



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM AGRONOMIA**

**LUÍS GUSTAVO GOMES LOBO**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FAMÍLIA DAS  
EXPANSINAS NO FRUTO DO *Coffea arabica* L.**

Presidente Prudente – SP

2025



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM AGRONOMIA**

**LUÍS GUSTAVO GOMES LOBO**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FAMÍLIA DAS  
EXPANSINAS NO FRUTO DO *Coffea arabica* L.**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Tiago Benedito dos Santos.

Presidente Prudente - SP

2025

### Catálogo Internacional de Publicação (CPI)

631.531 L799i Lobo, Luís Gustavo Gomes  
Identificação e caracterização molecular da família das expansinas no fruto do *Coffea arabica* L. / Luís Gustavo Gomes Lobo -- Presidente Prudente, 2025.  
81 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2025.  
Bibliografia.  
Orientador: Tiago Benedito dos Santos

1. Café. 2. Bioinformática. 3. Parede celular. 4. Desenvolvimento do fruto. I. Título.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: “IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FAMÍLIA DAS EXPANSINAS EM *Coffea arabica* L.”**

**AUTOR(A): LUÍS GUSTAVO GOMES LOBO**

**ORIENTADOR(A): Prof. Dr. TIAGO BENEDITO DOS SANTOS**

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

**PROF. DR. TIAGO BENEDITO DOS SANTOS** (orientador)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

**PROF. DR. NELSON BARBOSA MACHADO NETO**

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

**PROFA. DRA . ILARA GABRIELA FRASSON BUDZINSKI**

Esalq/USP - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Piracicaba (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 16 de abril de 2025.

## Central de Assinaturas Eletrônicas

### Sobre o documento

---

Assunto: Documento eletrônico  
Status do documento: Concluído  
Data de criação do documento: 22/04/2025 10:37  
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília  
Número de assinaturas: 3  
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6101174)

### Signatários do documento

---

#### TIAGO BENEDITO DOS SANTOS (PROFESSOR)

dossantos@unoeste.br  
Recebido em 22/04/2025 10:37  
Assinado em 23/04/2025 09:10  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 177.131.39.1  
ID da assinatura: 4722566

#### ILARA GABRIELA FRASSON BUDZINSKI (SIGNATÁRIO EXTERNO)

ilarafrass@gmail.com  
Recebido em 22/04/2025 10:37  
Assinado em 22/04/2025 11:18  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 143.107.5.16  
ID da assinatura: 4722567

#### NELSON BARBOSA MACHADO NETO (PROFESSOR)

nbmneto@unoeste.br  
Recebido em 22/04/2025 10:37  
Assinado em 22/04/2025 10:55  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 177.131.39.1  
ID da assinatura: 4722568

---

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/cfa0dd08>

Assinatura digital do documento: 7d49b97ecd5039247ebb5fd9faf53ca4ac10153727f3d3cca6a8cc3d4267d17a

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela Associação Prudentina de Educação e Cultura - APEC

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



## **DEDICATÓRIA**

Gostaria de dedicar esse estudo a minha família pelo apoio e incentivo aos estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe e minhas tias por me ajudar e apoiar ao estudo desse trabalho.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela oportunidade de realizar o mestrado.

À secretária do programa de pós-graduação, pela assistência ao decorrer desses anos.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Tiago Benedito dos Santos pelos ensinamentos, comprometimento e paciência.

Aos professores da banca examinadora pela disponibilidade de tempo e aconselhamento, durante a qualificação e defesa.

Aos professores que ministraram as disciplinas durante esse período de estudo.

A técnica Mayara Vidotto do laboratório de Biologia Molecular, pela ajuda presta durante as pesquisas realizadas.

Ao Jardel de Oliveira pela importantíssima ajuda em algumas análises *in silico*.

Ao Programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

*“O destino é feito de escolhas e consequências”*

## RESUMO

### **Identificação e caracterização molecular da família das expansinas no fruto do *Coffea arabica* L.**

O mecanismo de desenvolvimento dos frutos no cafeeiro é caracterizado por intensa divisão celular, alongamento e relaxamento da parede celular, processos relacionados à ação de determinadas proteínas, incluindo as expansinas. As expansinas (EXPs) representam uma família gênica e classificadas em quatro subfamílias:  $\alpha$ -*expansina* (EXPA),  $\beta$ -*expansina* (EXPB), *expansina-like A* (EXLA) e *expansina-like B* (EXLB). Objetificou-se neste estudo a caracterização e identificação das expansinas utilizando as ferramentas de bioinformática e molecular no fruto do cafeeiro nas fases perisperma, endosperma e pericarpo. A caracterização desses genes iniciou-se na coleta de informações contidas nos bancos de dados *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) e *Phytozome*. Em seguida foram utilizadas as ferramentas: *ExpPASsy* e *GRAVY* (para as informações físico-químicas); *PlantmPLoc* (localização subcelular); *TAIR* (genes ortólogos); *GSDS* estruturação dos genes (éxon/intros); *MapGene2chromosome* (*MG2C*- mapeamento físico dos cromossomos); alinhamento das sequências utilizando o programa *MEGA 11* (análises filogenéticas); *Phyre2* (estruturas 3D das proteínas); *MEME* (*Multiple Em for Motif Elicitation*- motivos conservados); *PlantCARE* (regiões regulatórias dos genes), e *TBtools* informações do *Ka/Ks* (não sinônimos e sinônimos) e o teste de colinearidade. Para a expressões dos genes, foram coletados o grão do *C. arabica* L. em quatro estágios de desenvolvimento (30 DAF, 90 DAF, 120 DAF e 180 DAF) e submetidos a análise de qRT-PCR (PCR de transcrição reversa quantitativa em tempo-real). Foram caracterizados *in silico* 45 genes de expansinas e suas características apresentaram uma variação de 240-300 aminoácidos (aa), peso molecular 21,18 a 32,27 kDa, o ponto isoelétrico (pI) 4.35 a 9.68, e todas foram localizadas na parede celular. Não obstante, foi observado que as proteínas apresentaram característica hidrofóbicas. A estrutura gênica (éxon/introns) variaram de 2/1 a 6/5. A relação filogenética os classificou de acordo com as quatro subfamílias de expansinas, formando cinco grupos. Os genes foram distribuídos de

formar desigual nos 11 cromossomos de *C. arabica* L.. Os *motifs* conservados variaram de dois a cinco. Os domínios DPBB e CBM63 foram descritas nas suas estruturas 3D de cada proteína. Na sintenia os genes *CaEXPA* apresentou maior similaridade com os genomas *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana* e a duplicação de alguns genes mostrou-se positiva na análise de *Ka/Ks*. O resultado da qRT-PCR mostrou que os genes de *CaEXPA1*, *CaEXPA2*, *CaEXPA4*, *CaEXPA6*, *CaEXLA10*, e *CaEXLB11*, foram expressos durante os quatro períodos de desenvolvimento do fruto. O gene *CaEXPA1* apresentou a maior expressão durante a 30 DAF, 90 DAF e 120 DAF, enquanto que o gene *CaEXPA4* foi o mais expresso entre os genes avaliados, tendo uma alta expressão em todos os períodos de desenvolvimento do grão do cafeeiro. Essas informações estabelecem bases para pesquisas futuras sobre as características funcionais e mecanismos moleculares dos genes de expansinas em *C. arabica* L. em estágios diferentes de desenvolvimento do grão do café.

**Palavras-chave:** Café; bioinformática; parede celular; desenvolvimento do fruto.

## ABSTRACT

### Identification and molecular characterization of the expansin family in the fruit of *Coffea arabica* L.

The mechanism of fruit development in coffee plants is characterized by intense cell division, elongation and relaxation of the cell wall, processes related to the action of certain proteins, including expansins. *Expansins* (*EXPs*) represent a gene family and symbol in four subfamilies:  $\alpha$ -*expansin* (*EXPA*),  $\beta$ -*expansin* (*EXPB*), *expansin-like A* (*EXLA*) and *expansin-like B* (*EXLB*). The aim of this study was to characterize expansins using bioinformatics tools and the molecular characterization of coffee fruits in the perisperm, endosperm and pericarp phases. The characterization of these genes began with the collection of information contained in the *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) and *Phytozome* databases. Then, the following tools were used: *ExPASy* and *GRAVY* (for physicochemical information); *PlantmPLoc* (subcellular localization); *TAIR* (orthologous genes); *Gene structure*: *GSDS* (exon/intro); *MapGene2chromosome* (*MG2C*- physical mapping of chromosomes); sequence alignment using *MEGA 11* (phylogenetic analysis); *Phyre2* (3D protein structures); *MEME* (*Multiple Em for Motif Elicitation*- conserved domains); *PlantCARE* (gene regulatory regions); and *TBtools* information on *Ka/Ks* (non-coincident and symbolic) and collinearity test. For gene expression, *C. arabica* L. grains were found at four development stages (30 DAF, 90 DAF, 120 DAF and 180 DAF) and subjected to qRT-PCR (quantitative real-time reverse transcription PCR) analysis. Forty-five *expansin* genes were characterized *in silico* and their physicochemical patterns contained a variation of 240-300 amino acids (aa), molecular weight 21.18 to 32.27 kDa, isoelectric point (pI) 4.35 to 9.68, and all were located in the cell wall. However, it was observed that their appearances seemed hydrophobic. The gene structure (exon/introns) varied from 2/1 to 6/5. The phylogenetic relationship classified them according to the four expansin subfamilies, forming five groups. The genes were unevenly distributed in the 11 chromosomes of *C. arabica* L.. The conserved domains varied from two to five. The DPBB and CBM63 domains were described in their 3D structures of each protein. In the

synthesis of the *CaEXPA* genes, it showed greater similarity with the genomes of *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*, and the duplication of some genes was positive in the *Ka/Ks* analysis. The qRT-PCR result showed that the *CaEXPA1*, *CaEXPA2*, *CaEXPA4*, *CaEXPA6*, *CaEXLA10*, and *CaEXLB11* genes were expressed during the four periods of fruit development. The *CaEXPA1* gene showed greater pressure during 30 DAF, 90 DAF, and 120 DAF, while the *CaEXPA4* gene was the most expressed among the genes evaluated, having a high expression in all periods of coffee bean development. This information establishes the basis for future research on the functional characteristics and molecular mechanisms of expansion genes in *C. arabica* L. in different coffee bean development projects.

**Keywords:** Coffee; bioinformatics; cell wall; fruit development.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EXPs	— Expansinas
EG45	— Endoglucanase da Família 45
NCBI	— <i>National Center for Biotechnology Information</i>
CONAB	— Companhia Nacional de Abastecimento
Ka/Ks	— Não Sinônimos e Sinônimos
MEME	— <i>Multiple Em for Motif Elicitation</i>
EXPA	— $\alpha$ -expansina
EXPB	— $\beta$ -expansina
EXLA	— <i>expansina-like A</i>
EXLB	— <i>expansina-like B</i>
DAF	— Dias Após a Floração
PCR	— Reação em Cadeia da Polimerase
qRT-PCR	— Transcrição Reversa Quantitativa em Tempo-Real de PCR
aa	— Aminoácidos
pI	— Ponto Isoelétrico
kDa	— Peso Molecular
ha	— Área em produção por hectare
PIB	— Produto Interno Bruto
PEG	— Polietilenoglicol
NaCl	— Cloreto de Sódio
HFD	— Histidina, Fenilalanina e Aspartato
Trp	— Triptofanos
EROS	— Espécies Reativas de Oxigênio
CDS	— Sequência Codificadora de Proteína
DNA	— Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	— DNA complementar
NJ	— <i>Neighbour-Joining</i>
RPKM	— <i>Reads Per Kilobase per Million Mapped Reads</i>
Mb	— Megabases

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 —	Origem evolutiva do alotetraplóide <i>C. arabica</i> L.....	20
Figura 2 —	Principais regiões produtoras de café no Brasil.....	22
Figura 3 —	Representação do desenvolvimento e maturação do fruto de <i>C. arabica</i> L.....	24
Figura 4 —	Representação da parede celular e quebra de componentes pelas EXPs.....	27
Figura 5 —	Modelo proposto do mecanismo de ação das expansinas sobre a parede celular.....	28
Figura 6 —	Análise estrutural dos genes <i>EXPs</i> de <i>C. arabica</i> L.....	42
Figura 7 —	Relação filogenética dos genes de <i>C. arabica</i> L. em conjunto com os genes de <i>A. thaliana</i> , <i>S. lycopersicum</i> e <i>O. sativa</i> depositados do banco de dados <i>NCBI</i> .....	45
Figura 8 —	Mapeamento dos genes <i>EXPs</i> entre os pares de cromossomos 1 e 11 de <i>C. arabica</i> L.....	48
Figura 9 —	Caixas coloridas indicam o <i>motifs</i> (conservação), calculado pela ferramenta <i>MEME (Multiple EM for Motif Elicitation)</i> .....	52
Figura 10 —	Análise de sintenia foi realizada em conjunto com o teste de colinearidade, que busca a similaridade dos genes de <i>expansinas</i> e <i>endoglucanases</i> encontradas no genoma do <i>C. arabica</i> L. com os genomas da <i>A. thaliana</i> , <i>S. lycopersicum</i> e <i>O. sativa</i> .....	56
Figura 11 —	Expressão <i>in silico</i> (perfil transcricional) dos genes <i>EXPs</i> em <i>C. canephora</i> .....	58
Figura 12 —	Representa os 14 elementos regulatórios de expansinas encontradas na região de 1500 <i>upstream</i> dos genes .....	60
Figura 13 —	Estruturas (3D) geradas pela ferramenta <i>Phyre2</i> .....	62
Figura 14 —	Análise de amplificação dos <i>primers</i> selecionados ( <i>CaEXPA1</i> , <i>CaEXPA2</i> , <i>CaEXPA4</i> , <i>CaEXPA6</i> , <i>CaEXLA10</i> e <i>CaEXLB11</i> )	

	para o qRT-PCR .....	64
Figura 15 —	Padrões de expressões de seis <i>primers</i> de <i>CaEXPs</i> no fruto do <i>C. arabica</i> L. em quatro períodos de desenvolvimento: (30 DAF - Dias após a floração), 90 DAF, 120 DAF e 180 DAF).....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 —	Relatos da presença de expansinas nas diferentes plantas .....	29
Tabela 2 —	Representação de separação dos frutos coletados para análises moleculares .....	37
Tabela 3 —	Genes e sequências utilizadas para o RT-qPCR .....	39
Tabela 4 —	Descrição sobre as características físico-químicas dos genes <i>EXPs</i> ( <i>expansinas</i> ) e <i>EG45</i> ( <i>endoglucanase</i> ) em <i>C. arabica</i> L....	40

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
2	ASPECTOS BOTÂNICOS E GENÉTICOS DO CAFÉ .....	19
3	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CAFEICULTURA NO BRASIL .....	21
4	DESENVOLVIMENTO DO FRUTO DO CAFEIEIRO .....	23
4.1	Composição da parede celular vegetal .....	24
5	EXPANSINAS.....	26
5.1	Mecanismo de ação e regulação das expansinas .....	27
5.2	Expansinas envolvidas na maturação .....	31
6	OBJETIVO .....	32
7	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
7.1	Obtenção das sequências de expansinas e endoglucanases no <i>Coffea arabica</i> L. ....	33
7.2	Características das expansinas e endoglucanases de <i>Coffea arabica</i> L. ....	33
7.3	Localização dos genes <i>EXPs</i> e <i>EG45s</i> e estruturas gênicas .....	34
7.4	Alinhamento e análise filogenética .....	34
7.5	Análise <i>in silico</i> da expressão dos genes <i>EXPs</i> .....	34
7.6	Análises de sintenia, <i>Ka/Ks</i> e estruturação dos <i>motifs</i> conservados .....	35
7.7	Estruturas tridimensional (3D) dos genes de <i>expansina</i> em <i>Coffea arabica</i> L. e análise <i>cis</i> -elementos .....	35
7.8	Material vegetal .....	37
7.9	Extração de RNA total e purificação .....	37
7.10	Síntese de cDNA .....	38
7.11	Avaliação transcricional de genes por RT-qPCR .....	38
7.12	Análise estatísticas .....	39

<b>8</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O café é um produto que está entre as maiores *commodities* do mundo, e o Brasil é considerado o maior produtor mundial e o segundo maior consumidor da bebida. Dentre as espécies de café, duas são destaques de importância econômica: *Coffea arabica* L. e *C. canephora*. No Brasil, a estimativa da safra de 2023 foi de 54.944 sacas/hectares: *C. arabica* L. que correspondem a 37.435 sacas/hectares da produção e o *C. canephora* (Robusta ou Conilon) que representam 17.508 sacas/hectares da produção (CONAB, 2024). *Coffea canephora* é considerada uma espécie de alta produtividade e resistente a doenças (Peck; Boa, 2024).

Na maturação estão presentes inúmeras proteínas e enzimas, que constantemente agem no alongamento, relaxamento e expansão da parede celular, até a mudança na coloração do fruto. Os fatores bióticos e abióticos, estresses, e maturação do fruto, interferem na qualidade da bebida, em seu teor e sabor, por isso o processo de desenvolvimento do fruto é a base mais importante do produto final (Budzinski; Pereira; Vieira, 2008).

A qualidade final da bebida do café está diretamente relacionada a maturação dos frutos, o seu tamanho e peso durante a colheita, na qual, é realizada de forma manual, semi mecanizada e mecanizadas, fazendo assim com que diversos frutos em diferentes fases de desenvolvimento sejam colhidos, os frutos imaturos comprometem a qualidade da bebida, agregando sabores adstringentes, impactando negativamente o produtor e seu valor comercial (Adugna, 2021).

A perda da sensorial da bebida ocasionada pelos grãos imaturos, está relacionado a sua composição fitoquímica, que durante a fase de perisperma e endosperma apresentam menores concentrações de açúcares, aminoácidos e entre outros compostos (Haile; Kang, 2019), resultando em uma bebida de caracteres mais ácido e amargor indesejável, o tornando inviável para o consumidor e consequentemente a sua desvalorização no mercado (Agnoletti *et al.*, 2020).

Contudo, a presença do grão imaturo em lotes acarreta prejuízo ao produtor com rejeições ou redução no valor. Segundo Vaast *et al.* (2006), a presença de 5% do grão

verde em lotes pode gerar um desconto de aproximadamente 20%, já no pós-colheita, o fruto imaturo pode sofrer danos mecânicos durante o processo de beneficiamento e dificultando o processamento de secagem, descascamento e classificação. A irregularidade no tamanho dos frutos imaturos pode dificultar o processo de torra, resultando em um produto de baixa qualidade (Velásquez; Banchón, 2022).

Existe um determinado grupo de proteínas específicas denominadas expansinas (EXPs), que tem como característica de ação, agir na expansão da parede celular vegetal, além de também estarem presentes em outros processos metabólicos nas plantas. Os genes das *expansinas* são divididos e classificados em quatro famílias: *α-expansinas (EXPA)*, *β-expansinas (EXPB)*, *expansina like-A (EXPLA)* e *expansina like-B (EXPLB)* (Mu *et al.*, 2021; Cosgrove, 2024a). As expansinas atua em conjunto com proteínas e enzimas hidrolíticas, afrouxando as ligações não covalentes existentes entre microfibrilas de celulose, pectinas e hemiceluloses da parede celular, durante o amadurecimento dos frutos, determinando o amolecimento e acentuando sabor, textura e cor (Perini *et al.*, 2017).

Na parede celular também existe um grupo de proteínas conhecidas como endoglucanase da família 45 (EG45), sendo encontradas em, fungos, bactérias e plantas, elas se assemelham geneticamente com as expansinas, essas proteínas são responsáveis por hidrolisar ligações de  $\beta$ -1,4 glicosídicas ou regiões potencialmente não cristalinas de microfibrilas de celulose presentes na parede celular (Su *et al.*, 2024).

A bioinformática é hoje um dos campos mais importantes das ciências modernas, agregando diferentes campos de pesquisa, tais como, biologia, genômica, genética e evolução molecular. Nesse contexto, utilizando a bioinformática como ferramenta, inúmeros estudos têm sido realizados na intenção de identificar e caracterizar genes da família das expansinas (Ding; Marowa; Kong, 2016; Santiago *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2019).

Adicionalmente, encontra-se disponibilizado em plataforma *web* o genoma de *C. arabica* L.. Essas informações sobre o genoma do *C. arabica* L. estão copiladas em bancos de dados denominados *Coffee Genoma Hub* (Dereeper *et al.*, 2015), *NCBI - National Center for Biotechnology Information* (Altschul *et al.*, 1997) e *Phytozome* –

(Goodstein *et al.*, 2012), o qual representa uma ferramenta e referência para podermos compreender a composição do genoma do café.

Com a crescente disponibilização dos genomas, os bancos de dados tornaram-se uma ferramenta indispensável para caracterização de inúmeros genes que poderão auxiliar os programas de melhoramento genético do cafeeiro em gerar novas variedades resistentes a pragas e adaptadas às mudanças climáticas.

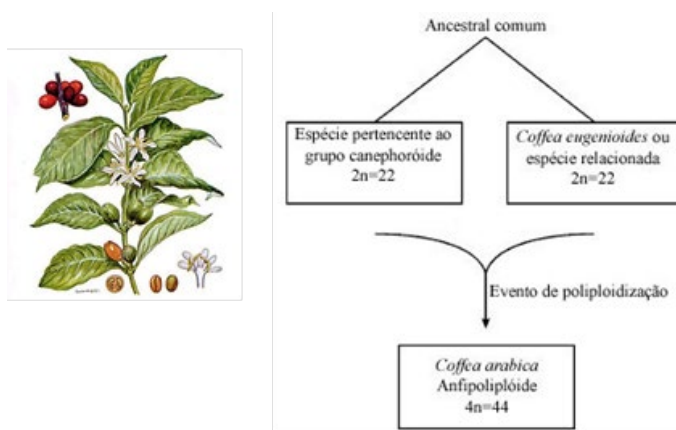
Neste ínterim, a identificação e caracterização dos genes que possam atuar no desenvolvimento do café, são de extrema relevância para estudos futuros voltados para o processo bioquímico e da fisiologia do grão. Essas novas informações podem ajudar a melhorar a qualidade da bebida, e também desenvolver soluções para a cultura, como a desuniformidade na maturação do fruto.

## 2 ASPECTOS BOTÂNICOS E GENÉTICOS DO CAFÉ

O café pertence à família botânica *Rubiaceae*, é uma cultura perene, são árvores arbustivas e de habitat tropical, podendo ser encontradas em regiões de matas de áreas baixas. O centro de origem do gênero *Coffea* é o continente africano, agrupando 124 espécies (Davis *et al.*, 2011), sendo a espécie *C. arabica* L. originária dos platôs centrais da Etiópia e a espécie *C. canephora* Pierre ex Froehner (Robusta ou Conilon) de uma grande região, entre Guiné ao Congo, da costa oeste à região Central do continente (Lyu, 2024; Salojärvi *et al.*, 2024).

As espécies de maior valor econômico são representadas por: *C. arabica* L., aproximadamente 65% do café produzido e 35% de *C. canephora*. O café arábica possui algumas particularidades quanto a sua genética, possui 44 cromossomos (tetraploide  $2n = 4x = 44$ ), e descende provavelmente de um evento de hibridização natural recente entre duas espécies *C. eugenioides* ( $2n = 2x = 22$ ) e *C. canephora* ( $2n = 2x = 22$ ), (Lashermes *et al.*, 1999; Cenci; Combes; Lashermes, 2012; Severino, 2013) que resultou nessa espécie que se reproduz por autofecundação (Budzinski, 2008). A figura abaixo ilustra o fenômeno que deu origem à *C. arabica* L..

Figura 1 — Origem evolutiva do alotetraploide *C. arabica* L.



Fonte: Adaptado de Vidal *et al.* (2010).

Legenda: Os genomas progenitores são representados pelos diploides *C. canephora* e *C. eugenioides*, respectivamente. Estudos indicam que *C. arabica* L. surgiu 1 a 2 milhões de anos atrás através de uma hibridização natural entre *C. canephora* e *C. eugenioides*.

Botanicamente, o café possui um período de amadurecimento de sete meses após a sua floração, produzindo de 1.500 a 3.000 quilos de grãos por hectare, apresenta um sistema radicular profundo, desenvolve-se em ambiente com variações de temperatura entre 20 a 24°C (Damatta; Ramalho, 2006). É descrito como uma planta suscetível a diversas pragas como nematoides e broca; *C. arabica* L. apresenta uma baixa diversidade genética comparada a outras espécies do gênero *Coffea* (Montagnon *et al.*, 2025).

A espécie *C. canephora*, é uma planta alógama e autoincompatível (Severino, 2013), é considerada um arbusto multicaule, com folhas grandes de coloração verde-claro, apresenta um ciclo fenológico de até 11 meses, com rendimento maior de 2.300 a 4.000 grãos por hectare. Possui um sistema radicular superficial, temperatura ótima variável de 24 a 30°C, é uma planta mais resistente a pragas, e suscetível à doença como traqueomicose, seu grão é ovalado, com teor de cafeína de 1,7 a 4,0%, bebida amarga e encorpada (International Coffee Organization - ICO, 2018). *C. canephora* pode apresentar durante o período agrícola até três florações, entretanto, isso depende de alguns fatores como: condições climáticas, variabilidade genética e do manejo de irrigação (Domingues; Ramalho; Partelli, 2023). A espécie *C. canephora*, apresenta um importante valor comercial e industrial. Apresenta características bioquímicas significativas e de grande importância, fazendo parte nas misturas dos cafés solúveis (café arábica mais canéfora com até 50% nos *blends*), tendo como função contrabalancear a acidez do café arábica e dar corpo à bebida (Kalschne *et al.*, 2019).

A nomeação como café Robusta ao *C. canephora* é bem definida com base em suas características de rusticidade e maior resistência a doenças (Silva *et al.*, 2022). Contudo, no Brasil, o cultivo, é quase exclusivo da variedade Kouillou, conhecida também como Conilon. Variedade esta derivada do grupo Guineano, apresenta uma grande variabilidade quanto a suas características anatômicas: caules, porte, folhas, frutos e sementes (Fazuoli, 1986; Bragança *et al.*, 2001).

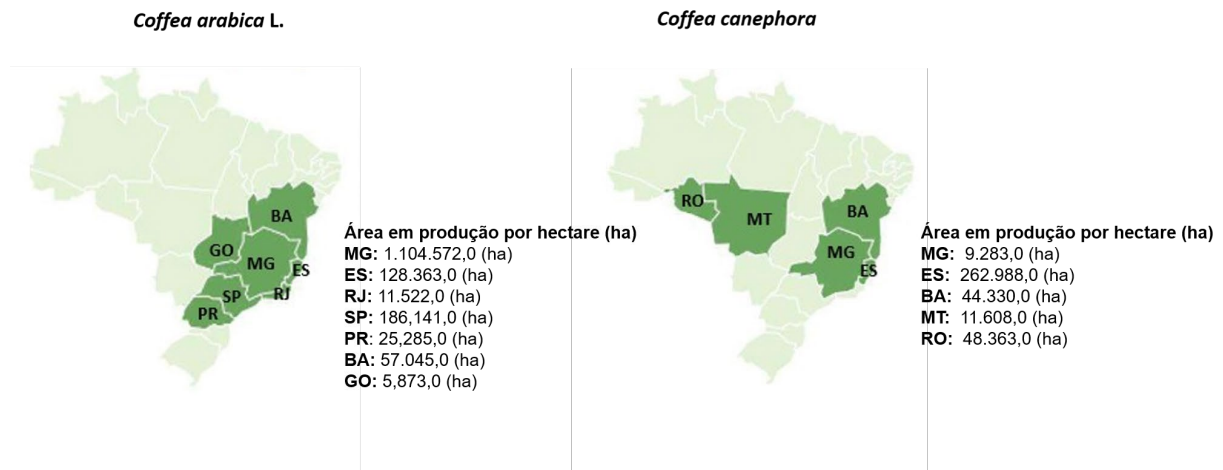
Em contrapartida, *C. eugenoides* é um cafeeiro que cresce em regiões de altitudes mais elevadas, temperaturas médias de 18 a 23°C, seu habitat é em regiões próximas às bordas de florestas e regiões secas (Montagnon *et al.*, 2025). Comercialmente, não é uma espécie de valor agregado, devido à sua baixa produtividade e tamanho reduzido dos grãos, de formato arredondado e com teor de cafeína entre 0,8 a 1,4% (International Coffee Organization -ICO, 2017). Contudo, em programas de melhoramento, esta espécie é utilizada para a qualidade da bebida e redução dos níveis de cafeína (Mishra *et al.*, 2022).

### 3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CAFEICULTURA NO BRASIL

Historicamente, a cafeicultura chegou ao Brasil em meados de 1723, no estado do Maranhão, por mudas que vieram da Guiana Francesa, e aos poucos se espalhou pelos estados brasileiros. Em 1825, o café já era cultivado no Rio de Janeiro, São Paulo e em destaque no Vale da Paraíba (Freitas *et al.*, 2024).

O cafeeiro é considerado umas das mais importantes *commodities* agrícolas do mundo. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café. Foram exportados aproximadamente 3,8 milhões de sacas no mês de dezembro de 2024. Sendo o total de exportações do Brasil mais de 50,5 milhões de sacas de 60 kg no mesmo ano, com um volume de 28,8% maior que o ano anterior (CONAB, 2024). Conforme os dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, a concentração da produção encontra-se em seis estados brasileiros: Minas Gerais lidera as produções com 27,68 milhões de sacas de café, seguido por São Paulo com 5,44 milhões de sacas, e Espírito Santo com 4,03 milhões de sacas; O estado do Paraná com 675,1 mil sacas e por último o Nordeste com 1,11 milhões de sacas no estado da Bahia, (CONAB, 2024).

Figura 2 — Principais regiões produtoras de café no Brasil.



Fonte: CONAB (2024).

A cafeicultura não só contribui para o PIB (Produto Interno Bruto) do país, mas também gera empregos, necessitando de mão de obra, girando capital e fortalecendo o segmento do agronegócio. Além da importância econômica, os brasileiros estão em segundo lugar no *ranking* no consumo da bebida de café, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (Moreira *et al.*, 2019).

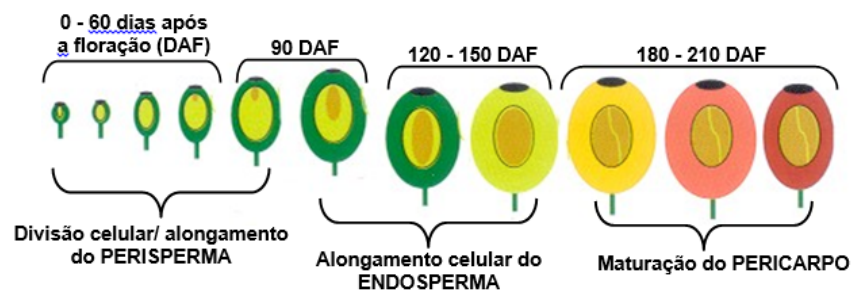
É importante ressaltar que a cultura do cafeeiro apresenta um fenômeno fisiológico conhecido como bienalidade de produtividade, o qual é caracterizado por uma variação de produtividade entre uma safra alta e uma mais baixa. Essa bienalidade se deve a aspectos fisiológicos das plantas que apresentam em seus ramos plagiotrópicos (produtivos), zonas de crescimento e produção, sendo os frutos gerados nas axilas das folhas que se desenvolveram em nós originados do crescimento do ano anterior (Melo *et al.*, 2022).

#### 4 DESENVOLVIMENTO DO FRUTO DO CAFEIEIRO

A primeira fase do processo de desenvolvimento do fruto do cafeeiro é o crescimento (físico) do grão, logo após, o fruto amadurece. É nessa fase que são definidos a qualidade do grão, quanto sua coloração, textura, sabor e aroma. É caracterizado como um processo longo, pois leva à remoção dos tecidos, ainda na fecundação. O fruto é composto pelo pericarpo e perisperma, substituídos pelo endosperma endurecido, rico em proteínas, sacarose, e polissacarídeos, que serão as reservas da semente (Vieira, 2013; Freitas *et al.*, 2024).

De acordo com Vieira (2013), o café da espécie arábica, por exemplo, demora de 0 – 60 dias para a formação das sementes; de 90 – 120 dias para a substituição dos tecidos; 150 – 210 dias para endurecer o endosperma revestido por uma película prateada (tegumento); 210 – 240 amadurecimentos do fruto; 240 dias, as cerejas encontram-se no estágio final do amadurecimento do fruto.

**Figura 3** – Representação do desenvolvimento e maturação do fruto de *C. arabica* L..



Fonte: Budzinski (2008).

Segundo Budzinski (2008), a fase inicial da maturação do fruto é a separação do perisperma com o endosperma, após 90 da floração. De 90 até 150 DAF (dias após a floração), o perisperma cresce e assim os frutos também, além do crescimento do endosperma e embrião. As paredes ficam espessas entre 130 e 190 DAF por um alto número de polissacarídeos ricos em arabinogalactanas e galactomananas disponíveis

nas células do endosperma, e em 210 dias, finaliza-se a fase final da maturação do pericarpo, é completamente formado o grão de café.

#### **4.1 Composição da parede celular vegetal**

A estrutura que envolve a célula vegetal é denominada parede celular, e desempenha importantes funções. Camada extracelular que envolve a membrana plasmática, (que raramente são ausentes, somente quando o endosperma está em formação), faz proteção contra patógenos, assume o controle de água e crescimento da célula e, armazena algumas enzimas (Zhang *et al.*, 2021a; Wan *et al.*, 2021; Wolf, 2022; Jia *et al.*, 2023).

A substância mais encontrada na parede celular de um vegetal, é a celulose, um polissacarídeo (açúcares simples) tal como a hemicelulose e as pectinas, porém as proteínas, ligninas e lipídeos também compõem a parede celular vegetal, que se diferem em primária e secundária (Cosgrove, 2024b). Parede primária se organiza em 65% de água, o restante da matéria seca se distribui em 30% celulose, 30% hemicelulose e 30% pectina, e proteínas: expansinas, extensinas entre outras. A parede secundária é rica em lignina, e tem um teor menor de água, além dos polissacarídeos, é mais grossa, compõe geralmente os vasos lenhosos de xilema e floema (Jia *et al.*, 2023).

A celulose é um composto orgânico rico em carbono, constituído por vários monômeros de glicose; um polímero de glicose é formado por ligação beta 1-4, que caracteriza esse polissacarídeo como não digerível e também resistente a reações químicas (Aziz *et al.*, 2022). Um conjunto de polímeros de celulose agrupados tem o nome de microfibrilas (Cosgrove, 2024b).. A celulose tem a responsabilidade pela permeabilidade da parede celular do vegetal, controla as trocas de nutrientes e sinais químicos entre as células do meio extracelular (Budzinski, 2008). A hemicelulose (xiloglucano e a xilina) são moléculas menores que a celulose, elas são formadas por restos de xilose, arabinose, galactose, manose e ramnose (Cosgrove, 2024b). Polímero

heterogêneo de pentose com diferentes monômeros e glicose, na qual liga as microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio (Budzinski, 2008).

Já as pectinas, são inicialmente encontradas em forma de protopectina (polímeros de ácido galacturônico) no vegetal e são responsáveis pela rigidez da parede, sendo ainda insolúveis em água. O polissacarídeo pectina, é um ácido solúvel em água, encontrado como resíduos de monossacarídeos com galactose, arabinose e ramnose (Cosgrove, 2024b). Podem estar unidos por ligações  $\alpha$  1-4 aos monômeros de D- galacturônico (Budzinski, 2008). Um polissacarídeo não apresenta um sabor doce, mas é responsável pela viscosidade, consistência, resistência e textura de um alimento (Cosgrove, 2024b).. No cafeeiro eles interferem no sabor da bebida proveniente da torrificação do café, além de interferirem também na espuma de um café expresso (Budzinski, 2008).

## 5 EXPANSINAS

As proteínas expansinas (EXPs) são classificadas em quatro grupos (subfamílias):  $\alpha$ -expansinas (EXPA),  $\beta$ -expansinas (EXPB), expansina-like A (EXLA) e expansina-like B (EXLB) (LI et al., 2021). EXPA e EXPB são os dois grandes grupos que mantêm seus motivos conservados e possuem características semelhantes (LI et al., 2021). São constituídas por volta de 250 a 275 aminoácidos (aa) cada, procedidas por um peptídeo sinal (N-terminal) com 20 a 30 aa de comprimento (Budzinski *et al.*, 2007). O domínio I é homólogo à família de glicosídeo hidrolase (45 proteínas), e o domínio II acredita-se ser um domínio de ligação de polissacarídeos na superfície da proteína. Sabe-se que as maiores famílias (EXPA e EXPB) estão relacionadas ao afrouxamento da parede celular, em contrapartida, as expansinas (EXLA e EXLB) são reconhecidas apenas pelas suas sequências conservadas e as suas funções permanecem desconhecidas (Cosgrove, 2024a)..

Tais proteínas estão envolvidas na parede celular do vegetal e atuam promovendo a expansão celular, por serem capazes de romperem ligações de hidrogênio (ligações não covalentes), na celulose e na hemicelulose. Atuam também no desenvolvimento da organogênese (ectoderme, mesoderme e endoderme) da planta, na germinação de sementes e maturação dos frutos (Budzinski, 2008). Elas foram descobertas pela primeira vez em hipocótilos (Caderas *et al.*, 2000), e posteriormente analisadas, em outras culturas também, como na do *Triticum*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Nicotiana tabacum* e entre outras (Marowa; Ding; Kong, 2016).

As EXPs possuem resíduos conservados de cisteína na região N-terminal do domínio catalítico, um *motif* HFD (histidina, fenilalanina e aspartato) na região central e resíduos conservados de triptofanos (Trp) na região C-terminal do domínio de ligação para celulose (Budzinski *et al.*, 2011). Lee *et al.* (2001), relatam que a organização éxon/íntron das expansinas são conservadas, mas diferenciadas no tamanho de cada íntron.

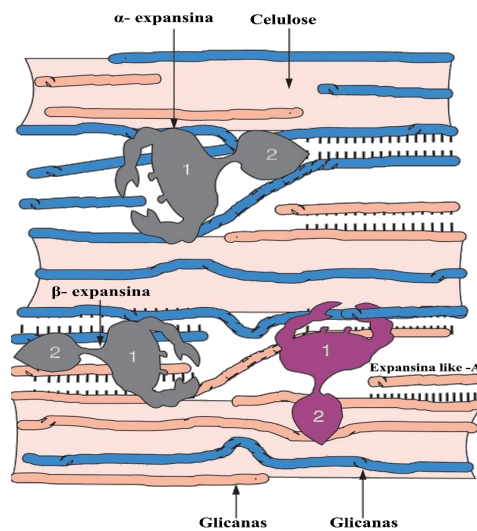
As  $\alpha$ -expansinas são caracterizadas por regulação de pH na parede celular vegetal, por possuírem um caráter ácido em torno de 4 e 4,5 permite mudança de pH

pela ação da H-ATPase na membrana plasmática, que bombeia prótons (átomos de carga positiva) para dentro da parede celular (Marowa; Ding; Kong, 2016). Elas também são responsáveis por controlar a expansão e reprodução nos órgãos reprodutores (Marowa; Ding; Kong, 2016). As  $\beta$ -expansinas, são relatadas no crescimento e extensão celular, além dessas condições de crescimento, é também presente na regulação de estresse abiótico por baixa temperatura e resposta a fitohormônios, em plantas dicotiledôneas como a *Arabidopsis thaliana* (Feng *et al.*, 2019). Já a EXLA e a EXLB ainda são poucas conhecidas suas funções e estão sendo estudadas.

### 5.1 Mecanismo de ação e regulação das expansinas

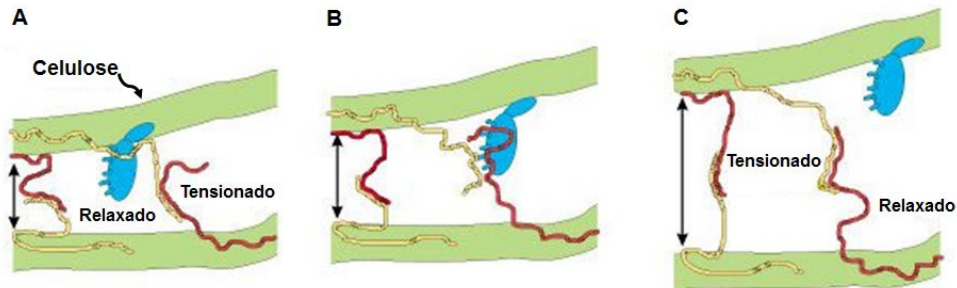
Com papel de alongamento e expansão celular as expansinas podem atuar da seguinte maneira:

Figura 4 — Representação da parede celular e quebra de componentes pelas EXPs.



Fonte: Adaptada de Sampedro e Cosgrove (2000).

Figura 5 — Modelo proposto do mecanismo de ação das expansinas sobre a parede celular.



Fonte: Cosgrove (2000).

Legenda: As microfibrilas de celulose (**representado em verde**) estão ligadas entre si por glicanos (**linhas amarelas e vermelhas**), que podem aderir entre si. **A.** As Expansinas (**representado em azul**) são direcionadas para a parede celular, onde os glicanos estão tensionados; **B.** Expansinas agindo e rompendo a ligação entre os glicanos aderidos à superfície da microfibrila; **C.** Deslocando os polímeros da parede e desencadeando o deslizamento no ponto de adesão dos polímeros, permitindo assim o relaxamento da parede celular.

Na figura 4, está representada a parede celular contendo os quatro membros das famílias das EXPs,  $\alpha$ ,  $\beta$ , like-A e like-B, além dos polissacarídeos. A parede celular torna-se mais ácida devido à atividade da auxina (hormônio), que exerce um efeito de crescimento na parede celular e induz a ativação e expressão de gene das expansinas, na qual as EXPs quebram as ligações cruzadas de hidrogênio com as microfibrilas de celulose, ligadas aos polissacarídeos (Cosgrove, 2000) essas microfibrilas irão deslizar aumentando a célula.

Nos primeiros estudos realizados com as expansinas, acreditava-se que essas proteínas possuíam mecanismo de ação hidrolítica. Contudo, em estudo realizado por Mcqueen-Mason e Cosgrove (1994), foi proposto um mecanismo de atuação alternativo, onde estas proteínas poderiam enfraquecer as ligações não covalentes entre os polissacarídeos da parede, permitindo assim a fluência dos polímeros sem os hidrolisar (Figura 5). É importante ressaltar que esse modelo demonstrou ser o mais coeso com as características da extensão da parede celular desempenhada por essas proteínas e também consistente com o progressivo enfraquecimento da parede celular pela ação das expansinas.

Apesar de ter sido encontrada primeiramente em um vegetal, as expansinas foram identificadas também em outros organismos, tais como, em bactérias e nematoides (Vieira; Nemchinov, 2020; Samalova *et al.*, 2022).

Tabela 1 — Relatos da presença de expansinas nas diferentes plantas.

Espécies	Citações	EXPA	EXPAB	EXLA	EXLB	Total
Último ancestral comum de mono e eudicotiledôneas	(SAMPEDRO <i>et al.</i> , 2005)	10-12	2	1	2	15-17
<b>Monocotiledônea</b>						
<i>Saccharum</i> spp (Cana de açúcar).	(SANTIAGO <i>et al.</i> , 2018)	51	38	3	0	92
<i>Zea mays</i> (Milho).	(ZHANG <i>et al.</i> , 2014)	36	48	4	0	88
<i>Triticum aestivum</i> L. (Trigo).	(HAN <i>et al.</i> , 2019)	121	104	16	0	241
<i>Oryza sativa</i> (Arroz).	(SAMPEDRO <i>et al.</i> , 2005)	33	18	4	1	56
<b>Dicotiledônea</b>						
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	(SAMPEDRO <i>et al.</i> , 2005)	26	6	3	1	36
<i>Vitis vinifera</i> (Uva).	(DAL SANTO <i>et al.</i> , 2013)	20	4	1	4	29
<i>Malus domestica</i> Borkh (Maçã).	(ZHANG <i>et al.</i> , 2014)	34	1	2	4	41
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Feijão).	(ZHU <i>et al.</i> , 2014)	25	6	0	5	36
<i>Brassica rapa</i> (Repolho chinês).	(KRISHNAMURTHY <i>et al.</i> , 2019)	39	9	2	3	53
<i>Glycine max</i> (Soja).	(ZHU <i>et al.</i> , 2014)	49	9	2	15	75
<i>Populus trichocarpa</i> (Álamo).	(SAMPEDRO <i>et al.</i> , 2006)	27	3	2	4	36
<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate).	(LU <i>et al.</i> , 2016)	25	8	1	4	38
<i>Arachis hypogaea</i> (Amendoim).	(GUIMARÃES <i>et al.</i> , 2017)	52	14	16	2	84
<i>Gossypium hirsutum</i> (Algodão).	(LV <i>et al.</i> , 2020)	67	8	6	12	93
<i>Cucumis sativus</i> L. (Pepino).	(LIU <i>et al.</i> , 2022)	21	3	7	2	33

Fonte: Adaptado de Cosgrove (2015) e Gonçalves (2016).

As expansinas apresentam diversas funções, não se expressam somente para o afrouxamento da parede celular, supõem também, sua participação no: amadurecimento do fruto, na fase de germinação de semente, formação de xilema e de pétala, iniciação do crescimento foliar, e participação na regulação dos estômatos (Zhang *et al.*, 2014a; Gonçalves, 2015). Em plantas de *Gossypium hirsutum* L. (algodão), Zhang *et al.* (2021b) descreve a expressão da *GhEXLB2* nos tecidos vegetais, raiz, caule, folha, pétala, antera, estigma e óvulo, contudo, as plantas submetidas ao estresse a seca induzida por PEG (polietilenoglicol) e NaCl (cloreto de sódio), desencadeou a overexpressão de *GhEXLB2*, entretanto, o tratamento com ABA diminui a expressão do gene, concluindo que a *GhEXLB2* desempenhou um papel importante na regulação de estresse seca. Chen *et al.* (2021) observaram que as expansinas do *T. aestivum* L. (trigo) auxiliam a planta no crescimento e no processo de desenvolvimento e resposta a estresses abióticos.

Estudando plantas transgênicas de *T. aestivum* L. expressando *TaEXPA2* foi observado um aumento na tolerância à seca. Devido essa provável interação o autor Yang *et al.* (2020) aponta três fatores: 1- a *TaEXPA2* poderia aperfeiçoar o acúmulo dos osmoprotetores e a capacidade de reter água; 2- a interação entre a diminuição dos EROs (espécies reativas de oxigênio) e aumento da capacidade antioxidante; 3- a *TaEXPA2* pode desencadear aumentar o crescimento e desenvolvimento radicular da raiz lateral, aumentando a absorção de água. Contudo, é apontado que o aumento da transcrição do MYB e TaMPS, interagem com genes promotores de transcrição do *TaEXPA2*, atuando como reguladores de expressão do gene. Narayan *et al.* (2021), também utilizando uma planta transgênica de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) superexpressando o gene *EaEXPA1* (*Erianthus arundinaceus*), observaram aumento dos fatores essenciais para a planta quando submetida a condição de déficit hídrico e não mostraram sintomas de murcha.

Em plantas como *A. thaliana* (planta modelo) as expansinas além de realizarem o afrouxamento da parede celular, também apresentam características biomecânicas, atuando na remodelação da parede celular através do seu controle sobre as propriedades viscoelásticas presente nas paredes celulares (Samalova *et al.*, 2024). Liu *et al.* (2021) observaram que os genes *AtEXPA4* e *AtEXPB5* são altamente expressos em tubos polínicos e pólenes maduros, e o gene *AtEXPA4* mostrou efeito positivo no crescimento das raízes primárias (Liu *et al.*, 2021).

Conforme Abbasi; Malekpour; Sobhanverdi, (2021), a planta *N. tabacum* (tabaco) transgênico superexpressando o gene *AtEXP18* (*A. thaliana*) apresentou característica como mitigador ao déficit hídrico e atuando positivamente para o aumento dos órgãos do tabaco e elevando a biomassa produzida mesmo sob condições de estresse. As expansinas também podem atuar em resposta ao estresse biótico. Por exemplo, Brasileiro *et al.* (2021) observaram a superexpressão do gene *AdEXLB8* de *Arachis* selvagem em tabaco, aumentando a tolerância da planta ao estresse à seca como também resposta a dois patógenos destrutivos do tabaco transgênico.

## 5.2 Expansinas envolvidas na maturação

A mudança de textura mais acentuada da polpa é provocada pela solubilização e despolimerização da camada de hemicelulose e pectina da parede celular (Fenn; Giovannoni, 2021). A acumulação de RNAm de expansinas em frutas sugere que são regulados pelos sinais de amadurecimento. Anteriormente, Budzinski *et al.* (2011) relatam o perfil transcricional de três isoformas de  $\alpha$ -*expansina* relacionadas a mudanças no tamanho do grão e no processo final de maturação em frutos de *C. arabica* L. Chen *et al.* (2022) descreveu que a expansina *MdEXLB1* de *Malus domestica* Borkh (maçã) atua na maturação dos frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) transgênico. Estes autores analisaram a expressão de 34 genes de *EXPA*, um *EXPB*, dois *EXLA* e quatro *EXLB*, em quatro períodos de colheita do fruto, sendo, 15, 10, 5 e 0 dias antes da colheita. Os resultados mostraram que 17 genes de *EXPA* foram altamente expressos durante os 15 dias antes da colheita e seus níveis de expressão diminuíram posteriormente com o amadurecimento do fruto (Chen *et al.*, 2022). A *EXPB* não apresentou expressão, e as *EXLA* foram altamente expressas apenas nos 15 e 10 dias antes da colheita. Entretanto, dos quatro *EXLB* apenas o *EXLB1* foi fortemente expresso gradualmente até o período de 0 dias antes da colheita (Chen *et al.*, 2022).

Posteriormente, Chen *et al.* (2024), identificaram cinco genes de  $\alpha$ -*expansinas* expressos durante toda a fase de maturação em *Rubus chingii* Hu (framboesa chinesa).

## 6 OBJETIVO

### 6.1 Objetivo geral

Identificação *in silico* e caracterização molecular dos genes da família das expansinas de *Coffea arabica* L.

### 6.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificação/categorização dos genes candidatos da família das expansinas nos genomas de *C. arabica* L.
- ✓ Seleção dos genes candidatos para a validação utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real.
- ✓ Expressão dos genes das expansinas em diferentes tecidos principalmente durante o desenvolvimento e maturação dos frutos de *C. arabica* L.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 Etapa 1

#### 7.1.1 Obtenção das sequências de expansinas e endoglucanases no *Coffea arabica* L.

Inicialmente foram realizadas buscas pelas sequências codificadoras de *expansinas* e *endoglucanases* da família 45 (EG45s) nos bancos de dados do genoma de *C. arabica* L. (<http://coffee-genome.org/>) (Denoued *et al.*, 2014) e no banco de dados do *NCBI* (Altshul *et al.*, 1997), para a espécie *C. arabica* L.. Nesta busca, utilizaram-se sequências das proteínas de expansinas de *A. thaliana* (planta modelo).

Todas as sequências obtidas (genômicas, proteínas e CDS – *Coding DNA Sequence*/sequência codificadora) foram copiadas em formato *FASTA* e armazenadas para posteriores análises *in silico*. Adicionalmente, todas as sequências obtidas foram verificadas quanto à presença dos respectivos *motifs* de cada família, bem como, cada sequência também foi individualmente confrontada com as sequências depositadas no banco de dados do *NCBI*, utilizando as ferramentas *BlastX* e *BlastP*. O banco de dados *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/>) (Goodstein *et al.*, 2012), também foi utilizado para a obtenção das sequências *EXPs*, já caracterizadas na literatura, de outras espécies de plantas para as análises *in silico*.

#### 7.1.2 Características das expansinas e endoglucanases de *Coffea arabica* L.

As análises quanto às características das proteínas de expansinas e endoglucanases: peso molecular (kDa) e ponto isoelétrico (pI), foram calculadas utilizando a ferramenta *ExpASy* - Compute pI/Mw no site ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)). Para a localização subcelular, foi utilizado o algoritmo *Plant-mPLOC* encontrado no site (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) (Chou; Shen, 2010). Posteriormente, o índice de propriedade hidrofílica/hidrofóbica de todas as sequências de proteínas (*hydropathy index* - *Grand*

*average of hydropathy*), foi verificado através do site *GRAVY calculator* (<https://www.gravy-calculator.de/>).

### 7.1.3 Localização dos genes *EXPs* e *EG45s* e estruturas gênicas

O mapeamento físico dos cromossomos de todos os genes *EXPs* e *EG45s* identificados para a espécie de *C. arabica* L., foi realizado através do site *MG2C* (<http://mg2c.iask.in/>) (Chao *et al.*, 2021), conforme as suas coordenadas do genoma. Quanto à caracterização das estruturas gênicas (éxon/intron) dos genes *EXPs* foram obtidas por mapeamento das sequências CDS e DNA genômico, utilizando o programa *Gene Structure Display Server 2.0 (GSDS)* do site <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/> (Hu *et al.*, 2015).

### 7.1.4 Alinhamento e análise filogenética

Inicialmente para as análises filogenéticas, foi realizado um alinhamento múltiplo com todas as sequências de aa das expansinas e endoglucanases de *C. arabica* L. com *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *O. sativa* utilizando o programa *CLC Main Workbench 8.0*, para identificar as regiões descritas na literatura contendo o domínio característico desse grupo ( $\alpha$ -expansinas;  $\beta$ -expansinas; expansina-like A; expansina-like B). A partir do alinhamento através do algoritmo *ClustalW*, as árvores filogenéticas foram geradas utilizando o programa *MEGA11* (Tamura, Stecher, Kumar, 2021), empregando o método de *Neighbour-Joining* (NJ) modelo de substituição *p-distance*, *pairwise deletion*, com valor de *bootstrap* de 1.000 réplicas independentes.

### 7.1.5 Análise *in silico* da expressão dos genes *EXPs*

Adicionalmente, foi realizado uma análise *in silico* do perfil transcricional dos genes das expansinas, através dos valores de RPKM (do inglês “*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*”) obtidos pelo sequenciamento de RNA (RNA-seq), que

posteriormente foram empregados no site *CIMMiner* (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMtrix.do>). Foi utilizada nesta análise a espécie *C. canephora* para escolher os genes candidatos para a análise com *C. arabica* L.. Os resultados foram expressos e apresentados na figura 11 para inferir o padrão transcricional dos genes.

#### 7.1.6 Análises de sintenia, *Ka/Ks* e estruturação dos *motifs* conservados

A sintenia foi gerada através dos dados GFF e FNA do *C. arabica* L., *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *O. sativa* depositados nos bancos de dados *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) e *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e inseridos no programa *Tbtools*. Em seguida, os genes foram selecionados e realizado a análise de colinearidade.

Análise *Ka/Ks*, fornece informações quanto à duplicação dos genes ortólogos. Para o cálculo aproximadamente do evento da duplicação, foram estabelecidas pela equação ( $T = Ks/2\lambda$ ), na qual ( $\lambda$ ) de  $7,41 \times 10^{-9}$  é assumido como valor médio para taxa de substituições sinônimas (Yu *et al.*, 2011). Nesta análise utilizaram-se as sequências CDS retiradas do *NCBI* em conjunto com o agrupamento dos genes em pares da árvore filogenética do *C. arabica* L., no qual, foram inseridos no programa *Tbtools*.

Os *motifs* conservados foram gerados pelo site *MEME* (<https://meme-suite.org/meme/>) com o emprego das sequências de proteínas e a seleção de dez *motifs*.

#### 7.1.7 Estruturas tridimensional (3D) dos genes de *expansina* em *Coffea arabica* L. e análise *cis*-elementos

A construção das imagens 3D, consistiu no emprego das sequências de aa coletados no *NCBI*, que posteriormente foram inseridos na ferramenta de bioinformática *Phyre2* encontrada pelo site (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Posteriormente, utilizando o banco de dados *Phytozome*, foram coletadas as regiões 1500 pb (pares de base)

iniciais de cada gene de *C. arabica* L., e foram adicionados na plataforma *PlantCARE* pelo site (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Em seguida, os dados gerados pelo *PlantCARE* foram inseridos na ferramenta *Tbtools*.

## 7.2 Etapa 2

### 7.2.1 Material vegetal

O material vegetal foi coletado no campo experimental do IDR-Paraná (Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná), em Londrina (23°08'47''S e 50°52'23''O). Para análise molecular, foram coletados frutos de *C. arabica* L. cv. IAPAR-59 em diferentes estágios fenológicos. A coleta dos frutos foi realizada a cada 25-30 dias em diferentes ramos de oito plantas, entre os meses de outubro a abril. Os frutos foram separados conforme o mês de coleta (Tabela 2) e coloração do pericarpo (Figura 3). Posteriormente, para as análises moleculares, os tecidos do fruto (pericarpo, perisperma e endosperma) foram separados com auxílio de bisturi e nitrogênio líquido (N). Os materiais vegetais coletados foram imersos imediatamente em N líquido e armazenados em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

Tabela 2 — Representação de separação dos frutos coletados para análises moleculares.

Meses	Dias Após Floração (DAF)	Coloração pericarpo	Estádio de Desenvolvimento
Outubro	30	Verde	Expansão Inicial
Dezembro	90	Verde	
Janeiro	120	Verde	Formação do Endosperma
Março	180	Verde	Maturação dos Frutos

Fonte: O autor.

### 7.2.2 Extração de RNA total e purificação

O RNA total de todo material vegetal foi isolado conforme o protocolo de Chang; Puryear; Cairney (1993). As amostras de RNA foram purificadas utilizando o kit *Pure Link Micro to Midi Total RNA Purification System (Invitrogen)* e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e tratadas com DNase/RNase. As concentrações do RNA e a pureza foram determinadas usando NanoDrop® ND-100 (*Thermo Scientific*), espectrometria a 260 e 280 nm e as razões 260/280 e 260/230. Foram utilizadas as amostras que apresentaram razão acima de 1,8. A ausência de contaminação com DNA genômico foi confirmada por PCR utilizando *primers* específicos.

### 7.2.3 Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através da enzima *SuperScript IV Transcriptase Reversa (Invitrogen)*, seguindo as instruções do fabricante, num volume final de 20 µL, utilizando 2 µg de RNA total. Para cada 1 µg do RNA total extraído, foi misturado a 500 ng de Oligo (dT)12-18 e 1 mM de dNTP mix. A remoção do RNA original foi realizada por meio de incubação dessa reação a 37°C por 20 min com RNase H (*Invitrogen*).

### 7.2.4 Avaliação transcricional de genes por RT-qPCR

A eficiência de amplificação de todos os genes candidatos neste estudo foi avaliada conforme os valores individuais de amplificação de transcritos apresentados por cada um deles e estes plotados e analisados *in silico* pelo Programa *LinRegPCR* (Ramakers *et al.*, 2003). Os produtos finais de cDNA foram diluídas antes de serem utilizados em RT-qPCR. Para cada amostra, as reações foram montadas em triplicata para cada uma das três repetições biológicas representadas pelos *pools* de tecidos coletados nos diferentes tratamentos, os quais utilizaram os *primers* *CaEXPA1*, *CaEXPA2*, *CaEXPA4*, *CaEXPA6*, *CaEXLA10*, *CaEXLB11*. A expressão relativa dos genes foi calculada com a utilização do método  $\Delta^{ct}$  (Zheng *et al.*, 2021). Em todas as

análises, os níveis de transcrição dos genes alvos foram normalizados contra o perfil transcricional do gene de referência (Barsalobres *et al.*, 2009). O experimento de qRT-PCR seguiu o protocolo “*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*” (Bustin *et al.*, 2009).

Tabela 3 — Genes e seqüências utilizadas para o RT-qPCR.

Gene	Primer forward	Primer reverse	Amplicon (pb- pares de base)	Eficiência (%)
<i>CaEXPA1</i>	CCCTTCCTCTCATTTCTTTCCA	TTGCCACCCTCCATAGTCCC	112	100
<i>CaEXPA2</i>	ATTGCTCTGTCTTTGCTGCTGA	CCCACAAGCACCACCCATAG	97	98,5
<i>CaEXPA4</i>	CTCATCATTGGCTGTCTTTCCAT	TGTGTTGTCCATAACCTTGG	98	97
<i>CaEXPA6</i>	ATGGGTATTATGGTGGTTGGATGA	CGTGCTCAGTGCAGTTGTAGC	100	99
<i>CaEXPLA10</i>	CAGCTTGTGATCGCTGCGT	GCCGCAACCTGCTCCAT	108	87,5
<i>CaEXPB11</i>	GCGTAGCATTCTTTGCATCATT	GACCATCGTTGACAGTCTTCCAT	95	90
<i>GAPDH</i>	TTGAAGGGCGGTGCAAA	AACATGGGTGCATCCTTGCT	59	95

Fonte: Gene *GAPDH* foi baseado em Barsalobres *et al.* (2009).

### 7.2.5 Análise estatísticas

Os dados de expressão dos genes de *expansinas* (*EXPs*) foram analisados pelo teste de variância ANOVA, na qual, utilizou o delineamento inteiramente casualizado (DIC). A estatística utilizada contou com o uso do programa AgroEstat® (Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônômicos versão 1.1.0.712 rev 77) e as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* a 5% de significância.

## 8 RESULTADOS

Ao todo, 45 membros da família de expansinas foram identificados no genoma do *C. arabica* L.. Entretanto, também foram identificados 11 genes da endoglucanase da família 45 (*EG45*) (Tabela 4). Pode-se observar que a  $\alpha$ -expansina representa grande parte das expansinas identificadas no genoma do cafeeiro (Tabela 4).

Tabela 4 — Descrição sobre as características físico-químicas dos genes *EXPs* (*expansinas*) e *EG45* (*endoglucanase*) em *C. arabica* L.

Nome do Gene	Locus ID <i>Cooffea arabica</i>	Localização Cromossômica	Proteína (aa)	Mw (kDa) <sup>a</sup>	pI <sup>b</sup>	Gravy	Localização Subcelular <sup>c</sup>	Melhores Ortólogos em <i>A. thaliana</i>	Tipos de Expansinas
<i>CaEXPA1</i>	LOC113691383	Chr6c 50294818-50296057	248	26.62	9.17	-0.101	Cell wall	AT1G69530.2	expansin-A1-like
<i>CaEXPA2</i>	LOC113697447	Chr6e 37775094-37776355	248	26.59	9.16	-0.098	Cell wall	AT1G69530.2	expansin-A1-like
<i>CaEXPA3</i>	LOC113717184	Chr11c 32656787-32659117	246	26.19	9.53	-0.089	Cell wall	AT1G69530.2	expansin-A1
<i>CaEXPA4</i>	LOC113712155	Chr1e 43535126-43533432	258	27.58	8.58	0.037	Cell wall	AT2G40610.1	expansin-A2-like
<i>CaEXPA5</i>	LOC113731386	Chr1c 46817912-46816016	254	21.18	8.75	-0.044	Cell wall	AT2G40610.1	expansin-A2-like
<i>CaEXPA6</i>	LOC113725281	Chr2c 4414293-4416019	258	27.70	6.38	-0.099	Cell wall	AT2G40610.1	expansin-A2-like
<i>CaEXPA7</i>	LOC113730253	Chr2e 4206745-4208398	257	27.41	6.02	-0.096	Cell wall	AT2G40610.1	expansin-A4-like
<i>CaEXPA8</i>	LOC113709837	Chr1e 41736209-41733232	260	27.87	9.47	0.057	Cell wall	AT2G39700.1	expansin-A6-like
<i>CaEXPA9</i>	LOC113725456	Chr2c 5929159-5931920	258	27.92	9.15	-0.101	Cell wall	AT2G39700.1	expansin-A6-like
<i>CaEXPA10</i>	LOC113730473	Chr2e 6118697-6121750	258	27.93	9.15	-0.081	Cell wall	AT2G39700.1	expansin-A6-like
<i>CaEXPA11</i>	LOC113695797	Chr6e 2231702-2234768	262	28.56	9.68	-0.057	Cell wall	AT2G39700.1	expansin-A6-like
<i>CaEXPA12</i>	LOC113722302	US 64566-67312	260	27.82	9.47	0.048	Cell wall	AT2G39700.1	expansin-A6-like
<i>CaEXPA13</i>	LOC113695496	Chr6e 3808303-3806245	283	31.16	9.33	-0.434	Cell wall	AT5G02260.1	expansin-A9-like
<i>CaEXPA14</i>	LOC113738363	Chr4c 38816984-38818799	248	26.47	6.48	-0.113	Cell wall	AT2G03090.1	expansin-A10-like
<i>CaEXPA15</i>	LOC113741287	Chr4e 38892224-38894002	300	32.27	8.79	-0.028	Cell wall	AT2G03090.1	expansin-A10-like
<i>CaEXPA16</i>	LOC113699121	Chr7c 1303387-1301850	242	26.31	9.38	-0.118	Cell wall	AT3G29030.1	expansin-A10
<i>CaEXPA17</i>	LOC113712954	Chr10e 940929-942340	259	27.94	8.76	-0.102	Cell wall	AT1G20190.1	expansin-A11-like
<i>CaEXPA18</i>	LOC113689908	Chr5c 42625358-42627107	256	28.49	9.60	-0.090	Cell wall	AT3G15370.1	expansin-A12-like
<i>CaEXPA19</i>	LOC113743628	Chr5e 35956242-35958002	256	28.51	9.60	-0.090	Cell wall	AT3G15370.1	expansin-A12-like
<i>CaEXPA20</i>	LOC113737445	Chr3e 15280079-15280558	159	17.44	8.53	-0.135	Cell wall	AT3G03220.1	expansin-A13-like
<i>CaEXPA21</i>	LOC113699321	Chr7c 9122038-9118839	271	29.46	8.37	-0.081	Cell wall	AT3G03220.1	expansin-A13-like
<i>CaEXPA22</i>	LOC113702209	Chr7e 6309273-6306124	271	29.44	8.37	-0.076	Cell wall	AT3G03220.1	expansin-A13-like
<i>CaEXPA23</i>	LOC113704991	Chr8e 42215188-42216565	267	28.81	9.32	0.041	Cell wall	AT1G62980.1	expansin-A18-like
<i>CaEXPA24</i>	LOC113706227	Chr8c 36688068-36689470	267	28.88	9.40	0.035	Cell wall	AT1G62980.1	expansin-A18-like
<i>CaEXLA25</i>	LOC113708571	Chr9c 37666068-37669541	274	29.48	8.41	-0.041	Cell wall	AT3G45970.2	expansin-like A2
<i>CaEXLA26</i>	LOC113709386	Chr9e 35378523-35381429	274	29.47	8.41	-0.031	Cell wall	AT3G45970.1	expansin-like A2
<i>CaEXPB27</i>	LOC113724062	Chr2c 19513243-19514512	160	16.62	9.30	-0.156	Cell wall	AT2G45110.1	expansin-B12-like
<i>CaEXPB28</i>	LOC113720786	Chr2c 5544545-5541946	275	29.57	8.63	-0.096	Cell wall	AT1G65680.1	expansin-B15-like
<i>CaEXPB29</i>	LOC113725185	Chr2c 3654881-3652180	282	30.35	8.36	-0.076	Cell wall	AT1G65680.1	expansin-B15-like
<i>CaEXPB30</i>	LOC113690973	Chr5c 38161142-38164348	262	28.29	8.06	-0.059	Cell wall	AT4G28250.1	expansin-B16-like
<i>CaEXPB31</i>	LOC113722725	Chr2c 19510457-19512233	275	28.84	4.45	-0.015	Cell wall	AT1G65680.1	expansin-B18-like
<i>CaEXPB32</i>	LOC113728735	Chr2e 18751058-18749396	275	28.76	4.35	0.015	Cell wall	AT1G65680.1	expansin-B18-like
<i>CaEXLB33</i>	LOC113735966	Chr3c 38302445-38301677	160	17.23	8.03	0.333	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB34</i>	LOC113703109	Chr8e 1998740-2001627	275	30.02	4.70	-0.128	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB35</i>	LOC113704962	Chr8e 40306061-40307581	250	27.27	8.24	0.071	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB36</i>	LOC113705512	Chr8c 1752360-1753176	168	18.49	8.35	-0.055	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB37</i>	LOC113705516	Chr8c 1760224-1762101	255	27.97	5.04	-0.121	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB38</i>	LOC113705592	Chr8c 35145700-35147871	250	27.54	5.34	-0.066	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB39</i>	LOC113706178	Chr8c 35072260-35073780	250	27.27	8.24	0.071	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB40</i>	LOC113706183	Chr8c 35157803-35159978	251	28.23	5.79	-0.090	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB41</i>	LOC113706184	Chr8c 35173163-35174664	277	30.48	8.41	-0.090	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB42</i>	LOC113706185	Chr8c 35179272-35180822	250	27.17	8.43	0.108	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB43</i>	LOC113706427	Chr8c 35068017-35069410	250	27.48	7.98	-0.016	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB44</i>	LOC113707370	Chr8c 35162722-35164537	253	27.57	5.06	0.062	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEXLB45</i>	LOC113707375	Chr8c 35056229-35058037	253	27.57	5.06	0.041	Cell wall	AT4G17030.1	expansin-like B1
<i>CaEG46</i>	LOC113691867	Chr6c 9785863-9786987	136	14.47	8.65	0.082	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like
<i>CaEG47</i>	LOC113692947	Chr6c 9788798-9799448	131	13.71	4.81	0.383	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like
<i>CaEG48</i>	LOC113694143	Chr6c 9810058-9811144	129	13.71	5.16	0.151	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like
<i>CaEG49</i>	LOC113694317	Chr6c 9849466-9850493	129	13.64	8.59	0.265	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like
<i>CaEG50</i>	LOC113692946	Chr6c 9779601-9784484	121	13.08	5.04	-0.068	Cell wall	AT2G18660.1	EG45-like
<i>CaEG51</i>	LOC113694674	Chr6e 10187204-10188370	137	14.51	8.65	0.143	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like
<i>CaEG52</i>	LOC113694964	Chr6e 10190252-10191589	132	13.93	5.17	0.325	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like
<i>CaEG53</i>	LOC113697339	Chr6e 10214220-10215281	129	13.70	8.25	0.241	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like
<i>CaEG54</i>	LOC113706279	Chr8c 30168488-30177170	140	14.77	8.42	0.068	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like
<i>CaEG55</i>	LOC113706820	Chr8c 861140-860225	134	14.71	8.85	-0.013	Cell wall	AT2G18660.1	EG45-like
<i>CaEG56</i>	LOC113703339	Chr8e 35174290-35182867	140	14.88	8.42	0.091	Cell wall	AT4G30380.2	EG45-like

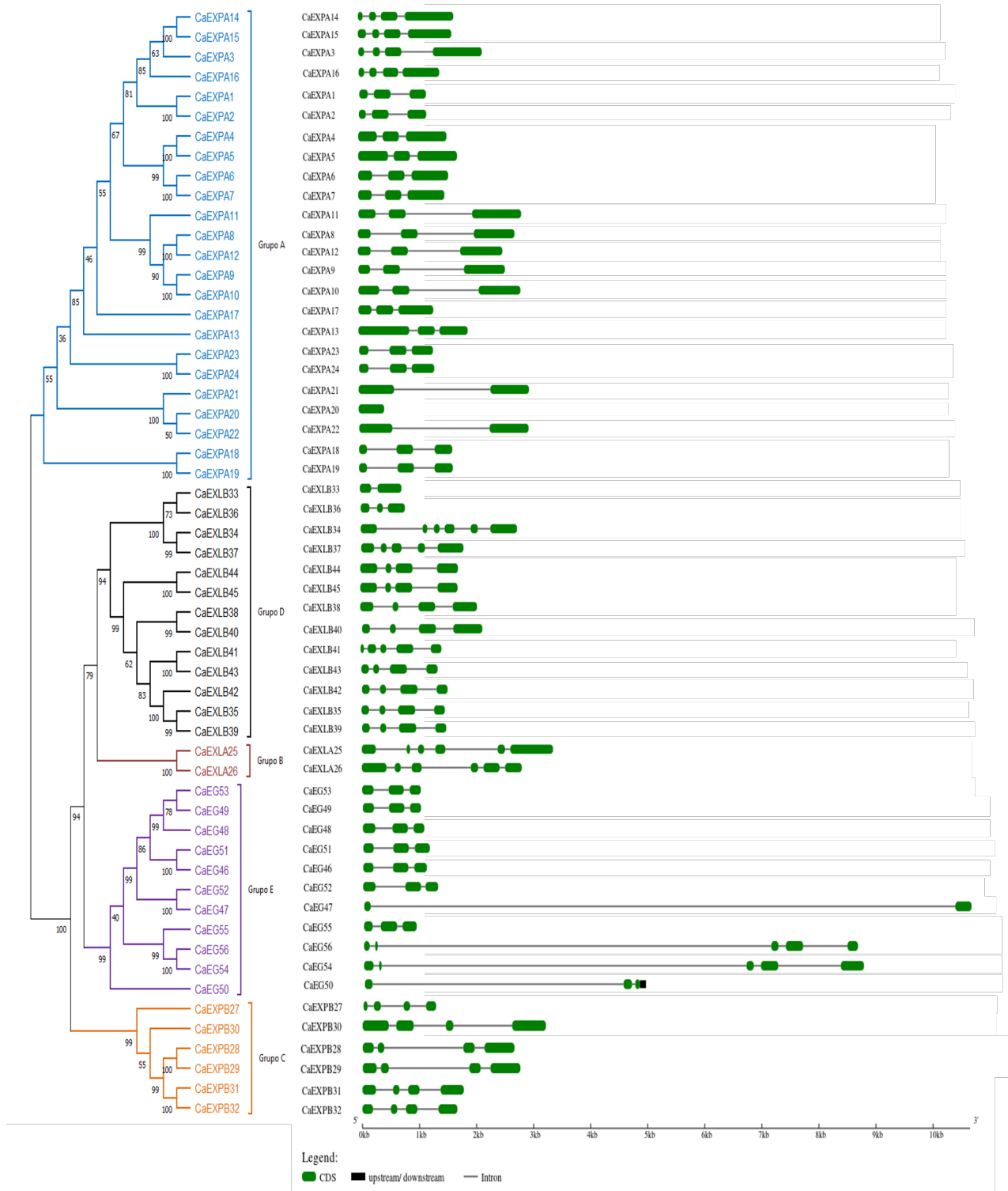
Fonte: O autor.

Legenda: Detalhes sobre as características estudadas: <sup>a</sup>Tamanho da proteína (aa); <sup>b</sup>Peso molecular; <sup>c</sup>Ponto isoelétrico; <sup>d</sup>Índice de propriedade Hidrofílica (Valores Negativos) /Hidrofóbica (Valores Positivos); <sup>e</sup>Predição de localização subcelular; <sup>h</sup>Similaridade com *A. thaliana* (ortólogo)

As características de cada gene (*EXPs*) foram calculadas utilizando a ferramenta *ExpPASy* (Tabela 4). Os dados mostram que os aa previstos das proteínas *EXPs* apresentaram uma variação de 159 aa (*CaEXPA20*) a 300 aa (*CaEXPA15*); o peso molecular das proteínas *EXPs* ficou entre 16.62 (*CaEXPB27*) a 32.27 kDa (*CaEXPA15*); pI variou de 4.35 (*CaEXPB32*) a 9.68 (*CaEXPA11*); e o *GRAVY* variou de 0.015 (*CaEXPB31*, *CaEXPB32*) a 0.434 (*CaEXPA13*) (Tabela 4). Os resultados quanto à localização subcelular demonstraram que todos os genes *EXPs* estão presentes na parede celular. Nesse estudo, foi possível descrever os tipos de expansinas que compõem o *C. arabica* L.: 24  $\alpha$ -expansinas (*CaEXPA1* a *CaEXPA24*), seis  $\beta$ -expansinas (*CaEXPB27* a *CaEXPB32*), dois expansinas like-A (*CaEXLA25* e *CaEXLA26*), 13 expansinas like-B (*CaEXLB33* a *CaEXLB45*), e 10 *EG45-like* (*CaEG46* a *CaEG56*).

A análise da estrutura dos genes (éxons/introns) foi gerada através da ferramenta de bioinformática *GSDS*, que consistiu na aplicação das sequências de CDS e DNA genômico coletadas na plataforma *NCBI*. Visto que a análise estrutural dos genes é uma ferramenta importante, pois fornece informações relevantes sobre a função, organização e evolução, possibilitando visualizar a diversidade estrutural dos genes neste estudo (Figura 6). Nota-se uma variação de éxon/intron de 2/1 (*CaEXPA21*, *CaEXPA22* e *CaEXLB33*) a 6/5 (*CaEXLA25*, *CaEXLA26* e *CaEXLB34*) (Figura 6).

Figura 6 — Análise estrutural dos genes *EXPs* de *C. arabica* L.

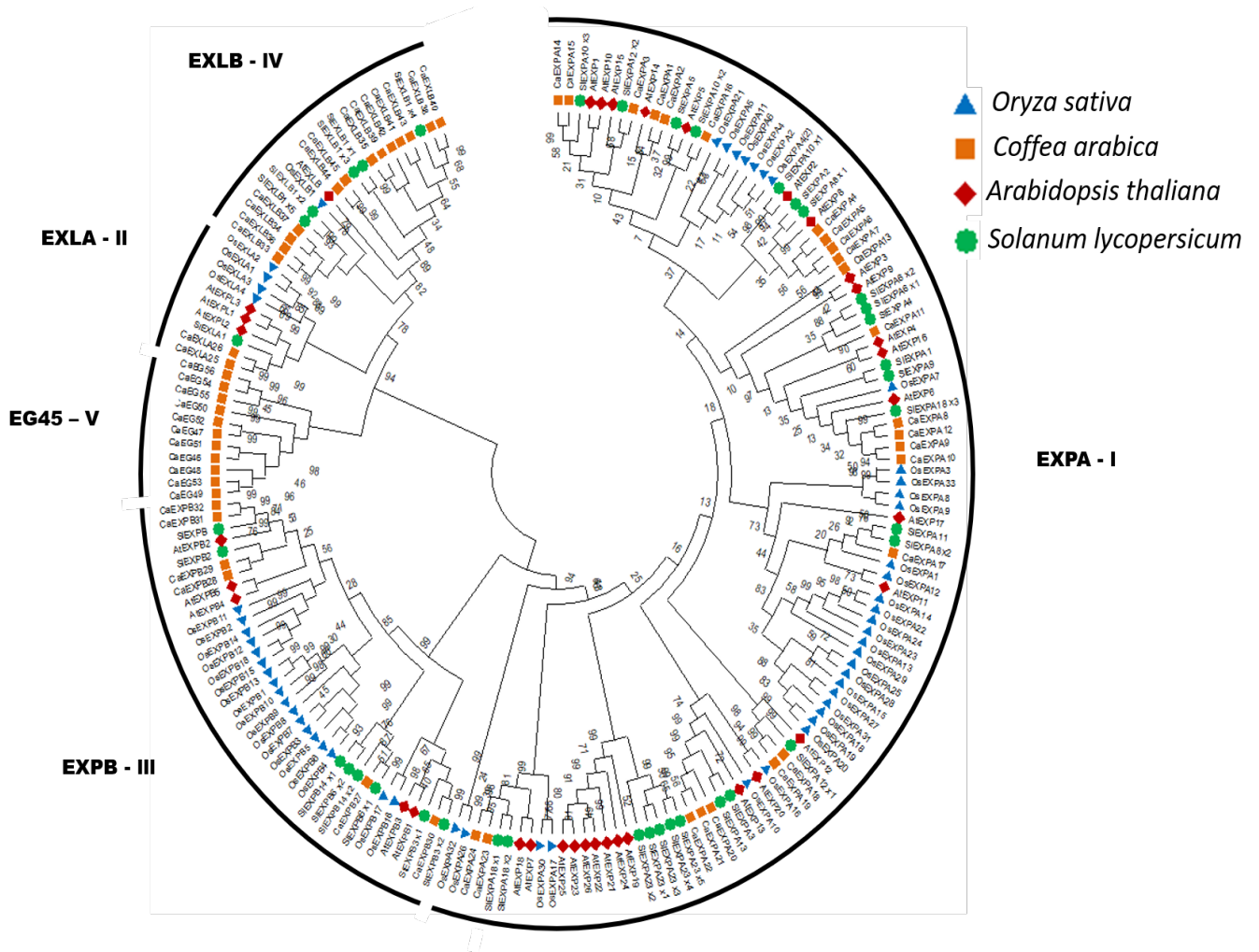


Fonte: O autor.

As sequências de proteínas de *EXPs* coletadas na plataforma *NCBI* foram submetidas à ferramenta *MEGA11* que agrupou as expansinas de acordo com sua constituição (Figura 6). Foi gerada uma árvore filogenética para verificar as relações entre as proteínas, resultando na formação de cinco grupos classificados de A a E conforme a função desempenhada pela proteína (ver Figura 6).

Para análise filogenética, utilizou-se a mesma ferramenta de aplicação descrita na Figura 6. Foram utilizadas as 45 sequências de proteínas de *C. arabica* L. (CaEXPs) e 11 (CaEG45), na qual, foram empregadas em conjunto com 35 sequências de proteínas de *A. thaliana* (AtEXPs), 38 sequências de *S. lycopersicum* (SlEXPs) e 56 de *O. sativa* (OsEXPs). As sequências de *A. thaliana* foram constituídas por, 26  $\alpha$ -expansina (AtEXP1 a AtEXP26), cinco  $\beta$ -expansina (AtEXPB1 a AtEXPB5), três expansina like-A (AtEXPL1 a AtEXPL3), uma expansina like-B (AtEXPLB) (Figura 7).

Figura 7 — Relação filogenética dos genes de *C. arabica* L. em conjunto com os genes de *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *O. sativa* depositados do banco de dados NCBI.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: As sequências foram alinhadas utilizando o método ClustalW e geradas no programa MEGA11 com 1000 replicações de bootstrap.

Nota-se que as sequências de *S. lycopersicum* apresentaram 25  $\alpha$ -expansina, sete  $\beta$ -expansina, uma expansina like-A e cinco expansina like-B (Figura 7). Enquanto as 56 sequências de *O. sativa* foram formadas por 33  $\alpha$ -expansina (OsEXPA1 a OsEXPA33), 18  $\beta$ -expansina (OsEXPB1 a OsEXPB18), quatro expansina like-A (OsEXLA1 a OsEXLA4) e um expansina like-B (OsEXLB1) (Figura 7). As proteínas foram classificadas em cinco subgrupos de EXP-I, EXP-II, EXP-III, EXP-IV e EXP-V, sendo representados respectivamente pela classificação de  $\alpha$ -expansina, expansina

like-A,  $\beta$ -expansina, expansina like-B e EG45-like (Figura 7). O grupo EXP-I é o maior, com 108 membros, seguido pelos demais grupos em ordem decrescente (Figura 7).

Eventos de duplicação desempenham um papel vital na evolução das plantas, como duplicações em tandem e segmentares, que são processos importantes que resultam na expansão do genoma e no aumento da complexidade. A análise de  $Ka/Ks$  obteve como base a árvore filogenética da figura 6 com o agrupamento de seus genes (Tabela 4). A tabela foi formada por 21 blocos de pares, dos quais quatro (*CaEXPA18/CaEXPA19*, *CaEXPB28/CaEXPB29*, *CaEXLB35/CaEXLB39* e *CaEG52/CaEG47*) não obtiveram valores diferentes de 0 indicando que não houve evento de duplicação, os demais apresentaram valores diferentes de  $0 < 1$ , variando de 0.102 a 0.736, e determinando evento de duplicação (Tabela 4).

Tabela 4 — Representação sobre o evento de duplicação dos genes de expansinas dentro do genoma do *C. arabica* L.

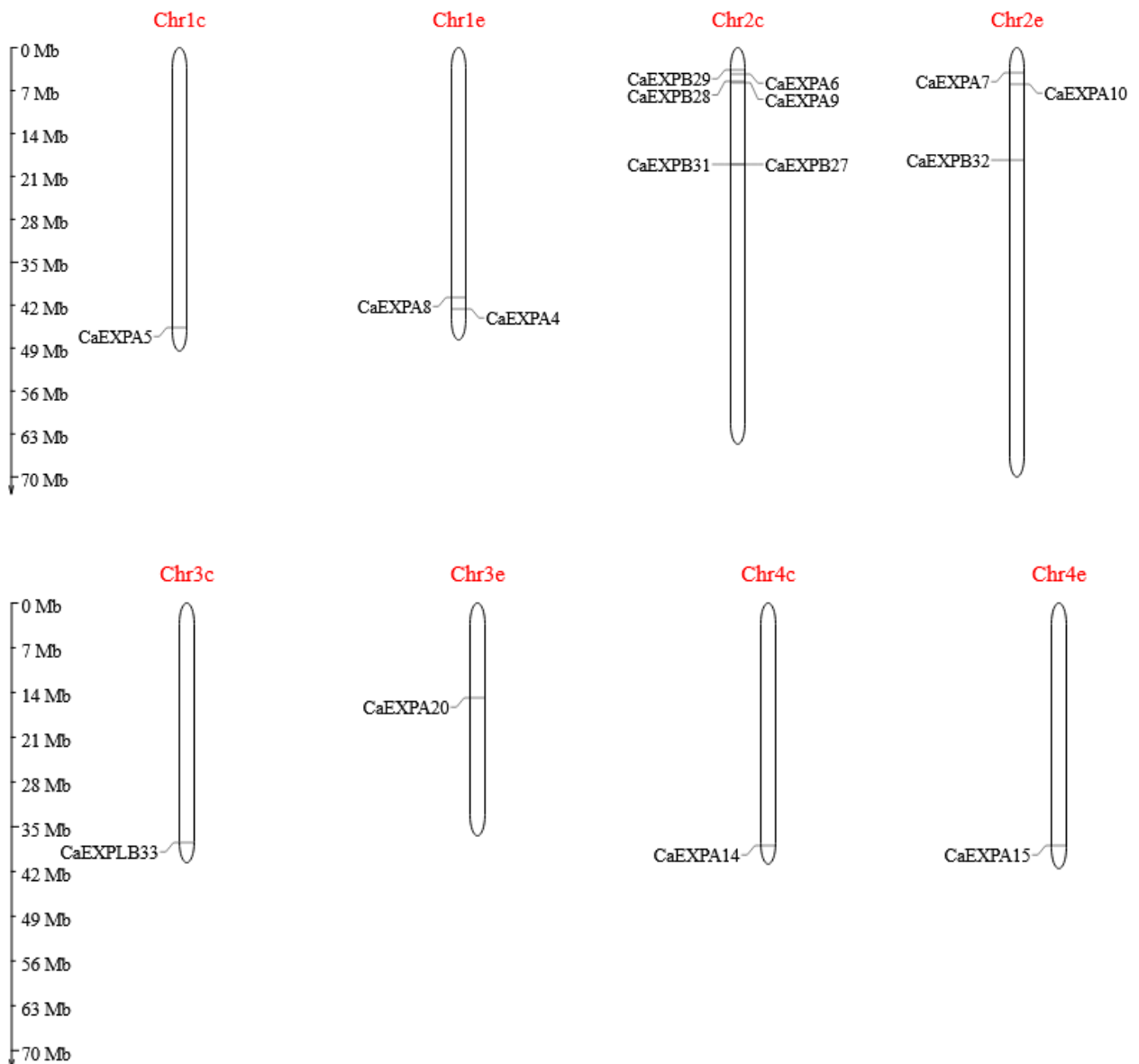
Seq 1	Seq 2	Ka	Ks	Ka_Ks	Evento de Duplicação	Time (MYA)
<i>CaEXPA1</i>	<i>CaEXPA2</i>	0.0017639	0,0172009	0.1025483	Segmental	0,63
<i>CaEXPA4</i>	<i>CaEXPA5</i>	0.0086506	0,0515469	0.1678199	Segmental	1,9
<i>CaEXPA6</i>	<i>CaEXPA7</i>	0.0056479	0,0669136	0.0844068	Segmental	2,47
<i>CaEXPA8</i>	<i>CaEXPA12</i>	0.0925023	0,1723111	0.5368329	Segmental	6,38
<i>CaEXPA9</i>	<i>CaEXPA10</i>	0.0051561	0,0213347	0.2416775	Segmental	0,79
<i>CaEXPA14</i>	<i>CaEXPA15</i>	0.0106937	0,0226967	0.4711587	Segmental	0,84
<i>CaEXPA18</i>	<i>CaEXPA19</i>	-0.0	-0.0	-----	Segmental	0
<i>CaEXPA20</i>	<i>CaEXPA22</i>	0.2163336	0,2935841	0.7368709	Segmental	10,87
<i>CaEXPA23</i>	<i>CaEXPA24</i>	0.0036057	0,022686	0.1589425	Segmental	0,84
<i>CaEXLA25</i>	<i>CaEXLA26</i>	0.0080139	0,0261236	0.3067703	Segmental	0,96
<i>CaEXPB28</i>	<i>CaEXPB29</i>	-0.0	-0.0	-----	Tandem	0
<i>CaEXPB31</i>	<i>CaEXPB32</i>	0.0081345	0,0295604	0.2751839	Segmental	1,09
<i>CaEXLB33</i>	<i>CaEXLB36</i>	0.1465002	0,2833775	0.5169788	Segmental	10,49
<i>CaEXLB34</i>	<i>CaEXLB37</i>	0.0598099	0,1219981	0.4902527	Segmental	4,52
<i>CaEXLB35</i>	<i>CaEXLB39</i>	-0.0	-0.0	-----	Segmental	0
<i>CaEXLB38</i>	<i>CaEXLB40</i>	0.1688015	0,3296179	0.5121128	Tandem	12,21
<i>CaEXLB41</i>	<i>CaEXLB43</i>	0.0144408	0,0431773	0.3344546	Tandem	1,59
<i>CaEXLB44</i>	<i>CaEXLB45</i>	0.0070299	0,0327324	0.2147692	Tandem	1,21
<i>CaEG51</i>	<i>CaEG46</i>	0.0186038	0,0630194	0.2952072	Segmental	2,33
<i>CaEG52</i>	<i>CaEG47</i>	-0.0	-0.0	-----	Segmental	0
<i>CaEG56</i>	<i>CaEG54</i>	0.0063864	0,009539	0.6695000	Segmental	0,35

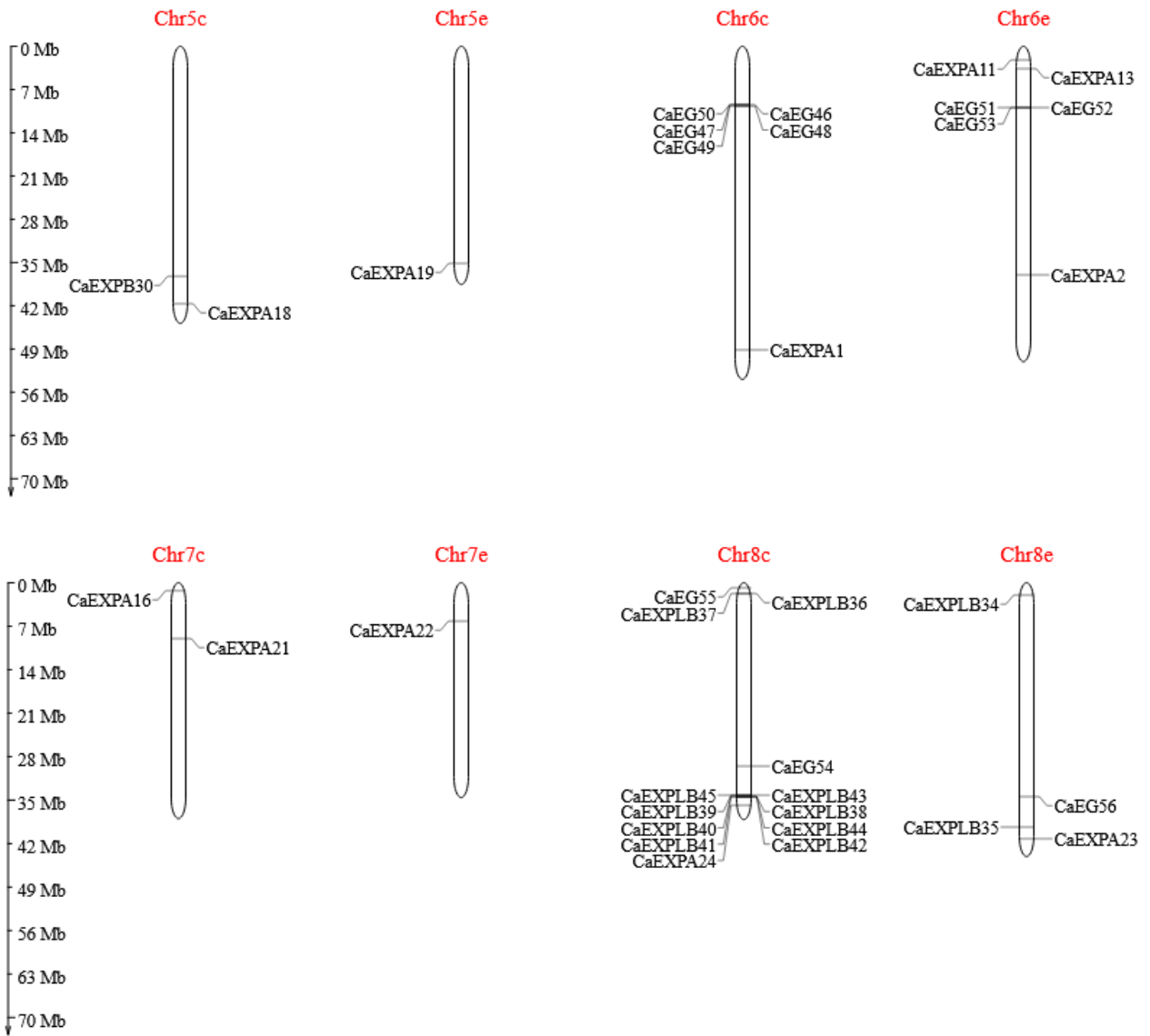
Fonte: Próprio autor.

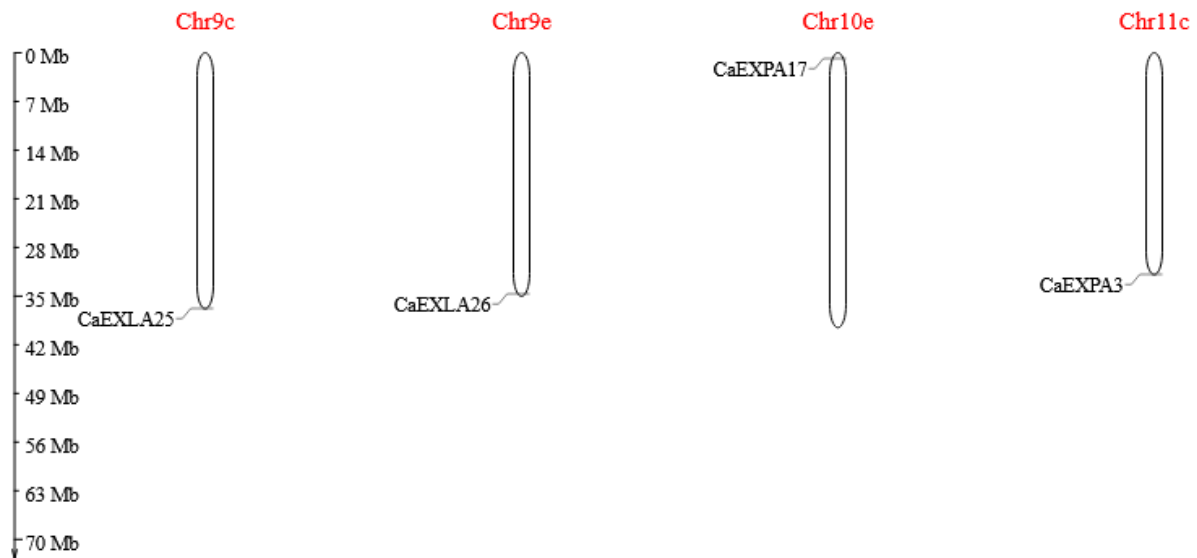
Legenda: O  $Ka$  (substituições não sinônimas),  $Ks$  (grupo sinônimo),  $Ka/Ks$  a razão entre os dois grupos. O evento de duplicação caracteriza o tipo de duplicação, time (MYA) é o tempo em milhares de anos em que ocorreu o evento de duplicação.

Para examinar a destruição e mapeamento dos genes *CaEXPs* de *C. arabica* L. uso-se a ferramenta *MG2C* (Figura 8). Com base nas informações de anotação dos genomas descritos na Tabela 3. Os genes foram mapeados e distribuídos entre os 11 pares de cromossomos do *C. arabica* L. (Figura 8).

Figura 8 — Mapeamento dos genes *EXPs* entre os pares de cromossomos 1 e 11 de *C. arabica* L.







Fonte: Próprio autor.

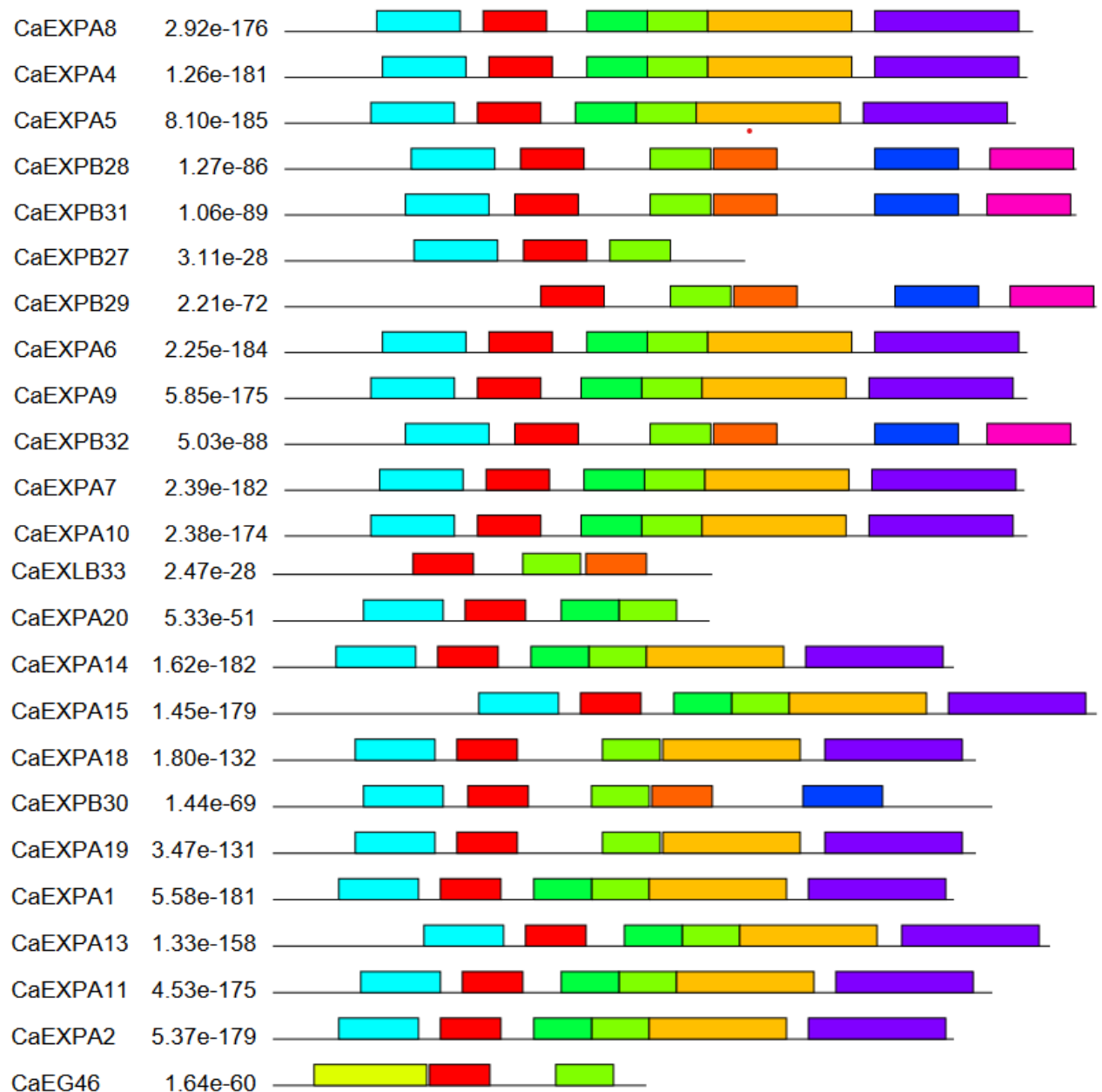
Legenda: Barras verticais representam os cromossomos. O número do cromossomo está no topo de cada cromossomo é descrito os seus parentais (*C. canephora* e *C. eugenioides*). A barra de escala à esquerda está representada pela escala do comprimento dos cromossomos (Mb - megabases).

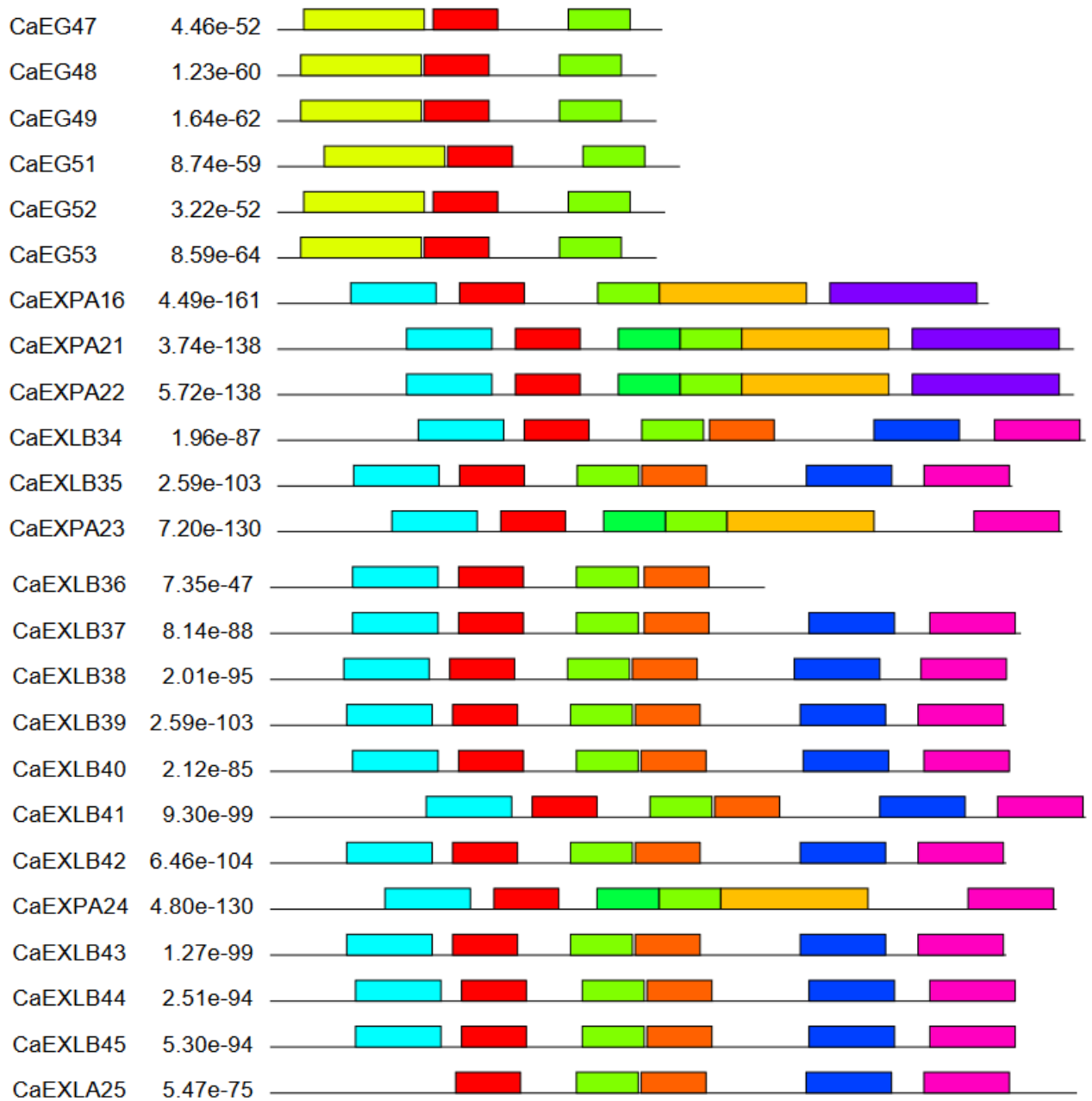
Contudo, o banco de dados *NCBI* supõe que os cromossomos do cafeeiro apresentem essa conformação de Chr1c (*C. canephora*) e Chr1e (*C. eugenioides*) a Chr11e e Chr11c, por ser um organismo tetraploide (4n) e apresentar os cromossomos de seus ancestrais *C. canephora* (2n) e *C. eugenioides* (2n).

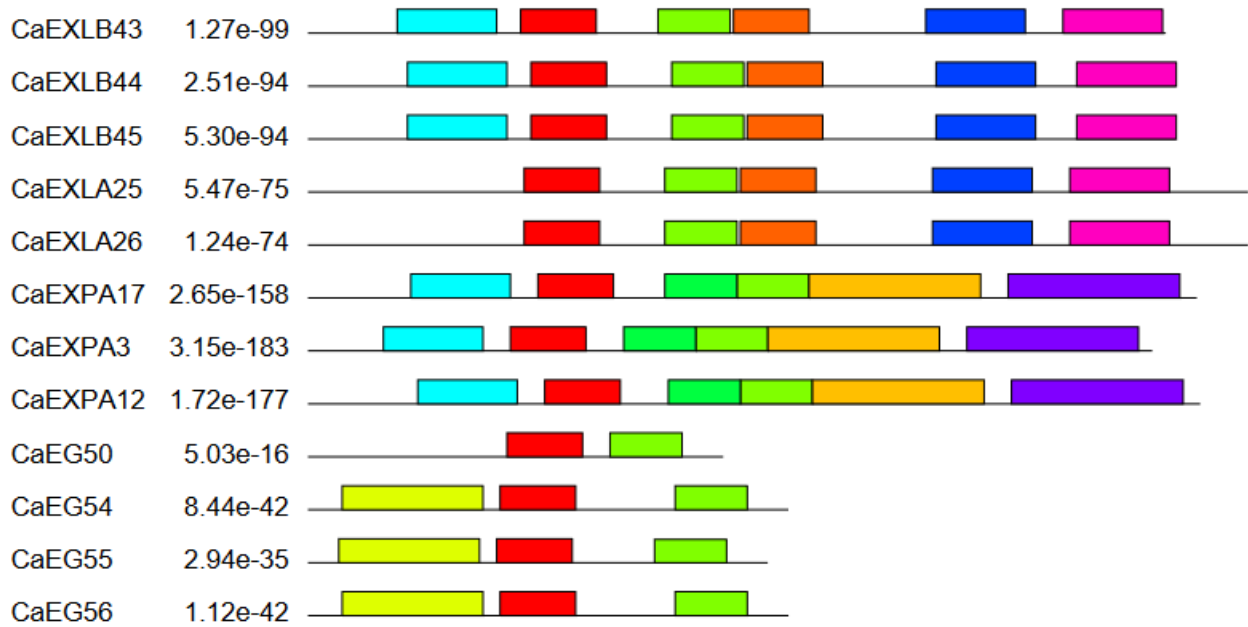
Na figura 8, os cromossomos Chr10c e Chr11e foram retirados por não apresentarem genes de *EXPs*. Os genes de expansinas foram distribuídos de forma desigual entre os 11 pares de cromossomos (Figura 8). O Chr8c é o cromossomo que tem maior quantidade de genes ancorados associados à *expansina*, seguido pelos Chr6c e Chr6e com seis genes cada (Figura 8). É importante mencionar que esses genes estão relacionados ao domínio da proteína EG45-like, enquanto os demais apresentam uma variação de um a quatro genes por cromossomos (Figura 8).

As análises dos motivos conservados foram calculadas pela ferramenta *MEME* e predicado por 10 *motifs* (Figura 9).

Figura 9 — Caixas coloridas indicam o *motifs* (conservação), calculado pela ferramenta *MEME* (*Multiple EM for Motif Elicitation*). Com a predição de 10 *motifs* conservados para os 45 genes de (*CaEXPs*) e 11 genes de (*EG45*), usado para estimar os comprimentos das proteínas (aa).







Motif	Symbol	Motif Consensus
1.		AALSTALFNNGAACGACYZVRC
2.		GWQSAHATFYGGSDASGTMGGACGYGNLY
3.		CNPPRTHFDLSQPAFLKIAQP
4.		MSRNWQNWQNSYLBGQSLSFRTTSDGRTLTSYNVAPANWQFGQTFEG
5.		RAGIVPVSYRRVPCRKKGGIRFTINGHSYFNLVLTNVGGAGDIVSVSIK
6.		TVTATNFCPPNYALPNDNGGW
7.		VEVYZEDSKEWKPMRRAYGAVWDJTNPPL
8.		SESGQWVAKNVJPSEWKAGMTYDTGVQL
9.		KAAELLALGVIDVEYKRVPCSY
10.		MMIGMVASLVSYSYAATGTATFYTPPYVPSSCYQNGVM

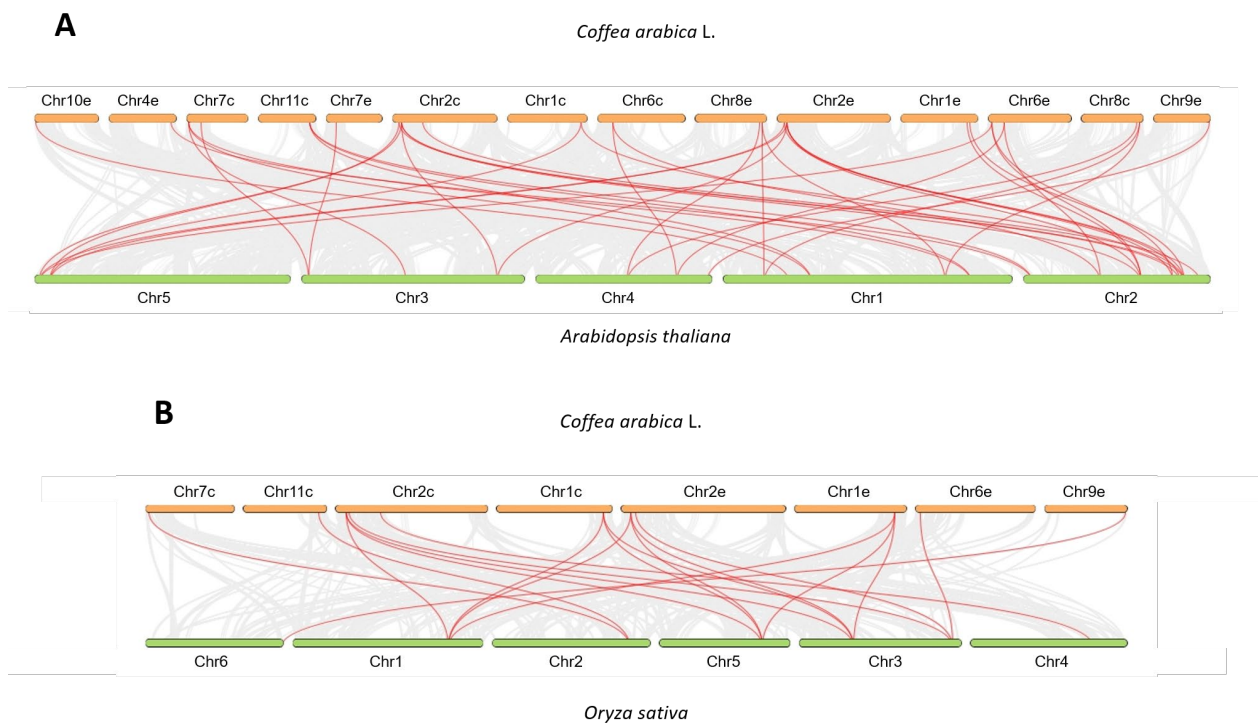
Fonte: O autor.

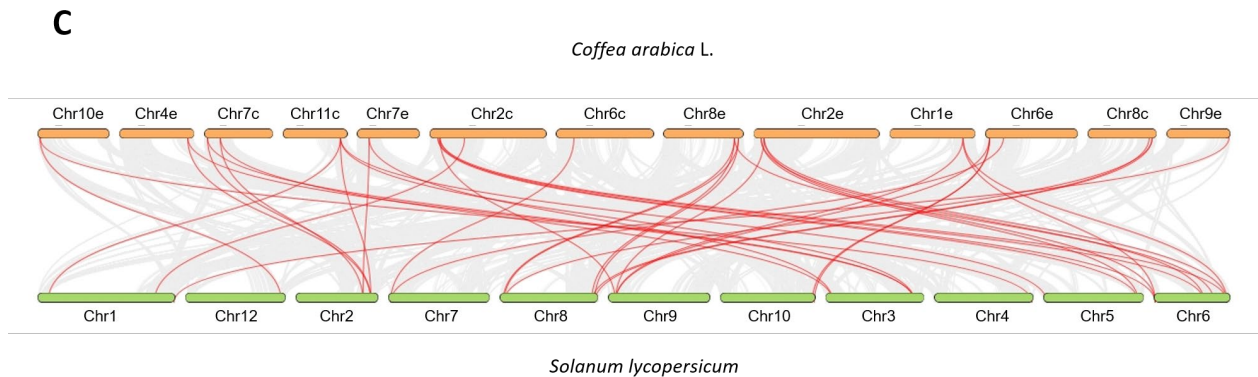
As sequências resultantes dessa análise foram confrontadas pela plataforma *INTERPRO* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) quanto ao seu domínio, as sequências confirmadas foram: **1.** AALSTALFNNGAACGACYZVRC (Vermelho); **2.** GWQSAHATFYGGSDASGTMGGACGYGNLY (Azul Claro); **3.** CNPPRTHFDLSQPAFLKIAQP (Verde Claro); **4.** MSRNWQNWQNSYLBGQSLSFRTTSDGRTLTSYNVAPANWQFGQTFEG (Roxo); **5.** RAGIVPVSYRRVPCRKKGGIRFTINGHSYFNLVLTNVGGAGDIVSVSIK (Amarelo Escuro); **7.** VEVYZEDSKEWKPMRRAYGAVWDJTNPPL (Azul Escuro); **8.** SESGQWVAKNVJPSEWKAGMTYDTGVQL (Rosa). Contudo, as sequências **6.** TVTATNFCPPNYALPNDNGGW (Verde Escuro) e **9.** KAAELLALGVIDVEYKRVPCSY

(Laranja); **10.** MMIGMVASLVSVSYAATGTATFYTPPYVPSSCYGYQNNGVM (Amarelo Claro), não foram previstas como expansinas (Figura 9).

A análise de sintenia, estabelece a similaridade das expansinas presentes no genoma do *C. arabica* L. com os genomas de *O. sativa*, *S. lycopersicum* e *A. thaliana*, assim, permitindo compreender seus *motifs* conservados, a ordem evolutiva de seus genomas e seleção de genes para melhoramento genético (Figura 10).

Figura 10 — Análise de sintenia foi realizada em conjunto com o teste de colinearidade, que busca a similaridade dos genes de *expansinas* e *endoglucanases* encontradas no genoma do *C. arabica* L. com os genomas da *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *O. sativa*.



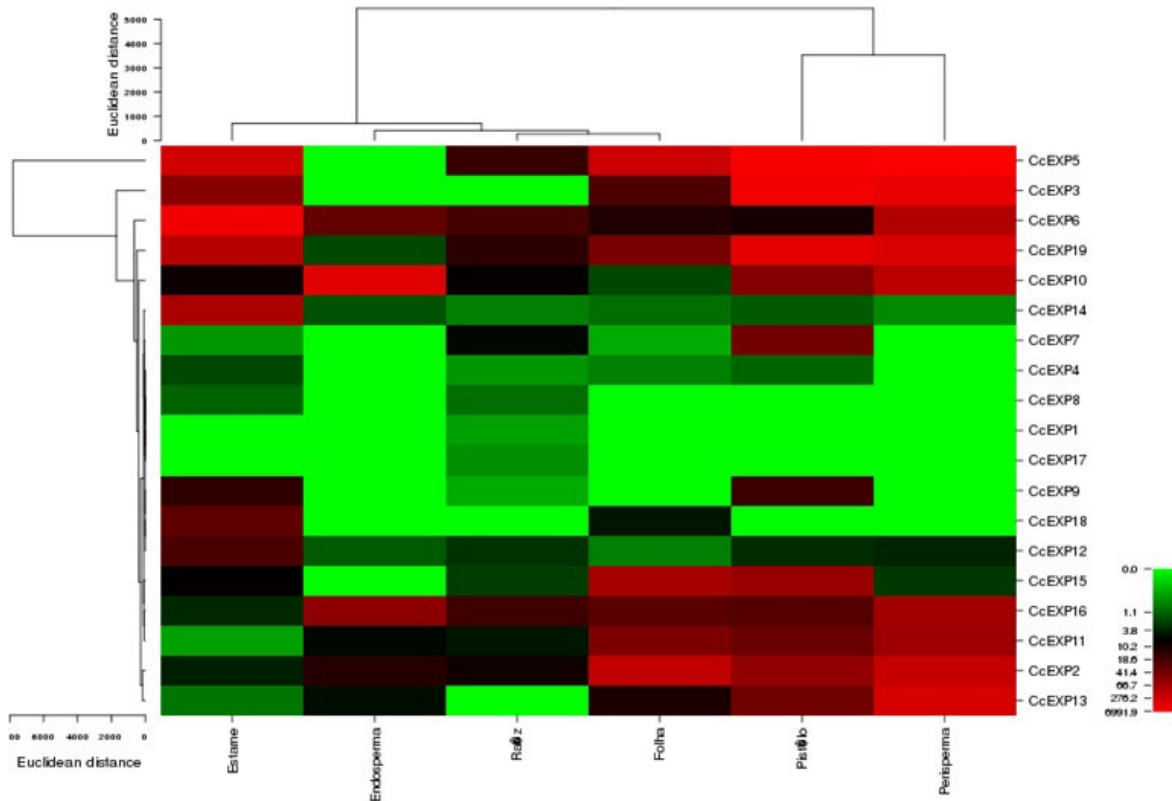


Fonte: O autor.

Os cromossomos que não obtiveram sintenia, foram retirados da figura 10. Um total de 24 genes de *C. arabica* L. obteve similaridade com o genoma de *A. thaliana*, *S. lycopersicum* e *O. sativa* (Figura 10). A análise de colinearidade destaca que *CaEXPA* foi o que obteve maior conservação entre as expansinas. *CaEXLB* e *CaEG* estão distribuídos apenas em *A. thaliana* e *S. lycopersicum*, enquanto *CaEXPA*, *CaEXPB* e *CaEXLA* se apresentam em ambos os genomas (Figura 10).

Como *C. canephora* é possivelmente um dos pais de *C. arabica* L. buscou-se traçar o perfil transcricional em *C. canephora* para selecionarmos os genes candidatos e validar em *C. arabica* L. (Figura 11).

Figura 11 — Expressão *in silico* (perfil transcricional) dos genes *EXPs* em *C. canephora*.



Fonte: Próprio autor.

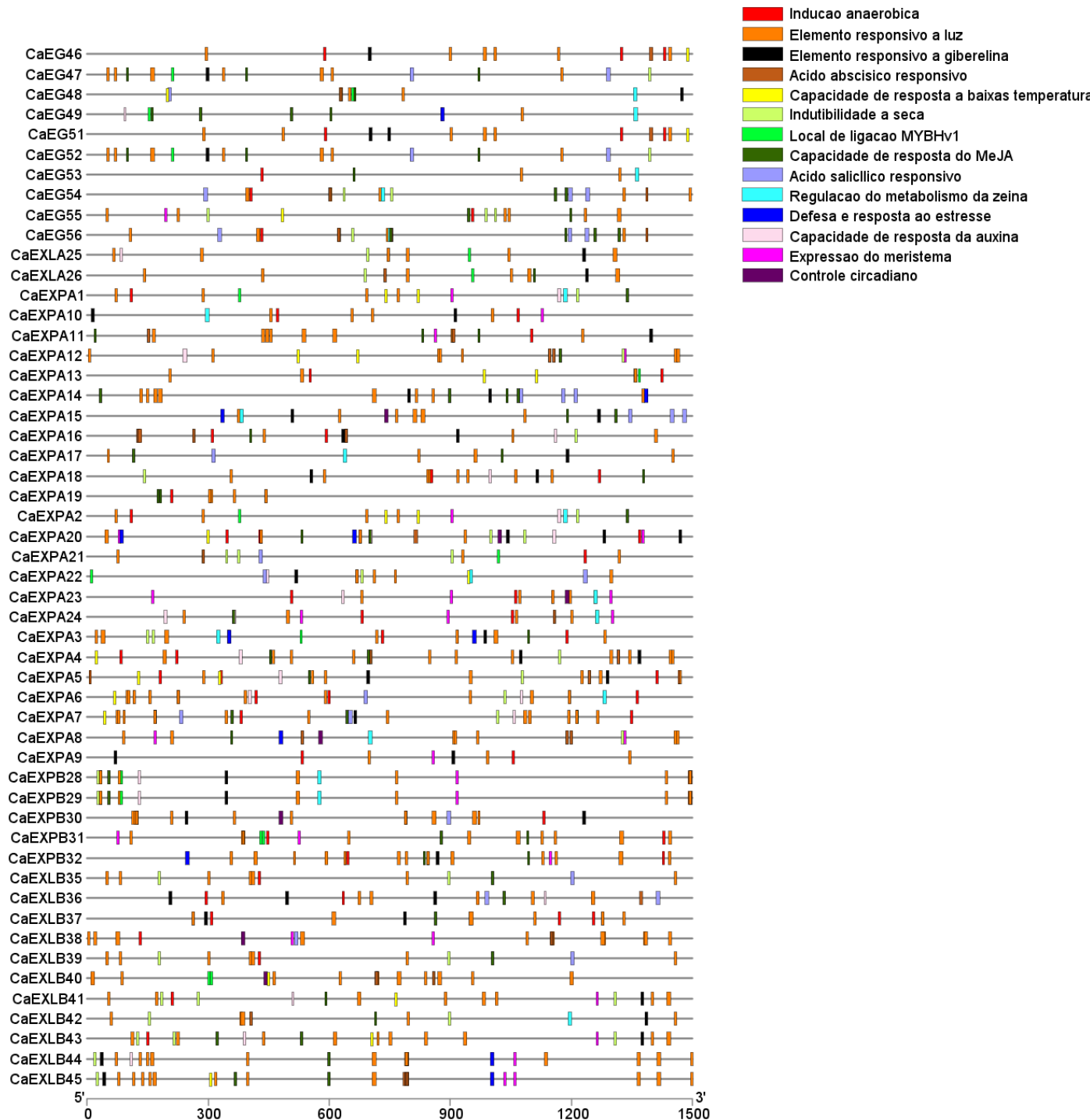
Legenda: O *heatmap* foi calculado por agrupamento hierárquico de genes *CcEXPs*. A abundância dos transcritos dos genes está representada pela escala de cores (vermelho mais expressivo e verde menos expressivo).

Os dados da expressão *in silico* apresentam uma variação quanto à expressão de alguns genes (*CcEXPs*). O perisperma foi o tecido que apresentou a maior expressão dos genes: *CcEXP5*, *CcEXP3*, e *CcEXP19*; expressão moderada dos genes *CcEXP6*, *CcEXP10*, *CcEXP16*, *CcEXP11*, *CcEXP2*, e *CcEXP13*, conforme a escala de expressão (Figura 11). Esse fato pode estar relacionado ao processo de alongamento da parede celular, como descrito na figura 3. Na fase do endosperma do fruto, apenas o gene *CcEXP10* apresentou uma expressão durante o processo inicial de amadurecimento do fruto e uma expressão moderada dos genes *CcEXP6* e *CcEXP16*.

A figura 11 permitiu selecionar genes candidatos para averiguar a sua expressão no grão de café do *C. arabica* L. por ser um híbrido do *C. canephora* com *C. eugenioides*, os genes que não foram selecionados, foi os que não obtiverem valores de expressão significativa na fase do perisperma ou endosperma. Com relação à ordem dos respectivos genes, os mesmos encontram-se na escala *Euclidean distance* na figura ilustrativa *heatmap* (Figura 11).

Adicionalmente, no genoma do *C. arabica* L. foram encontrados 14 promotores regulatórias de expressão de expansinas (Figura 12).

Figura 12 — Representa os 14 elementos regulatórios de expansinas presentes na região de 1500 *upstream* dos genes.

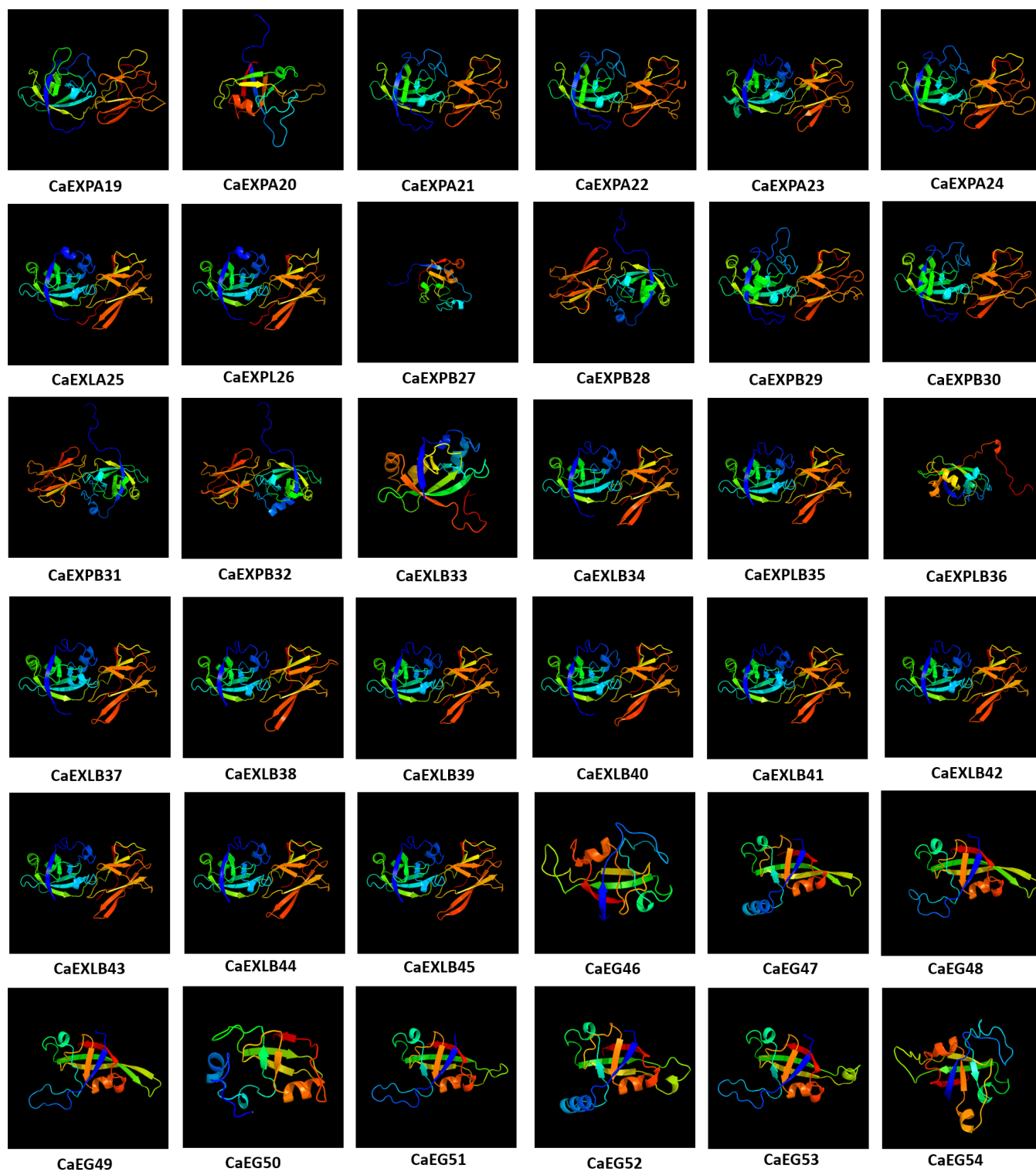


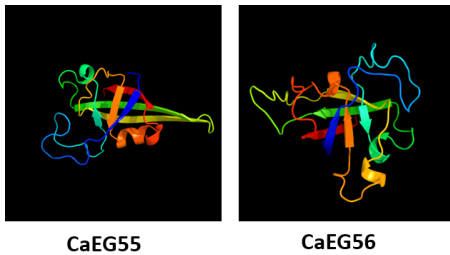
Fonte: O autor.

Essas regiões promotoras estão relacionadas com: indução anaeróbica, elementos responsivos a luz, elementos responsivos a giberelina, responsivo ao ácido abscísico, capacidade de resposta a luz, indutibilidade a seca, local de ligação da MYBHv1, capacidade de resposta ao MeJA, responsivo ao ácido salicílico, regulação do metabolismo da zeína, defesa e resposta ao estresse, capacidade de resposta da auxina, expressão do meristema e controle do circadiano (Figura 12).

Pode-se observar que o elemento de resposta à luz é o *cis*-elemento que apresenta maior abundância e capacidade de regulação da expressão de todos os genes de expansinas, apresentando cerca de 393 *cis*-elementos, seguida por resposta ao MeJA com 142 *cis*-elementos (Figura 12). Os demais apresentaram uma variação de 19 a 86 aa, os mais baixos foram controle do circadiano, defesa e resposta ao estresse com respectivos sete e 11 *cis*-elementos (Figura 12).

Figura 13 — Estruturas dos genes *CaEXPs* e *CaEG45s* encontradas no genoma do *C. arabica* L.



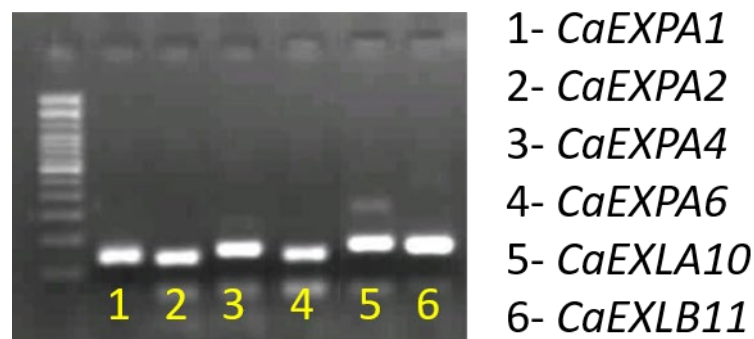


Fonte: Próprio autor.

Legenda: As expansinas são descritas pelo domínio DPBB N-terminal (azuis e verdes), e pelo domínio do módulo de ligação de carboidratos da família 63 (CBM63) (vermelho, amarelo e laranja).

A análise das estruturas 3D das expansinas foi realizada para elucidar as diferenças estruturais entre as famílias de expansinas e os genes da endoglucanase da família 45. Das 45 proteínas de expansinas apenas 41 apresentaram os dois *motifs* característicos dessa proteína, exceto pelas proteínas CaEXPA20, CaEXPB27, CaEXLB33 e CaEXLB36 que apresentaram apenas um domínio, que estruturalmente se assemelham as proteínas dos 11 CaEG da família 45 encontrados nesse estudo (Figura 13).

Figura 14 — A amplificação dos *genes* selecionados (*CaEXPA1*, *CaEXPA2*, *CaEXPA4*, *CaEXPA6*, *CaEXLA10* e *CaEXLB11*) para o qRT-PCR.



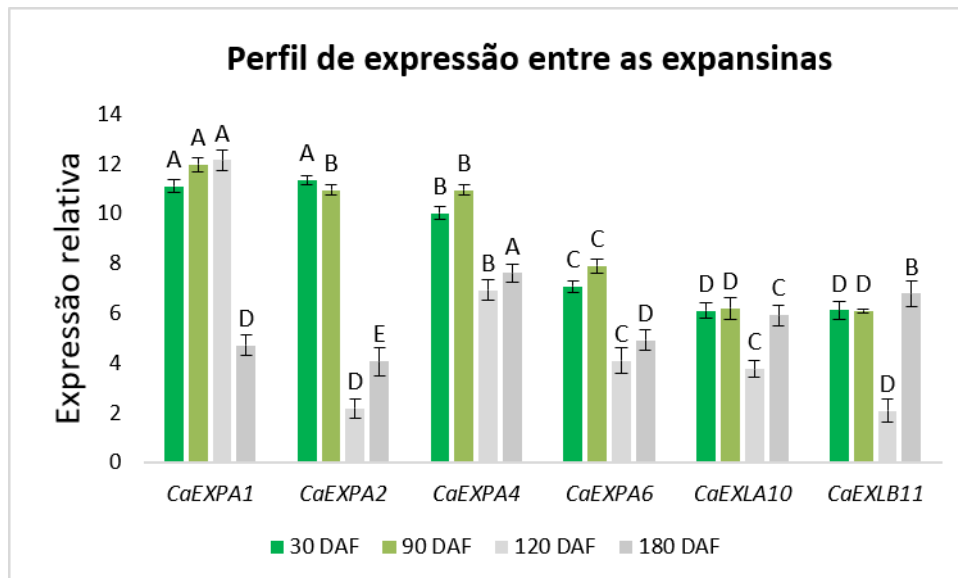
Fonte: O autor.

Paralelamente, foi realizado um teste com os seis *primers* (iniciadores) para os genes: (*CaEXPA1*, *CaEXPA2*, *CaEXPA4*, *CaEXPA6*, *CaEXLA10* e *CaEXLB11*). Com

base no resultado, os genes foram amplificados no teste de PCR convencional (Figura 14).

Para analisar a expressão dos genes de *CaEXPs* em frutos do *C. arabica* L. em diferentes períodos de coleta dos frutos (30 DAF, 90 DAF, 120 DAF e 180 DAF), utilizou-se a qRT-PCR para quantificar o padrão de expressão (Figura 15).

**Figura 15** – Padrões de expressões de seis *genes* de *CaEXPs* no fruto do *C. arabica* L. em quatro períodos de desenvolvimento: 30 DAF (dias após a floração), 90 DAF, 120 DAF e 180 DAF.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Dados obtidos pela análise qRT-PCR. As barras verticais indicam os *genes* *CaEXPs* expressos. Usou-se como gene normalizador o *GAPDH* (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009). As letras (A-E) indicam diferença significativa em  $p < 0,05$  de acordo com o teste de Tukey.

Para análise de qRT-PCR, foram utilizados seis *primers* (*CaEXPA1*, *CaEXPA2*, *CaEXPA4*, *CaEXPA6*, *CaEXLA10* e *CaEXLB11*), respectivamente (Figura 15). Em geral, a expressão dos genes foi altamente expresso em ambos os DAF (Figura 14).

Na figura 15, foi possível notar que o gene *CaEXPA1* apresentou os maiores níveis de expressão nos períodos 90 DAF e 120 DAF e seus níveis de expressão caíram no 180 DAF.

O *CaEXPA2* exibiu a maior expressão nos dois primeiros períodos, 30 DAF e 90 DAF, porém no 120 DAF e 180 DAF seus valores são os menores quando comparados com os demais (Figura 15). O gene *CaEXPA4* apresentou a maior expressão durante o 90 DAF, enquanto no 180 DAF obteve a maior expressão. Os genes *CaEXPA6* e *CaEXLA10* foram os que apresentaram valores medianos de expressão em seus quatro períodos quando comparados com os *CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA4*. Curiosamente, o *CaEXLB11* apontou uma baixa expressão nos três primeiros períodos. Contudo, ele aumenta no 180 DAF, sendo o segundo maior expresso nesse período (Figura 15).

## 9 DISCUSSÃO

As expansinas consistem em proteínas que estão associadas à parede celular e podem desempenhar vários mecanismos (Uluisik; Seymour, 2020; Zhang *et al.*, 2023; Cosgrove, 2022, 2024a). A expansina, identificada pela primeira vez em hipocótilos de pepino, é uma proteína clássica e importante da parede celular que facilita o afrouxamento da parede celular sem causar a lise dos polímeros da parede (Cosgrove, 2015; Wang *et al.*, 2024). Conforme os resultados do presente estudo, as expansinas encontradas no genoma do *C. arabica* L., são descritas por quatro tipos:  $\alpha$ -expansina (CaEXPA),  $\beta$ -expansina (CaEXPB), expansina like-A (CaEXLA), e expansina like-B (CaEXLB) (Kök *et al.*, 2023) (Tabela 4).

Segundo Cosgrove (2024), apenas as  $\alpha$ -expansina e  $\beta$ -expansina estão relacionadas com o processo de afrouxamento das paredes celulares, enquanto as expansinas-like são identificadas por ter semelhanças genéticas com as EXPs  $\alpha$  e  $\beta$ . Com base na tabela 3, foram encontrados 45 genes candidatos a expansinas no genoma do *C. arabica* L., das quais, exibiram variação de aa de 242-300. Também foi observada a presença de 11 genes referidos à EG45 (endoglucanase da família 45) identificados no genoma do cafeeiro, formados por 129-168 aa (Tabela 3). Foram observados em outros estudos, por exemplo, em *Brassica rapa* (Krishnamurthy *et al.*, 2019) e *G. hirsutum* L. (Lv *et al.*, 2020) que as características das expansinas podem apresentar poucas alterações. A maior variação observada nesse estudo foi a quantidade e o tipo de expansina (Tabela 4).

*C. arabica* L. é um híbrido poliploide, resultado de um cruzamento natural entre dois diploides, *C. canephora* e *C. eugenioides* (Salojärvi *et al.*, 2024). A figura 6, com análise de alinhamento filogenético e estruturas dos genes, mostra que as subfamílias de proteínas das expansinas apresentam conservação estrutural, agrupando-se em suas respectivas famílias. Corroborando com estudos feitos em *Arachis duranensis* (amendoim) (Guimarães *et al.*, 2017), *B. rapa* (nabo) (Krishnamurthy *et al.*, 2019) e *T. dicoccon* (trigo) (Li *et al.*, 2023), os quais determinaram que as subfamílias de expansinas são altamente similares entre as espécies.

Segundo Sampedro *et al.* (2005), as primeiras expansinas surgiram antes mesmo da divisão das plantas entre monocotiledônea e dicotiledônea. Sugerindo que seu ancestral comum apresentava cerca de 15 a 17 expansinas (Wang *et al.*, 2024). Na figura 7, foi observado o agrupamento das famílias de expansinas de *C. arabica* L. contendo 45 proteínas expansinas com 36 expansinas de *A. thaliana* (dicotiledônea), 38 expansinas de *S. lycopersicum* (dicotiledônea), e 56 expansinas de *O. sativa* (monocotiledônea). De acordo com Lv *et al.* (2020), essa diferença de expansinas é estabelecida pelo aumento das EXPA e EXPB nas monocotiledôneas, enquanto as dicotiledôneas apresentam apenas uma quantidade substancial de EXPA referentes às outras três famílias de expansinas.

O aumento no número da família de expansinas em plantas e a sua variação entre as classes monocotiledônea e dicotiledônea, é em decorrência dos processos de duplicações em tandem ou segmentar no genoma (Wang *et al.*, 2024). Segundo Guimarães *et al.* (2017), a duplicação em tandem apresenta maior ocorrência nas monocotiledôneas, enquanto a duplicação segmentar em dicotiledônea. Na tabela 4 é observado o evento de duplicação dos genes de expansina no genoma do *C. arabica* L. (Figura 8), os valores não sinônimo ( $Ka$ ) e sinônimo ( $Ks$ ), data o evento de duplicação dos genes, sugerindo que o primeiro evento surgiu cerca de 12,21 milhões de anos atrás (MYA).

Nesse sentido, provavelmente os 45 genes de expansinas e 11 EG45, resultaram em 21 pares de genes duplicados, dos quais, 80,95% ocorreram pelo processo de duplicação segmentar. Enquanto os outros 19,05% foram pelo processo de duplicação tandem, assim reafirmando com os dados trazidos por Lv *et al.* (2020).

De acordo com Yu *et al.* (2011), o aumento dos genes de expansinas no *C. arabica* L. pode ser devido à sua alotetraploidia ( $4n = 44$ ), surgindo sua ocorrência por volta de 665 mil anos atrás, resultado pela hibridização natural dos genomas (*C. canephora* e *C. eugenioides*). Ambas as espécies divergiram de um ancestral comum, aproximadamente 4,3 milhões de anos atrás. Essa hipótese sugere que grande parte do genoma do ancestral comum se manteve nas duas espécies. Os genes de expansinas apresentaram pequenas alterações nos seus genes, mesmo antes da

hibridização do *C. arabica* L.. O estudo de (Moore; Purugganan; 2003) reporta que a taxa de duplicação dos genes ocorra de 0,2% a 2,0% por genes a cada milhões de anos.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo (Tabela 4) e nos estudos de Yu *et al.* (2011), os primeiros genes a sofrerem o evento de duplicação de pares após a surgimento do *C. arabica* L. pelo evento de hibridização foram os genes *CaEXPA1/CaEXPA2* (630 mil anos atrás após o evento de hibridização por duplicação segmental).

A alta taxa de duplicação dos genes de expansinas no *C. arabica* L. pode ser levada em consideração a sua aloploidia, contribuindo para uma maior diversidade genética. Segundo Combes *et al.* (2022) que realizou um estudo com o intuito de averiguar a relação de expressão total dos genes no grão de café do *C. arabica* L. com seus parentais (*C. canephora* e *C. eugenioides*) mostrou que cerca de 70% da expressão total dos genes no grão de café do *C. arabica* L. não apresentaram diferenças de expressões entre *C. canephora* e *C. eugenioides*. Os genes *CaEXPA18/CaEXPA19*, *CaEXPB28/CaEXPB29* e *CaEXLB35/CaEXLB39*, obtiveram valores iguais a 0, podendo sugerir que o evento de duplicação manteve seus genes inalterados (Tabela 4).

É importante ressaltar que os *motifs* (sequência conservada) são pequenas sequências de DNA, RNA ou proteína que codificados sintetizam estruturas biológicas funcionais (Grant; Bailey, 2021). O estudo presente aborda quatro tipos de expansinas e os genes (*EG45*), que compartilham de características semelhantes, com base na figura 9. Observa-se que os *motifs* apresentam variações entre as classificações de expansinas (Figura 9).

A  $\alpha$ -expansina apresentam 79,17% de semelhanças entre si, os outros 20,83% se diferem apenas por inserções ou deleções de *motifs*. Contudo, observa-se que os *motifs* um, dois e três estão presentes em todas as proteínas da  $\alpha$ -expansina (Figura 9).

As  $\beta$ -expansina é o grupo que apresenta maior diversidade entre os *motifs*, o grupo contém seis genes, 50% desses genes apresentam os *motifs* totalmente idênticos e outros 50% apresentam variações entre os *motifs* 2, 7, 8 e 9.

A expansina like-A não apresentou variações entre os *motifs*, correspondendo a 100% idênticas entre si (Figura 9). As expansina like-B são a segunda maior subfamília de expansina no cafeeiro, compartilhando os mesmos *motifs* da  $\beta$ -expansina, assim corroborando com a hipótese de que as expansina like-A e expansina like-B, são similares às  $\alpha$ -expansina e  $\beta$ -expansina (Li et al., 2021). Contudo, as expansinas like-B representam 84,61% de equivalência. O grupo das endoglucanases-like 45 (EG45) difere das demais expansinas pela inserção do *motifs* 10, representando 90,90% de identidade entre as EG45 (Figura 9).

Entretanto, os resultados obtidos na plataforma *Pfam* (*protein domain database*), mostraram que os *motifs* seis, nove e dez não fazem parte das sequências características de expansinas. Todavia, é destacado que esses *motifs* compõem grande parte das estruturas das expansinas. Nos estudos de *Triticum* (Li et al., 2023), *Cucumis sativus* (Liu et al., 2022), *G. hirsutum* L. (Lv et al., 2020), foi observado que os *motifs* apresentam quase o mesmo padrão do presente estudo, consistindo na alternância de inserção e deleção de *motifs*, que varia de uma expansina para outra.

Os genes *EXPs* foram altamente sinéticos com o genoma do *A. thaliana*, quando comparados com a sintonia do *C. arabica* L. com *O. sativa* (Figura 10). Essa alta similaridade dos genes de *C. arabica* L. com *A. thaliana* pode ser em decorrência da duplicação dos genes de expansinas (Tabela 4). Paralelamente, o mesmo evento ocorre no genoma do *A. thaliana*, que tem cerca de 29% de genes duplicados (Moore; Purugganan, 2003). Outro fator que pode contribuir é que ambas as plantas pertencem à mesma classe (monocotilédnea), sendo um indicativo que evolutivamente são mais próximas entre si.

O fruto do cafeeiro apresenta três fases distintas de desenvolvimento: perisperma, endosperma e pericarpo (ver Figura 3). Fases essas marcantes durante o seu processo de amadurecimento. Esse processo é ocasionado por eventos bioquímicos, fisiológicos e estímulos externos, que alteram o tamanho, cor, sabor, textura e aroma. Tais processos são desencadeados pela atuação das *EXPs*, quebrando a ponte de hidrogênio existente entre a pectina e as microfibrilas de celulose, causando conseqüentemente o relaxamento da parede celular (Yang et al.,

2020). A figura 11 demonstrou que os genes nas fases de perisperma e pericarpo apresentaram maior expressão no genoma do *C. canephora*.

Todavia, para ocorrer o aumento de expressão dos genes do *C. arabica* L. há uma dependência da atuação dos seus *cis-elementos*, constituídos por seguimentos de DNA encontrados na região 1500 pb *upstream* na região promotora, atuando na regulação dos genes. Na figura 12 há uma representação dos 14 elementos regulatórios de expansinas. O mais responsivo são os elementos ligados à resposta à luz, seguido, respectivamente, por elementos de respostas a metiljasmonato (MeJA), ácido abscísico (ABA) e elementos regulatórios ligados a estresses abióticos e bióticos (Figura 12).

Os estudos de (Peng *et al.*, 2020; Lv *et al.*, 2020) demonstraram que as expansinas em outras culturas também apresentaram uma maior ativação dos seus genes promotores relacionados ao estímulo de luz, MeJA e ABA. A relação do *cis*-elementos na região promotora das expansinas, estão positivamente relacionados com o processo de crescimento e desenvolvimento da planta, quando exposta a estresses abióticos, aplicações exógenas de fitohormônios e intensidade de luz (Feng *et al.*, 2019; Montechiarini *et al.*, 2021; Jeyasri *et al.*, 2023; Cardoso-Magaña *et al.*, 2024). Não obstante, mais estudos são necessários para compreender o *cis*-elemento MeJA na expressão do *C. arabica* L., quanto aos processos de estresses abióticos e bióticos.

A figura 13 ilustrou 45 proteínas de expansinas, das quais, CaEXPA20, CaEXPB27, CaEXLB33 e CaEXLB36, foram confrontadas pelo teste de *Pfam*, na qual, evidenciou que essas proteínas são constituídas apenas pelo domínio DPBB, assim ostentando homologia com as proteínas Endoglucanase da família 45 (EG45) que são proteínas que apresentam um único domínio (DPBB), contudo, apesar de serem semelhantes, as expansinas e as EG45 não realizam as mesmas atividades enzimáticas (Santiago *et al.*, 2018). As expansinas não apresentam atividade catalítica da enzima b1, 4-glucanase presente nas EGs45, enquanto as EGs45 não mostram correlação qualquer com o relaxamento da parede celular (Garcidueñas-Piña *et al.*, 2022). Na parede celular também podem ser identificados os polens alérgenos, que são um grupo de expansinas encontradas apenas gramíneas do tipo 2, que apresentam

estruturas isoladas e semelhantes à CBM63, formada também por  $\beta$ -sanduiche C-terminal (Yaqoob *et al.*, 2020).

Ficou evidente que os genes analisados nesse estudo apresentam expressões significativas nas diferentes fases de desenvolvimento do fruto do *C. arabica* L. (Figura 15). O gene *CaEXPA4* foi o que obteve a melhor expressão nos quatro períodos de desenvolvimento do fruto. O estudo realizado por Budzinski *et al.* (2011) analisou três genes de *CaEXPs* (*CaEXPA1*, *CaEXPA2* e *CaEXPA3*) em *C. arabica* L. da variedade IAPAR-59. Nota-se que as *CaEXPA1* e *CaEXPA3* foram altamente expressas em todas as fases do fruto, enquanto a *CaEXPA2* expressou apenas no estágio de pericarpo do fruto. O autor sugere que essa expressão tardia da *CaEXPA2* seja desencadeada pelo aumento do etileno nas fases finas de desenvolvimento do fruto. Todavia, o mesmo padrão de expressão da *CaEXPA2* realizado pelo estudo acima foi observado na *CaEXLB11*, onde seu aumento de expressão ocorreu a partir do período de 180 DAF.

Provavelmente, o aumento nos níveis de expressão dos genes das *EXPs* nos períodos de 30 DAF, 90 DAF e 120 DAF, é ocasionado pelo aumento das demandas de recursos bioquímicos e enzimáticos, na qual, ocorrem mudanças de caráter de coloração e físico da fase de perisperma para o endosperma.

Na fase inicial do pericarpo, que inicia em 180 DAF, os níveis de expressão das expansinas são menores, sugerindo assim que a demanda de *expansinas* no final do desenvolvimento do fruto é diminuída e mantida apenas em algumas *EXPs*. No início do desenvolvimento do fruto pode ocorrer um maior recrutamento na expressão dos genes de *expansinas*. Esse aumento é devido à ação dos fitohormônios, uma vez que expansinas em diferentes culturas são reguladas por hormônios específicos: ABA regulador de expressão de *expansinas* em *Rubus chingii* (framboesa) (Chen *et al.*, 2024); etileno em *Fragaria x ananassa Duch.* (morangos) (Figueroa; Gatica-Meléndez; Figueroa, 2021); e brassinosteróides (BR) em *O. sativa* (arroz) (Zhang *et al.*, 2024). O cafeeiro por ser descrito como climatérico, é preciso de análises adjacentes para verificar a regulação das *expansinas* do *C. arabica* L. sob atuação do etileno.

## 10 CONCLUSÃO

Foram identificados e caracterizados 45 genes de *CaEXPs* (24 *EXPA*, seis *EXPB*, dois *EXLA* e 13 *EXLB*) e 11 endoglucanase da família 45 em *C. arabica* L.. As análises *in silico* dos genes de *expansinas* no genoma do *C. arabica* L. utilizando as ferramentas da bioinformática e moleculares, são relevantes para o desenvolvimento de novas cultivares e compreensão de suas vias de atuação. Os resultados da qRT-PCR em *C. arabica* L. (variedade IAPAR-59) demonstraram que os seis genes utilizados foram amplamente expressos nos quatro períodos de coleta do fruto do cafeeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; MALEKPOUR, M.; SOBHANVERDI, S. The Arabidopsis expansin gene (AtEXPA18) is capable to ameliorate drought stress tolerance in transgenic tobacco plants. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 5913-5922, 2021. DOI: 10.1007/s11033-021-06589-2.
- ADUGNA, B. G. Factors affecting coffee (*Coffea arabica* L.) quality in Ethiopia: a review. **American Journal of Agriculture and Forestry**, v. 9, n. 5, p. 288-296, 2021. DOI: 10.11648/j.ajaf.20210905.12.
- AGNOLETTI, B. Z.; PINHEIRO, P. F.; PEREIRA, P. L.; OLIVEIRA, E. C. S.; FILGUEIRAS, P. R. Discriminação de café arábica quanto à qualidade sensorial utilizando cromatografia gasosa e PLS-DA. **Revista Ihes Ciência**, v. 6, n. 3, p. 147-158, 2020. DOI: 10.36524/ric.v6i3.848.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997. Doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- AZIZ, T.; FARID, A.; HAQ, F.; KIRAN, M.; ULLAH, A.; ZHANG, K.; LI, C.; GHAZANFAR, S.; SUN, H.; ULLAH, R.; ALI, A.; MUZAMMAL, M.; SHAH, M.; AKHTAR, N.; SELIM, S.; HAGAGY, N.; SAMY, M.; AL JAOUNI, S. K. A Review on the Modification of Cellulose and Its Applications. **Polymers**, v. 14, n. 15, p. 3206, 2022. DOI: 10.3390/polym14153206.
- BRAGANÇA, S. M.; CARVALHO, C. H. S.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 765–770, 2001. DOI: 10.1590/S0100-204X2001000500006.
- BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C.; PEREIRA, B. M.; OLIVEIRA, T. N.; FERREIRA, D. S.; MOTA, A. P. Z.; SARAIVA, M. A. P.; ARAUJO, A. C. G.; SILVA, L. P.; GUIMARAES, P. M. Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. **The Plant Journal**, v. 107, n. 6, p. 1681–1696, 2021. DOI: 10.1111/tpj.15409.
- BUDZINSKI, Ilara G. F.; PEREIRA, Luiz Filipe Protasio; VIEIRA, Luiz Gonzaga E. Caracterização in silico de genes de expansina presentes em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2007.

BUDZINSKI, I. G. F. **Caracterização da expressão de três genes de  $\alpha$ -expansinas de *Coffea arabica* e *Coffea racemosa* durante o desenvolvimento do fruto.** 95 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade estadual de Londrina, Londrina, PR, 2008.

BUDZINSKI, I. G. F.; SANTOS, T. B.; SERA, T.; POT, D.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P. Expression patterns of three  $\alpha$ -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. **Plant Biology (Stuttgart)**, v. 13, n. 3, p. 462–471, 2011. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00400.x.

BARSALOBRES, C. C. F. SEVERINO, F. E.; MALUF, M. P.; MAIA, I. G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC molecular biology**, v. 10, p. 1-11, 2009. DOI: 10.1186/1471-2199-10-1.

CADERAS, D.; MUSTER, M.; VOGLER, H.; MANDEL, T.; ROSE, J. K. C.; MCQUEEN-MASON, S.; KUHLEMEIER, C. Limited correlation between expansin gene expression and elongation growth rate. **Plant Physiology**, v. 123, n. 4, p. 1399–1414, 2000. DOI: 10.1104/pp.123.4.1399.

CARDOSO-MAGAÑA, A. J.; MONTERO-CORTÉS, M. I.; QUI-ZAPATA, J. A.; CHÁVEZ-RODRÍGUEZ, A. M.; MANCILLA-MARGALLI, N. A.; LÓPEZ-VELÁZQUEZ, J. C.; FARIAS-CERVANTES, V. S.; ANDRADE-GONZÁLEZ, I.; RIVERA-RODRÍGUEZ, D. M.; BEJARANO-REBOLLEDO, F. Effect of light quality on the seed germination and development of coffee seedlings (*Coffea arabica*). **Plants**, v. 13, n. 13, art. 1772, 2024. DOI: 10.3390/plants13131772.

CENCI, A.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. Genome evolution in diploid and tetraploid *Coffea* species as revealed by comparative analysis of orthologous genome segments. **Plant molecular biology**, v. 78, n. 1, p. 135-145, 2012. DOI: 10.1007/s11103-011-9852-3.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.11, p.113-116, 1993. DOI: 10.1007/BF02670468.

CHAO, J.; LI, Z.; SUN, Y.; ALUKO, O. O.; WU, X.; WANG, Q.; LIU, G. MG2C: a user-friendly online tool for drawing genetic maps. **Molecular horticulture**, v. 1, p. 1-4, 2021. DOI: 10.1186/s43897-021-00020-x.

CHEN, S.; REN, H.; LUO, Y.; FENG, C.; LI, H. Genome-wide identification of wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin genes and functional characterization of TaEXPB1A. **Environmental and Experimental Botany**, v. 182, 104307, 2021. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.104307.

CHEN, Z.; SHEN, D.; SHI, Y.; CHEN, Y.; HE, H.; JIANG, J.; WANG, F.; JIANG, J.; WANG, X.; LI, X.; ZENG, W. Genome-wide identification of expansins in *Rubus chingii* and profiling analysis during fruit ripening and softening. **Plants**, v. 13, n. 3, p. 431, 2024. DOI: 10.3390/plants13030431.

CHEN, Y.; XIE, B.; AN, X.; MA, R.; ZHAO, D.; CHENG, C.; LI, E.; ZHOU, J.; KANG, G.; ZHANG, Y. Overexpression of the apple expansin-like gene MdEXLB1 accelerates the softening of fruit texture in tomato. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 21, n. 12, p. 3578–3588, 2022. DOI: 10.1016/j.jia.2022.08.030.

CHOU, K.; SHEN, H. A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLOC 2.0. **PloS one**, v. 5, n. 4, e9931, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0009931.

COMBES, M. C.; JOËT, T.; STAVRINIDES, A. K.; LASHERMES, P. New cup out of old coffee: contribution of parental gene expression legacy to phenotypic novelty in coffee beans of the allopolyploid *Coffea arabica* L. **Annals of Botany**, v. 131, n. 1, p. 157–170, 2022. DOI: 10.1093/aob/mcac041.

COSGROVE, D. J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 162-172, 2015. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.05.014

COSGROVE, D. J. Building an extensible cell wall. **Plant Physiology**, v. 189, n. 3, p. 1246–1277, 2022. DOI: 10.1093/plphys/kiac184.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 321-326, 2000.

COSGROVE, D. J. Plant cell wall loosening by expansins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 40, 2024a. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-111822-115334.

COSGROVE, D. J. Structure and growth of plant cell walls. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 25, p. 340–358, 2024b. DOI: 10.1038/s41580-023-00691-y.

**COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 16 nov. 2024.

DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 18, p. 55-81, 2006. DOI: 10.1590/S1677-04202006000100006.

DAVIS, A. P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M. F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the**

**Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357–377, dez. 2011. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x.

SILVA, L. F. et al. Genome-wide association study of plant architecture and diseases resistance in *Coffea canephora*. **Euphytica**, v. 218, n. 7, p. 92, 2022.

DENOEUDE, F.; CARRETERO-PAULET, L.; DEREPPER, A. *et al.* The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n. 6201, p. 1181–1184, 2014. DOI: 10.1126/science.1255274.

DEREPPER, A.; BOCS, S.; ROUARD, M.; GUIGNON, V.; RAVEL, S.; TRANCHANT-DUBREUIL, C.; PONCET, V.; GARSMEUR, O.; LASHERMES, P.; DROC, G. The coffee genome hub: a resource for coffee genomes. **Nucleic Acids Research**. v. 43, p.1028-1035, 2015. DOI: 10.1093/nar/gku1108.

MELO, A. M. M.; BONINI, L. M. M.; MUCOUCAH, M. F. S. CARACTERÍSTICAS DA VARIAÇÃO BIENAL NA PRODUÇÃO DE CAFÉ ARÁBICA NO BRASIL: não há. **South American Development Society Journal**, v. 8, n. 24, p. 93-93, 2022.

DING, A.; MAROWA, P.; KONG, Y. Genome-wide identification of the expansin gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 5, p. 1891-1907, 2016. DOI: 10.1007/s00438-016-1226-8.

DOMINGUES, D. S.; RAMALHO, J. C.; PARTELLI, F. L. Coffee—From Plant to Cup. **Agronomy**, v. 13, n. 9, p. 2346, 2023. DOI: 10.3390/agronomy13092346.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. *In*: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, J. (ed.). **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 88–113.

FENG, X.; Xu, Y.; Peng, L.; Yu, X.; Zhao, Q.; Feng, S.; Zhao, Z.; Li, F.; Hu, B. TaEXPB7-B, a  $\beta$ -expansin gene involved in low-temperature stress and abscisic acid responses, promotes growth and cold resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 240, p. 153004, 2019. DOI: 10.1016/j.jplph.2019.153004.

FENN, M. A.; GIOVANNONI, J. J. Phytohormones in fruit development and maturation. **The Plant Journal**, v. 105, n. 2, p. 446-458, 2021. DOI: 10.1111/tpj.15112.

FIGUEROA, N. E.; GATICA-MELÉNDEZ, C.; FIGUEROA, C. R. Ethylene application at the immature stage of *Fragaria chiloensis* fruit represses the anthocyanin biosynthesis with a concomitant accumulation of lignin. **Food Chemistry**, v. 358, p. 129913, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129913.

FREITAS, V. V.; BORGES, L. L. R.; VIDIGAL, M. C. T. R.; SANTOS, M. H.; STRINGHETA, P. C. Coffee: a comprehensive overview of origin, market, and the

quality process. **Trends in Food Science & Technology**, v. 146, p. 104411, 2024. DOI: 10.1016/j.tifs.2024.104411.

GARCIDUEÑAS-PIÑA, C.; HERRERA-MARTÍNEZ, V.; MEJÍA-MENDOZA, M. A.; DÍAZ-GARCÍA, D. A.; SORIA-GUERRA, R. E.; MORALES-DOMÍNGUEZ, J. F. Identification and expression studies of a PNP from *Opuntia ficus-indica*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 31, p. 320–329, 2022. Disponível em: DOI: 10.1007/s13562-021-00679-9.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D1178–D1186, 2012. DOI: 10.1093/nar/gkr944.

GONÇALVES, A. L. **Prospecção e caracterização da família gênica Expansina, envolvida na modificação estrutural da celulose cristalina em cana-de-açúcar**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP. 2016.

GRANT, C. E.; BAILEY, T. L. XSTREME: Comprehensive motif analysis of biological sequence datasets. **BioRxiv**, 2021. DOI: 10.1101/2021.09.02.458722.

GUIMARAES, L. A.; MOTA, A. P. Z.; ARAUJO, A. C. G.; FIGUEIREDO, L. F. de A.; PEREIRA, B. M.; SARAIVA, M. A. de P.; SILVA, R. B.; DANCHIN, E. G. J.; GUIMARAES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. **Plant Molecular Biology**, v. 94, n. 1–2, p. 79–96, 2017. DOI: 10.1007/s11103-017-0594-8.

HAILE, M.; KANG, W. H. The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality. **Journal of Food Quality**, v. 2019, p. 1-13, 2019. DOI: 10.1155/2019/4836709.

HAN, Z.; LIU, Y.; DENG, X.; LIU, D.; LIU, Y.; HU, Y.; YAN, Y. Genome-wide identification and expression analysis of expansin gene family in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 101, 2019. DOI: 10.1186/s12864-019-5455-1.

HU, B.; JIN, J.; GUO, A.Y.; ZHANG, H.; LUO, J.; GAO, G. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics**, v. 31, n. 8, p. 1296–1297, 2015. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu817.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Título do relatório. 2018. Disponível em: <https://ico.org/>, Acesso em: 02 fev. 2025.

JEYASRI, R.; MUTHURAMALINGAM, P.; KARTHICK, K.; SHIN, H.; CHOI, S. H.; RAMESH, M. Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 153, n. 3, p. 447-458, 2023. DOI: 10.1007/s11240-023-02485-8.

JIA, K.; WANG, W.; ZHANG, Q.; JIA, W. Cell wall integrity signaling in fruit ripening. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 4054, 2023. DOI: 10.3390/ijms24044054.

KALSCHNE, D. L.; BIASUZ, T.; CONTI, A. J.; VIEGAS, M. C.; CORSO, M. P.; BENASSI, M. T. Sensory characterization and acceptance of coffee brews of *C. arabica* and *C. canephora* blended with steamed defective coffee. **Food Research International**, v. 124, p. 234-238, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.03.038.

KÖK, B. Ö. ALTUNOGLU, Y. C.; ÖNCÜL, A. B.; KARACI, A.; BALOGLU, M. C. Expansin gene family database: A comprehensive bioinformatics resource for plant expansin multigene family. **Journal of Bioinformatics & Computational Biology**, v. 21, n. 3, 2023. DOI: 10.1142/S0219720023500154.

KRISHNAMURTHY, P. MUTHUSAMY, M.; KIM, J. A.; MI-JEONG JEONG, M. J.; LEE, S. I. Brassica rapa expansin-like B1 gene (BrEXLB1) regulate growth and development in transgenic Arabidopsis and elicits response to abiotic stresses. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 28, p. 437-446, 2019. DOI: 10.1007/s13562-019-00496-1..

LASHERMES, P. COMBES, M C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'Hont, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, n. 2, p. 259-266, 1999. DOI: 10.1007/s004380050965.

LEE, Y.; CHOI, D.; KENDE, H. Expansins: ever-expanding numbers and functions. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 6, p. 527-532, 2001.

LI, M.; LIU, T.; CAO, R.; CAO, Q.; TONG, W.; SONG, W. Evolution and expression of the expansin genes in emmer wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14120, 2023. DOI: 10.3390/ijms241814120.

LI, K.; MA, B.; SHEN, J.; ZHAO, S. XIAO MA, X.; WANG, Z. FAN, Y.; TANG, Q.; WEI, D. The evolution of the expansin gene family in Brassica species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 167, p. 630-638, 2021. DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.08.033

LIU, X.; DONG, S.; MIAO, H.; BO, K.; LI, C.; YANG, Y.; GU, X. Shengping Zhang Genome-wide analysis of expansins and their role in fruit spine development in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Horticultural Plant Journal**, v. 8, n. 6, p. 757-768, 2022. DOI: 10.1016/j.hpj.2021.11.004.

LIU, W.; XU, L.; LIN, H.; CAO, J. Two expansin genes, AtEXPA4 and AtEXPB5, are redundantly required for pollen tube growth and AtEXPA4 is involved in primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 249, 2021. DOI: 10.3390/genes12020249.

LV, L. M.; ZUO, D. Y.; WANG, X. F.; CHENG, H. L.; ZHANG, Y. P.; WANG, Q. L.; SONG, G. L.; MA, Z. Y. Genome-wide identification of the expansin gene family reveals that expansin genes are involved in fibre cell growth in cotton. **BMC Plant Biology**, v. 20, p. 223, 2020. DOI: 10.1186/s12870-020-02362-y.

LYU, J. Coffee history under the genomic lens. **Nature Plants**, p. 1-1, 2024. DOI: 10.1038/s41477-024-01714-y.

MAROWA, P.; DING, A.; KONG, Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. **Plant Cell Reports**, v. 35, p. 949-965, 2016. DOI: 10.1007/s00299-016-1948-4.

MCQUEEN M., S.; COSGROVE, D. J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 14, p. 6574-6578, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.14.6574.

MISHRA, M. K.; JINGADE, P.; HUDED, A. K. C. Applications of omics technologies in *Coffea*. In: ROUT, G. R.; PETER, K. V. (ed.). **Omics in horticultural crops**. Cambridge, MA: Academic Press, 2022. cap. 18, p. 383–426. DOI: 10.1016/B978-0-323-89905-5.00009-4.

MONTAGNON, C.; SHEIBANI, F.; BERTRAND, B. The history and genetic diversity of cultivated *Coffea arabica*. **Advances in Botanical Research**, v. 114, p. 1-28, 2025. DOI: 10.1016/bs.abr.2024.04.003.

MONTECHIARINI, N. H.; DELGADO, L.; MORANDI, E. N.; CARRILLO, N. J.; GOSPARINI, C. O. The expansin EXP1 gene in the elongation zone is induced during soybean embryonic axis germination and differentially expressed in response to ABA and PEG treatments. **Seed Science Research**, v. 31, n. 1, p. 60–68, 2021. DOI: 10.1017/S0960258520000379.

MOORE, R. C.; PURUGGANAN, M. D. The early stages of duplicate gene evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15682-15687, 2003. DOI: 10.1073/pnas.2535513100.

MOREIRA, P. C.; MOREIRA, G. C.; CASTRO, N. R.; SILVA, R. P. Produtividade e economia de fatores de produção na cafeicultura brasileira. **Revista de Política Agrícola**, v. 28, n. 2, p. 6, 2019. Disponível em: <https://rpa.sede.embrapa.br/RPA/article/view/1368>. Acesso em: 27 jun. 2025.

MU, Q.; LI, X.; LUO, J.; PAN, Q.; LI, Y.; GU, T. Characterization of expansin genes and their transcriptional regulation by histone modifications in strawberry. **Planta**, v. 254, n. 2, p. 21, 2021. DOI: 10.1007/s00425-021-03665-6.

NARAYAN, J. A.; CHAKRAVARTHI, M.; NERKAR, G.; MANOJ, V. M.; DHARSHINI, S.; SUBRAMONIAN, N.; PREMACHANDRAN, M. N.; ARUN KUMAR, R.; KRISHNA SURENDAR, K.; HEMAPRABHA, G.; RAM, B.; APPUNU, C. Overexpression of expansin EaEXPA1, a cell wall loosening protein enhances drought tolerance in sugarcane. **Industrial Crops and Products**, v. 159, 2021, p. 113035. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113035.

PECK, L. D.; BOA, E. Coffee wilt disease: The forgotten threat to coffee. **Plant Pathology**, v. 73, n. 3, p. 506-521, 2024. DOI: 10.1111/ppa.13833.

PENG, Y.; XU, X.; FENG, J.; ZHANG, J.; DONG, S.; YAO, Z.; FENG, Q.; ZHAO, S.; FENG, F.; LI, B.; HU, B. Identification and characterization of the expansin genes in *Triticum urartu* in response to various phytohormones. **Russian Journal of Genetics**, v. 56, p. 441–453, 2020. DOI: 10.1134/S1022795420040109.

PERINI, M. A.; SIN, I. N.; VILLARREAL, N. M.; MARINA, M.; POWELL, A. L. T.; MARTÍNEZ, G. A.; CIVELLO, P. M. Overexpression of the carbohydrate binding module from *Solanum lycopersicum* expansin 1 (Sl-EXP1) modifies tomato fruit firmness and *Botrytis cinerea* susceptibility. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 113, p. 122–132, 2017. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.01.029.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; LEKANNE DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003. DOI: 10.1016/s0304-3940(02)01423-4.

SALOJÄRVI, J.; RAMBANI, A.; YU, Z. *et al.* The genome and population genomics of allopolyploid *Coffea arabica* reveal the diversification history of modern coffee cultivars. **Nature Genetics**, v. 56, p. 721–731, 2024. DOI: 10.1038/s41588-024-01695-w.

SAMALOVÁ, M.; MELNIKAVA, A.; ELSAYAD, K.; PEAUCELLE, A.; GAHUROVÁ, E.; GUMULEC, J.; SPYROGLOU, I.; ZEMLYANSKAYA, E. V.; UBOGOEVA, E. V.; BALKOVÁ, D.; DEMKO, M.; BLAVET, N.; ALEXIOU, P.; BENES, V.; MOUILLE, G.; HEJATKO, J. Hormone-regulated expansins: expression, localization, and cell wall

biomechanics in Arabidopsis root growth. **Plant Physiology**, v. 194, n. 1, p. 209–228, 2024. DOI: 10.1093/plphys/kiad228.

SAMALOVA, M.; GAHUROVA, E.; HEJATKO, J. Expansin-mediated developmental and adaptive responses: A matter of cell wall biomechanics? **Quantitative Plant Biology**, v. 3, p. e11, 2022. Doi: 10.1017/qpb.2022.6.

SAMPEDRO, J.; LEE, Y.; CAREY, R. E.; DEPAMPHILIS, C.; COSGROVE, D. J. Use of genomic history to improve phylogeny and understanding of births and deaths in a gene family. **The Plant Journal**, v. 44, n. 3, p. 409–419, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02540. x.

SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. J. The expansin superfamily. **Genome biology**. v. 6, p. 1-11, 2005. DOI: 10.1186/gb-2005-6-12-242.

SANTIAGO, T. R.; PEREIRA, V. M.; DE SOUZA, W. R.; STEINDORFF, A. S.; CUNHA, B. A. D. B.; GASPAR, M.; FÁVARO, L. C. L.; FORMIGHIERI, E. F.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C. Genome-wide identification, characterization and expression profile analysis of expansins gene family in sugarcane (*Saccharum* spp.). **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, e0191081, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0191081.

SEVERINO, F. E. **Estudo de dois genes de café (*Coffea arabica*) induzidos por estresse biótico e análise de suas regiões promotoras**. 2013. 84 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

SU, G.; LIN, Y.; WANG, C.; LU, J.; LIU, Z.; HE, Z.; SHU, X.; CHEN, W.; WU, R.; LI, B.; ZHU, C.; ROSE, J. K. C.; GRIERSON, D.; GIOVANNONI, J. J.; SHI, Y.; CHEN, K. Expansin SIExp1 and endoglucanase SICel2 synergistically promote fruit softening and cell wall disassembly in tomato. **The Plant Cell**, v. 36, n. 3, p. 709–726, 2024. DOI: 10.1093/plcell/koad291.

ULUISIK, Selman; SEYMOUR, Graham B. Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125559, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125559.

VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J.-J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 2, p. 197-204, 2006. DOI: 10.1002/jsfa.2338.

VELÁSQUEZ, S.; BANCHÓN, C. Influence of pre-and post-harvest factors on the organoleptic and physicochemical quality of coffee: a short review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, n. 10, p. 2526-2538, 2022. DOI: 10.1007/s13197-022-05569-z.

VIDAL, R. O.; MONDEGO, J. M. C.; POT, D.; AMBRÓSIO, A. B.; ANDRADE, A. C.; PEREIRA, L. F. P.; COLOMBO, C. A.; VIEIRA, L. G. E.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1053–1066. 2010. DOI: 10.1104/pp.110.162438.

VIEIRA, P.; NEMCHINOV, L. G. An expansin-like candidate effector protein from *Pratylenchus penetrans* modulates immune responses in *Nicotiana benthamiana*. **Phytopathology**, v. 110, n. 3, p. 684-693, 2020. DOI: 10.1094/PHYTO-09-19-0336-R.

VIEIRA, N. G. **Identificação e caracterização de genes órfãos (“no hits”) de café (*Coffea* spp.)**. 2013. 130 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

WAN, J.; HE, M.; HOU, Q.; ZOU, L.; YANG, Y.; WEI, Y.; CHEN, X. Cell wall associated immunity in plants. **Stress Biology**, v. 1, n. 1, p. 3, 2021. DOI: 10.1007/s44154-021-00003-4.

WANG, Z.; CAO, J.; LIN, N.; LI, J.; WANG, Y.; LIU, W.; YAO, W.; LI, Y. Origin, evolution, and diversification of the expansin family in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 21, p. 11814, 2024. DOI: 10.3390/ijms252111814.

WOLF, S. Cell wall signaling in plant development and defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 73, n. 1, p. 323-353, 2022. DOI: 10.1146/annurev-arplant-102820-095312.

YANG, J.; ZHANG, G.; AN, J.; LI, Q.; CHEN, Y.; ZHAO, X.; WU, J.; WANG, Y.; HAO, Q.; WANG, W.; WANG, W. Expansin gene TaEXPA2 positively regulates drought tolerance in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Science**, v. 298, p. 110596, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110596.

YAQOUB, A.; SHAHID, A. A.; IMRAN, A.; SADAQAT, S.; LIAQAT, A.; RAO, A. Q. Dual functions of Expansin in cell wall extension and compression during cotton fiber development. **Biologia**, v. 75, p. 2093–2101, 2020. DOI: 10.2478/s11756-020-00514-x.

YU, Q.; GUYOT, R.; DE KOCHKO, A.; BYERS, A.; NAVAJAS-PÉREZ, R.; LANGSTON, B. J.; DUBREUIL-TRANCHANT, C.; PATERSON, A. H.; PONCET, V.; NAGAI, C.; MING, R. Micro-collinearity and genome evolution in the vicinity of an ethylene receptor gene of cultivated diploid and allotetraploid coffee species (*Coffea*). **The Plant Journal**, v. 67, n. 2, p. 305–317, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04590.x.

ZHANG, B.; GAO, Y.; ZHANG, L.; ZHOU, Y. The plant cell wall: biosynthesis, construction, and functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 251–272, 2021a. DOI: 10.1111/jipb.13055.

ZHANG, B.; CHANG, L.; SUN, W.; ULLAH, A.; YANG, X. Overexpression of an expansin-like gene, GhEXLB2, enhanced drought tolerance in cotton. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 162, p. 468–475, 2021b. DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.03.018.

ZHANG, J.-F.; XU, Y.-Q.; DONG, J.-M.; PENG, L.-N.; FENG, X.; WANG, X.; LI, F.; MIAO, Y.; YAO, S.-K.; ZHAO, Q.-Q.; FENG, S.-S.; HU, B.-Z.; LI, F.-L. Genome-wide identification of wheat (*Triticum aestivum*) expansins and expansin expression analysis in cold-tolerant and cold-sensitive wheat cultivars. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, e0195138, 29 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0195138. 018.

ZHANG, S.; XU, R.; GAO, Z.; CHEN, C.; JIANG, Z.; SHU, H. A genome-wide analysis of the expansin genes in *Malus × domestica*. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 289, n. 2, p. 225–236, 2014a. DOI: 10.1007/s00438-013-0796-y.

ZHANG, X.; WANG, Y.; LIU, M.; YAN, P.; NIU, F.; MA, F.; HU, J.; HE, S.; CUI, J.; YUAN, X.; YANG, J.; CAO, L.; LUO, X. OsEXPA7 encoding an expansin affects grain size and quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). **Rice**, v. 17, n. 1, p. 36, 2024. DOI: 10.1186/s12284-024-00715-x.

ZHANG, W.; YAN, H.; CHEN, W.; LIU, J.; JIANG, C.; JIANG, H.; ZHU, S.; CHENG, B. Genome-wide identification and characterization of maize expansin genes expressed in endosperm. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 289, n. 6, p. 1061–1074, 2014b. DOI: 10.1007/s00438-014-0867-8.

ZHANG, Z.; HUO, W.; WANG, X.; REN, Z.; ZHAO, J.; LIU, Y.; HE, K.; ZHANG, F.; LI, W.; JIN, S.; YANG, D. Origin, evolution, and diversification of the wall-associated kinase gene family in plants. **Plant Cell Reports**, v. 42, n. 12, p. 1891–1906, 2023. DOI: 10.1007/s00299-023-03068-9.

ZHENG, Q.; WANG, X.; QI, Y.; MA, Y. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR analysis during fruit ripening of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*). **FEBS Open Bio**, v. 11, n. 11, p. 3142–3152, 2021. DOI: 10.1002/2211-5463.13053.