibilitando a obtenção de resultados conclusivos. Diante de tal obstáculo, optou-se

por desenhar um par de *primers* específicos que fosse capaz de amplificar o transcrito menor extra a partir de DNA genômico e de amostras de cDNA. Nesse caso, a análise via PCR revelou a amplificação de um produto único em amostras de DNA genômico e de cDNA provenientes de plantas AC1, sendo o mesmo fragmento (mesmo tamanho e intensidade) amplificado em amostras de DNA genômico e cDNA obtidas de plantas MN. Estes resultados sugerem que o transcrito menor extra é fruto de outro alelo do gene da cafeína sintase.

A suposta existência de outro alelo sustenta a idéia discutida no tópico anterior de que a presença deste alelo pode influenciar na expressão do gene da cafeína sintase. Em frutos maduros ele estaria diretamente ligado a não-síntese de cafeína, enquanto que em folhas ele teria um modo de ação diferente. A forma com que este transcrito pode interferir com a expressão do gene da cafeína pode estar ligada ao número de cópias presente no genoma. Essa questão, entretanto, precisa ser mais bem estudada, podendo ser desvendada com a utilização de PCR em tempo real utilizando sonda TaqMan® específica para cada alelo.

5.4 Análise nos mutantes *Semperflorens* e *Abramulosa 1 e 2*

Como ressaltado na introdução, os mutantes descafeinados ACs apresentam características fenotípicas incomuns a *C. arabica*, dentre as quais podem ser citadas: as folhas menores apresentando as vezes dois ápices; sistema complexo de ramificação com ramos mais curtos; padrão de florescimento anormal; baixa produção e plantas menos vigorosas. Tais características já foram relatadas anteriormente em outros mutantes, como os mutantes *Semperflorens* e *Abramulosas 1 e 2*. (Tabela 6).

Tabela 6. Características fenotípicas observadas em mutantes *Semperflorens* e *Abramulosa* 1 e 2 (segundo Carvalho *et al.*, 1991)

Mutante	Características
<i>Semperflorens</i>	Florescimento quase contínuo, plantas bem enfolhadas, folhas menores com coloração verde mais intensa, ramos mais curtos e certa resistência a seca.
<i>Abramulosa</i> 1	Maior número de ramos laterais, folhas de forma anormal, gema da haste principal afetada e ramos laterais semelhantes a ramos podados.
<i>Abramulosa</i> 2	Folhas nas mudas são mais longas, têm forma anormal, e às vezes mostram dois ápices. A haste nova e os ramos laterais são anormais no desenvolvimento resultando um sistema complexo de ramificação.

Segundo uma revisão realizada por Ashihara e Suzuki (2004), a função da cafeína em plantas ainda é indeterminada, existindo a hipótese de defesa química para proteger o tecido jovem de predadores como larva de insetos. Entretanto, estudos conduzidos no Instituto Agronômico de Campinas mostraram que as plantas ACs apresentam o mesmo grau de infestação por bicho-mineiro que plantas com teores normais de cafeína (dados não publicados). Uma segunda hipótese aventada é que a cafeína exerceria algum papel na arquitetura da planta, e nesse caso, os mutantes *Semperflorens* e *Abramulosa* 1 e 2 pela suas características fenotípicas constituiriam modelos interessantes de estudo. Assim, a expressão do gene da cafeína sintase nesses mutantes foi avaliada via PCR quantitativo, sendo a presença do transcrito menor extra investigada em paralelo. Os resultados obtidos mostraram um menor acúmulo de transcritos do gene alvo nas plantas *Abramulosa* 1 e 2, quando comparado ao cultivar MN, e um acúmulo de transcritos em *Semperflorens* semelhante àquele detectado em ET4. Adicionalmente, a presença do transcrito menor extra não foi observada nesses mutantes. Estes resultados parecem revelar uma possível correlação entre o teor de cafeína e arquitetura da planta, visto que todas as plantas descafeinadas apresentam alterações fenotípicas, quando comparadas com *Coffea arabica*, que são semelhantes àquelas observadas nos três mutantes avaliados.

Esta hipótese é suportada quando avalia-se *Coffea arabica* cv. Laurina, conhecida por ter baixo teor de cafeína, por volta de 0.6%. O café 'Laurina' foi descrito por Carvalho, et al. 1988 por apresentar porte pequeno, ramificação densa, internódios curtos, folhas elípticas e pequenas, frutos e sementes pequenos e afilados na base e pequena produtividade.

5.5 Análise das regiões 5' e 3'-UTR do gene da cafeína sintase

Alterações nas regiões não traduzidas (UTR) dos genes podem estar associadas ao aumento ou diminuição de sua expressão. Neste contexto, o presente trabalho visou analisar as possíveis alterações existentes nas regiões transcritas e não codificadoras do gene da cafeína sintase.

É possível verificar a existências de trocas pontuais que ocorrem de forma aleatória nas sequências. Essas trocas podem ser erros de sequenciamento ou podem representar SNP's (*single nucleotide polymorphism*, mutações de nucleotídeos únicos). Para esclarecimento de tal questão seria necessária uma série de sequenciamentos e análises não fragmentadas do gene da cafeína. Por esta razão, na análise realizada nesta dissertação só foram consideradas trocas representativas, ou seja, que incluam pelo menos três nucleotídeos.

A análise da região 5'UTR do gene da cafeína sintase até o códon de iniciação, revelou que as sequências amplificadas de folha (AC1Fo) e fruto (AC1Fr) de plantas AC1 puderam ser separadas em dois possíveis alelos: as sequências que apresentam uma inserção de 9 pares de bases, e as sequências que não apresentam essa inserção. Tal inserção pode influenciar a expressão do gene, reprimindo ou superexpressando, porém pode também estar contida em uma região não funcional, não causando nenhuma influência sob a expressão do gene. Uma vez que alelos contendo esta inserção são

expressos igualmente em genótipos AC1 e MN é provável que esta não tenha papel na regulação da expressão do gene.

Uma outra questão que surge, a partir dos dados de expressão destes alelos, é se os mesmo apresentam expressão tecido-específica. Com relação a MN, os dois alelos são expressos em folhas. No entanto, em frutos só foi detectada a expressão do alelo que apresenta a inserção de 9 pares de bases. Porém, a ausência da expressão do outro alelo pode ter sido resultado de amplificação e clonagem aleatória. Já em folhas e frutos de plantas AC1 ambos alelos são igualmente identificados. Assim, não é possível associar a inserção com regulação da expressão tecido-específica.

Por outro lado., extendendo a análise das sequências das regiões 5' além do códon de iniciação é possível notar a existência de inserção de 3 pares de bases em algumas sequências. Analisando as sequências de AC1 é possível notar que: a sequência 5AC1Fr2 possui a inserção já citada de 9 pares de bases e mais uma inserção de três pares de bases “ATA” pós códon de iniciação; a sequência 5AC1Fr7 não contém nenhuma das inserções; já a sequência 5AC1Fr1 possui a inserção de nove pares de bases bases mas não possui a inserção de 3 pares de bases pós códon de iniciação. As sequências de folhas 5AC1Fo, todas, apresentam a inserção de nove pares de bases já descritas e ainda a inserção de 3 pares de bases “AAC” pós códon de iniciação.

Levando-se em consideração a combinação destes resultados com os obtidos para a região anterior ao códon de iniciação pode-se concluir que na verdade o gene da cafeína sintase apresenta 4 alelos em plantas AC1, sendo 1 alelo expresso em folha e 3 expressos em fruto.

Utilizando-se a mesma estratégia para análise das sequências de MN pode-se verificar que a sequência 5MNFo7 apresenta a inserção de 9 pares de bases já descritas e uma inserção de três pares de bases “AAC” pós códon de iniciação na mesma posição

que as inserções descritas em AC1. A sequência 5MNFo5 não apresenta nenhuma das inserções descritas. enquanto que a sequência 5MNFr e 5MNFo6 apresentam a inserção de 9 pares de bases mas não a inserção pós códon de iniciação. Pode-se sugerir, então, a existência de 4 alelos em MN, sendo 1 alelo de fruto e 3 alelos de folha.

Com base nos resultados obtidos a partir das análises das regiões 5'-UTR é possível supor a ocorrência de dois alelos para o gene da cafeína sintase em AC1 e em MN. Já se consideramos também parte da sequência alinhada após o códon de iniciação foram identificados 4 alelos distintos, tanto para AC1 quanto para MN. No entanto para definir quantos alelos e/ou genes estão relacionados com a transcrição de cafeína sintase é necessário combinar estes dados com aqueles obtidos do sequenciamento da região codificadora genômica. Para isto, a estratégia utilizada neste estudo não é adequada, uma vez que parte do sequenciamento de regiões fragmentadas e clonadas do genes. A fim de se obter a sequência inteira dos alelos é necessário o sequenciamento de regiões únicas do genoma contendo o(s) loco(s) completo, como as encontradas em BACs.

Analisando a porção faltante 3' UTR foi possível verificar que apesar das diferenças verificadas entre as sequências 3'UTR de Folhas e Frutos e de 3'UTR de MN e AC1 as sequências destas regiões faltantes não-codificadoras não alinharam com as sequências utilizadas como referência para o desenho dos *primers*, alinhando somente com a sequência disponível no banco de EST (sequências expressas). Isto pode significar que os *primers* sintetizados não são específicos para o gene da cafeína sintase, logo as regiões amplificadas e clonadas podem ser originários de outros genes das N-metiltransferases, visto que os genes desta família apresentam mais de 80% de identidade.

6. Conclusões

- 1-) A presença do transcrito menor extra não está relacionado com a não síntese de cafeína em folhas, como descrito em frutos;
- 2-) Parece ocorrer regulação diferencial da cafeína sintase em folhas e frutos;
- 3-) É possível utilizar análise de nível de expressão do gene CS em folhas como ferramenta de seleção precoce

7. Bibliografia

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

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. AND LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25, 3389-3402, 1997.

ASHIHARA, H; MONTEIRO, A.M; GILLIES, F.M; CROZIER, A. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. **Plant Physiol** 111:747–753, 1996.

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

ASHIHARA, H.; SUZUKI, T. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1864-1876, 2004

ASHIHARA, H., SANO, H., CROZIER, A., Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism and genetic engineering. **Phytochemistry**, v.69, p.841-856, 2008

BAUMANN, T.W. Some thoughts on the physiology of caffeine in coffee – and a glimpse of metabolite profiling. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v.18, p.243- 251, 1983

BERTHAUD, J. L'incompatibilité chez *Coffea canephora* méthode de test et déterminisme genetique. **Café, Cacao, Thé**, v.24, p.267–274, 1980.

BORÉM, A. Biotecnologia no melhoramento de plantas In: **Melhoramento de Plantas**,^a 2 ed, Editora UFV, Viçosa, 1998.

BUSTAMANTE-PORRAS J.; CAMPA C.; PONCET V.; NOIROT M.; LEROY T.; HAMON S.; DE KOCHKO A.. Molecular characterization of an ethylene receptor gene (CcETR1) in coffee trees, its relationship with fruit development and caffeine content. **Mol Genet Genomics**. v277, p701–712, 2007.

CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: CLARKE, J.R.; MACRAE, R. (eds) **Coffee: Agronom**. Elsevier Applied Science, v.04, p.129-166, 1988

CARVALHO, A; FAZUOLI, L.C; MAZZAFERA,P. Melhoramento do cafeeiro: XLII. Produtividade e progênies derivadas de hibridação dos cultivares Laurina e Mundo Novo. **Bragantia**. Campinas, v.42, n.2, p 213-222, 1988.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L. C.. Café. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P.(Eds). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico**. Campinas: Instituto Agrônômico. v1, p. 29-76., 1993.

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. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILSON, K.C. (eds) Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage. **Croom Helm: London**, p.13-14, 1985.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Responsáveis Técnicos: Eledon P. de Oliveira - Gerência de Levantamento e Avaliação de Safra – GEASA; Djalma F. de Aquino - Gerência de Fibras e Produtos Especiais e Regionais – GEFIP. Acompanhamento da safra brasileira de café 2009/2010. <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Boletim.pdf>. Acesso em 15/04/2010.

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.

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.** v22, p.4673-4680, 1994.

ISKANDAR HM, SIMPSON RS, CASU RE, BONNETT GD, MACLEAN DJ AND MANNERS JM. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Mol Biol Report**, v.22 p.325-337, 2004.

KATO, M. e MISUNO, K. Caffeine synthase and related methyltransferases in plants. **Frontiers in Bioscience** 9, 1833-1842, 2004.

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.

LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B. et al. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v.100, p.139-146,2000

LEKSE, J. M.; XIA, L.; STARK, J.; MORROW, J. D.; MAY, J. M.Plant catechols prevent lipid peroxidation in human plasma and erythrocytes **Mol. Cell Biochem.** V.226, p.89- 95, 2001.

LIVAK, KJ., SCHMITTEGEN, TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 25: 402 – 408, 2001.

MALUF M.P.; DA SILVA C.C.; DE OLIVEIRA M.P.A.; TAVARES A.G. Naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica* exhibits altered caffeine synthase gene expression in fruits. **Genetics and molecular biology**. v,32, p.802-810, 2009.

MAPA- SECRETARIA DE PRODUÇÃO E AGROENERGIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E BASTECIMENTO- <http://www.agricultura.gov.br/>
Acesso em 05/08/2010.

MAZZAFERA, P. & CARVALHO, A.. Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea L.*) by interspecific hybridization. **Euphytica**. v59, p. 55-60, 1992

MAZZAFERA, P., CROZIER A.; 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.

MENTHE, J.; **Tea Coffee Trade J.** v16, p.157- , 1985.

MIZUNO 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 Let**, v534, p.75-81,2003.

MOISYADI, S.; NEUPANE, K.R.; STILES J.I. Cloning and characterization of a cDNA encoding xanthosine-N7-methyltransferase from coffee (*Coffea arabica*).**Acta Hort.** v461, p.367-377, 1998

NAGAI, C; RAKATOMALALA, J. J; KATAHIRA, R; LI, Y; YAMAGATA,K; ASHIRARA, H. Production of a new low-caffeine hybrid coffee and the biochemical mechanism of low caffeine accumulation. **Euphytica**. [Volume 164, Number 1](#), 133-142, 2008.

OGAWA M.; HERAI Y.; KOIZUMI N.; KUSANI T.; SANO H.. 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants. **Journal of Biological Chemistry**. v276, p.8213-8218, 2001.

OGITA S.; UEFUJI H.; YAMAGUCHI Y.; KOIZUMI N.; SANO H. Producing decaffeinated coffee plants. **Nature**. v423, p.823-823, 2003.

OGITA, S; UEFUJI, H; MORIMOTO, M. e SANO, H. Metabolic engineering of caffeine production. **Plant Biotechnology** 22, 461-468, 2005.

QUESADA V.; DEAN C.; SIMPSON G.G. Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering. **Int. J. Dev. Biol.** v49, p.773-780, 2005.

RAJU, K.I.; GOPAL, N.H. Distribution of caffeine in arabica and robusta coffee plants. **J. Coffee Res.**, Karnataka,v. 9, n. 4, p. 83-90, 1979.

RAKATOMALALA, J. J. R. Diversité biochimique des caféiers, Particularités des caféiers sauvages de la région malgache. PhD. Dissertation, The University of Sciences et Techniques du languedoc, 1992.

RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. Caffeine in Coffee: It's Removal. Why. and How?, **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, 39, 441, . 1999.

ROBERTS, M.F. & WALLER, G.R. N-methyltransferases and 7-methyl-N⁹-nucleoside hydrolase activity in *Coffea arabica* and the biosynthesis of caffeine. **Phytochemistry**. v.18: p. 451-455, 1979.

ROBINSON, W. E. JR.; CORDEIRO, M.; ABDEL-MALEK, S.; JIA, Q.; CHOW, S. A.; REINECKE M. G.; MITCHELL W. M. Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. **Mol. Pharmacol**.v.50, p. 846- 855, 1996

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

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

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

TAUNAY, A. E. **História do café no Brasil Imperial 1822-1972**. Departamento Nacional do Café, v.3, 1939.

TOCI A.; FARAH A.E.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés Arábica e Robusta antes e pós torração. **Quim. Nova**, V. 29, N. 5, 965-971, 2006.

TOLEDO, L. B.; BARBOSA, A. T. **Classificação e degustação de café, ABIC: Brasil**. p. 20, 1997.

UEFUJI, H., YAMAGUCHI, Y., HOIZUMU, N., SANO, H. Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-metiltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. **Plant physiology**. V. 132, p. 372-380, 2003