

CARACTERIZAÇÃO DE GENES MADS EM ACESSOS DE *Coffea*

Adalgisa Soares de OLIVEIRA¹; Luiz Henrique Mazzotini GOMES¹; Maria Helena S. GOLDMAN²; Mirian Perez MALUF³, E-mail: maluf@iac.sp.gov.br

¹Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, ²USP, Ribeirão Preto, SP, ³Embrapa Café, Brasília, DF.

Resumo:

A produção de café com boa qualidade de bebida está relacionada com uma colheita de grãos em um mesmo estágio de maturação. Um dos fatores que pode influenciar a maturação uniforme dos frutos é a floração sincronizada. O controle genético do florescimento em plantas é realizado por uma família de genes, os genes MADS, amplamente caracterizados a nível molecular em diferentes espécies, que apresentam domínios protéicos conservados, e regulam a diferenciação do meristema e a identidade dos órgãos reprodutivos. Neste trabalho, esta família de genes foi estudada em *Coffea arabica*, para identificação e caracterização genômica, através de buscas por genes homólogos em bancos de ESTs de *Coffea* e amplificação destes em genomas de plantas normais e mutantes para florescimento. Análises *in silico* permitiram a identificação de homólogos a 9 locos MADS. Oligos específicos para cada um desses locos foram desenhados de maneira a permitir que toda a região codificadora fosse incluída. Os resultados obtidos demonstraram que os locos avaliados não apresentaram polimorfismos entre os genótipos avaliados. A ocorrência de homólogos aos genes MADS em café sugere que o florescimento desta espécie pode ser controlado por mecanismos comuns a outras espécies vegetais.

Palavras-chave: café, florescimento, organogênese

CHARACTERIZATION OF MADS GENE FAMILY IN *Coffea* ACCESIONS

Abstract:

Overall cup quality of coffee fruits depends largely on maturation uniformity. Among genetic factors that could interfere with this aspects is a synchronized blossom. Flowering genetic control in several plant species is dependent on the expression of genes from the so called MADS family, which are broadly characterized regarding molecular aspects. These genes share conserved protein domains, and are transcription factors that control cell differentiation from vegetative meristems to reproductive organs. In this work, the MADS gene family was evaluated aiming identification of gene homologs and genomic characterization in both cultivated and flowering mutants accessions of *Coffea arabica*. *In silico* analysis performed in the Coffee Genome Database allowed the identification of homologs sequences to 9 different members of MADS family. Gene-specific primers were developed and through PCR reactions were able to amplify partial coding regions. Results demonstrated that for most genes there are very few introns in the evaluated region. Also, no significant polymorphism was observed among *C. arabica* and *C. canephora* accessions. These results suggest that eventual differences among those genotypes are more likely to occur at nucleotide level and do not lead to significant size polymorphisms. Also, the identification of MADS homologs in coffee suggests that flowering in this species could also be controlled by similar mechanisms as those present in other plant species.

Key words: coffee, flowering, organogenesis

Introdução

Um dos fatores que influenciam diretamente a qualidade do café é a maturação uniforme dos frutos. Para obtenção de cafés com boa qualidade de bebida há uma necessidade crescente de cultivares que apresentem maturação sincronizada dos frutos, o que implicaria numa colheita simplificada, com menor custo, e maior qualidade de sementes. Além disso, o desenvolvimento de cultivares com ciclo reprodutivo mais curto, ou até mesmo precoce, pode representar a introdução do cultivo de café em regiões com diferentes condições climáticas.

Dentro deste contexto, vários aspectos podem ser pesquisados para caracterizar o ciclo reprodutivo do cafeeiro. Cada uma de suas fases fenológicas é diretamente dependente das condições ambientais, tais como nível hídrico, fotoperíodo, temperatura, sendo que os requerimentos fisiológicos são bem conhecidos e definidos (Camargo, 1985; Rena & Maestri, 1985). Com relação aos aspectos genéticos, pouco se sabe sobre o controle da fenologia do cafeeiro, até o presente. Os poucos conhecimentos genéticos disponíveis estão relacionados com o desenvolvimento de flores e frutos em *C. arabica*. Estes são resultados da avaliação de alguns mutantes com alterações, tanto no padrão de florescimento, quanto na morfologia de folhas e flores, realizada pelo Centro de Café, IAC (Carvalho et al., 1991). Dentre os mais significativos destacam-se:

- Polyorthotropica (*pol*): alelo recessivo que leva ao desenvolvimento de ramos ortotrópicos em excesso e inflorescência com ramificação irregular.
- Volutifolia (*vf*): alelo parcialmente recessivo que leva ao desenvolvimento de flores menores que as normais, com sépalas enroladas.
- Abramulosa (*ar*): alelo recessivo que leva ao desenvolvimento de folhas com formato irregular e excesso de ramos laterais em plantas com 1 ano após a germinação
- Anômala (*an*): alelo recessivo que afeta vários aspectos da planta, tais como produção de ramos laterais abundantes e subdivididos; folhas pequenas e irregulares; poucas flores, com lobos de corola irregulares, e ovários com mais de um óvulo.
- Anormalis (*am*): alelo de dominância incompleta, que leva promove densa ramificação e com internódios curtos, folhas grandes e irregulares.
- Semperflorens (*sf*): mutação em um único loco que leva ao florescimento contínuo do cafeeiro. Flores, frutos e sementes são normais.
- Fator *F_s*: mutação em um único loco que promove fasciação das folhas primárias e flores, com aumento no número de lobos da corola, de estames, de locos nos ovários, e de sementes.
- Maragogipe (*Mg*): mutação monofatorial que condiciona sementes de tamanho aumentado, e retorcido. Também é responsável por uma redução no número de flores por axila foliar.
- Goiaba (*sd*): alelo de dominância incompleta que condiciona frutos com cálice de sépalas desenvolvidas e permanentes.

Além desses mutantes, o Programa de Melhoramento do IAC desenvolveu várias cultivares de *C. arabica* com ciclos fenológicos distintos, tais como as cultivares Tupi e Obatã que apresentam maturação tardia, quando comparadas às cultivares Mundo Novo e Catuaí.

Dentre os genes identificados relacionados com o desenvolvimento floral, os de maior interesse são os genes homeóticos. Entre estes genes, encontram-se os genes MADS. Análises moleculares dos locos MADS demonstraram que eles exercem a função de fatores de transcrição, são expressos predominantemente em flores, e possuem domínios protéicos conservados (Riechmann & Meyerowitz, 1997). Esta família de genes está relacionada com o controle da iniciação e diferenciação das gemas florais, e também com a determinação dos órgãos da flor, como sépalas, pétalas, estames e carpelos (Riechmann et Meyerowitz, 1997). Mutações nestes locos levam ao desenvolvimento de flores com alterações morfológicas e funcionais, ou até mesmo à ausência de florescimento, que na maioria das vezes resulta em esterilidade da planta (Ma, 1994; Yanofsky, 1995).

Uma caracterização molecular e genética, em flores, permitiu a classificação dos genes MADS em duas classes: uma primeira, relacionada com a identidade do tipo de meristema. Os locos LEAFY (LFY), CAULIFLOWER (CAL) e APETALA1 (AP1) são membros desta classe. A segunda classe abrange genes relacionados com a identidade do órgão floral. Os locos APETALA2 (AP2), APETALA3 (AP3), PISTILLATA (PI) e AGAMOUS (AG), de *Arabidopsis*, fazem parte dessa classe de genes (Weigel & Meyerowitz, 1994). Além destes, outros genes como TERMINAL FLOWER (TFL-1), CONSTANS (CO) E SPINDLY (SPY) são fatores de transcrição responsáveis pela ativação da cascata de expressão dos genes para formação dos órgãos florais em resposta ao fotoperíodo (Howell, 1998; Peña et al., 2001).

Em vista do descrito acima, neste estudo caracterizaram-se os aspectos genéticos do florescimento em café, através da identificação de genes homólogos aos diferentes genes listados em espécies de *Coffea* e sua caracterização em genomas de diferentes acessos de *Coffea*.

Material e Métodos

Identificação de seqüências completas homólogas aos genes MADS - *Agamous*, *Pistillata*, *Apetala* (1,2 e 3), *Constans*, *Cauliflower*, *Terminal flower*, *Leafy* e *Spyndle* - foram realizadas, utilizando-se o algoritmo BLAST (Aschtul et al., 1997) no Banco de Dados do Genoma Café. As seqüências homólogas identificadas foram agrupadas e alinhadas com seqüências dos genes identificadas em outras espécies. Uma vez identificados e agrupados os *contigs* correspondentes a cada gene serviram de base para a obtenção de oligos específicos. Para aumentar a probabilidade de identificação de possíveis polimorfismos nestas regiões, os oligos foram selecionados de maneira a amplificar separadamente as regiões 5' antes do domínio MADS (5'-MADS) e 3' (MADS - 5'), incluindo regiões não codificadoras (UTR).

Para amplificação com oligos gene-específicos foi utilizado DNA total extraído de variedades mutantes (Etiópia, Volutifolia, Poliortotrópica, Anômala, Anormalis, Abramulosa, Semperflorens, Goiaba, Maragogipe) e cultivares de *Coffea arabica* (Mundo Novo, Catuaí) e de *C. canephora* (Apoatã). Estes oligos foram testados, em relação à eficiência de amplificação e temperatura ótima de anelamento, por meio de amplificação de PCR. Após estabelecimento das condições ótimas de amplificação, os oligos foram testados nos genótipos selecionados.

Resultados e Discussão

A tabela I apresenta um resumo dos resultados obtidos das análises *in silico*. A busca resultou em inúmeras seqüências com similaridade significativa aos diferentes membros da família MADS, à exceção do homólogo ao gene LFY que não foi identificado no Banco de Dados. No entanto, como a maioria destas seqüências apresenta regiões dos domínios conservados presentes nos membros da família MADS, em análises de agrupamento participavam na formação de mais de uma seqüência consenso, ou *contig*. Para as análises genômicas foram então separadas as seqüências únicas de cada contig, a fim de garantir a especificidade dos oligos. Assim, os dados apresentados na Tabela 1 correspondem ao número de seqüências (*reads*) que foram consideradas para desenvolvimento de oligos gene-específicos.

Tabela 1- Resultado da busca de seqüências e clusterização dos genes da família MADS no Banco de ESTs de *Coffea*. NE- não encontrado

Genes	Nº de Reads	Contigs
Agamous (AG)	6	2
Apetala 1 (AP1)	5	4
Apetala 2 (AP2)	7	2
Apetala 3 (AP3)	11	4
Cauliflower (CAL)	4	2
Constans (CO)	10	3
Pistillata (PI)	33	6
Terminal flower (TFL)	2	1
Spindly (SPY)	2	1
Leafy (LEF)	NE	-

Os oligos gene-específicos foram utilizados para amplificação das regiões genômicas correspondentes, através de reações de PCR. Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 2. Dos 27 oligos testados, apenas 5 não amplificaram fragmentos. O tamanho dos fragmentos não variou significativamente do valor esperado, indicando que a maioria das regiões amplificadas não contém introns, exceto para regiões dos locos PI, AP3, AG, CAL e TFL. Para alguns genes foram detectados alelos espécie-específicos, como é o caso do fragmento de 1300pb do loco AP3 presente apenas na variedade Apoatã de *C. canephora*, ou dos fragmentos de PI, AG e TFL amplificados apenas em genótipos de *C. arabica* (Tabela 2 e Figura 1).

Não foram detectados polimorfismos significativos entre os genótipos cultivados e os acessos selvagens e mutantes, o que sugere que o processo de seleção não levou à fixação de alelos distintos relacionados ao controle do florescimento. No entanto, como há diferenças no desenvolvimento de estruturas reprodutivas e no tempo de florescimento entre estes genótipos, espera-se que polimorfismos resultantes da substituição ou da alteração de pequeno número de nucleotídeos na seqüência promovam diferenças na proteína final. Também, diferenças na região promotora, que regula o padrão de expressão do gene, podem estar relacionadas com as diferenças encontradas entre os genótipos. Estudos funcionais destes genes poderão indicar se ocorrem diferenças no padrão de expressão destes locos nos diferentes genótipos.

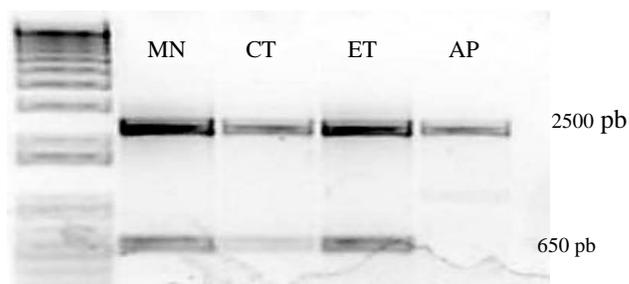


Figura 1 – Amplificação de fragmentos genômicos do loco TFL em cultivares de *C. arabica* (Mundo Novo, Catuaí e Etiópia) e *C. canephora* (Apoatã)

Tabela 2 - Amplificação de seqüências homólogas a genes MADS a partir de DNA das variedades - Mundo Novo (MN), Catuaí (CT), Etiópia (ET) -, variedades mutantes – Volutifolia (VF), Abramulosa (AR), Anômala (AM), Anormalis (NA), Fasciata (FS), Semperflorens (SF), Goiaba (SD), Maragogipe (MG) e Poliotótopica (POL) de *Coffea arabica* e a variedade Apatã de *C. canephora*.

Gene	Região do gene	Fragmento (bp)		Variedade
		Esperado	Observado	
PI-A	5'- MADS	206	250	MN, CT, ET, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
PI-B	5'- MADS	205	300	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
PI-C	MADS - 3'	650	1700	MN, CT, ET, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
CO-A	5'- MADS	193	200	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
CO-B	5'- MADS	196	200	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
CO-C	MADS - 3'	601	600	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AP1-A	5'- MADS	262	250	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AP2-A	MADS -3'	201	200	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AP2-B	MADS - 3'	198	350	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AP3-A	5'- MADS	193	300	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AP3-B	5'- MADS	276	400	MN, CT, ET, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
			1300	AP
AP3-C	MADS - 3'	520	1700	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AG-A	5'- MADS	195	650	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AG-B	MADS - 3'	460	600	MN, CT, ET, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
			2500	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AG-C	MADS - 3'	200	600	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
			200	MN, CT, ET, AP, AM, AN, MG, SD, AR, FS
AG-D	MADS - 3'	630	700	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
			400	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
CAL-A	5'- MADS	205	3200	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
CAL-B	MADS - 3'	200	550	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
TFL-A	5'- MADS	205	200	MN, CT, ET, AP
TFL-B	MADS - 3'	200	650	MN, CT, ET
			2500	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF
TFL-C	MADS -3'	525	350	POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
			1550	MN, CT, ET, AP, POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS
SPY	5'-MADS	200	200	POL, VF, SF, AM, AN, MG, SD, AR, FS

Conclusões

Genes homólogos à família MADS estão presentes em espécies de *Coffea*.

Não há diferenças significativas no tamanho dos alelos avaliados entre genótipos normais e mutantes de florescimento e desenvolvimento, em *C. arabica*.

Referências Bibliográficas

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. Jour. Mol. Biol., 215: 403-410.

Camargo, A.P. de. (1985). O clima e a cafeicultura no Brasil. Inf. Agropec. 11 (126): 13 -25.

Carvalho, A.; Medina Filho, H. P.; Fazuoli, L. C.; Guerreiro Filho, O. & Lima, M. M. A. (1991). Aspectos genéticos do cafeeiro (Genetic Aspects of the coffee tree). Revista Brasil. Genet., 14(1): 135-183.

Howell, S. H. (1998). *Molecular Genetics of Plant Development*. Cambridge University Press.

Ma, H. (1994) The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes Dev.*, 8: 745 - 756.

Peña, L.; Martín-Trillo, M.; Juárez, J.; Pina, J. A.; Navarro, L.; Martínez-Zapater, J. M. (2001) Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology* 19: 263-267.

Rena, A.B.; Maestri, M. (1985). *Fisiologia do cafeeiro*. *Inf. Agropec.* 11 (126): 26 - 40

Riechmann, J.L.; Meyerowitz, E.M. (1997) MADS Domain proteins in plant development. *Biol. Chem.*, 378: 1079-1101.

Yanofsky, M.F. (1995) Floral meristems to floral organs: genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 167-188.