

CARACTERIZAÇÃO DE GENES EXPRESSOS DURANTE O CRESCIMENTO E MATURAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ

Cristiana de GASPARI-PEZZOPANE¹; Mirian Perez MALUF²; José Laércio FAVARIN¹; Oliveira GUERREIRO FILHO⁴

¹Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Piracicaba, SP. ²Embrapa Café, Brasília, DF, ⁴Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP

Resumo:

O objetivo do estudo foi caracterizar funcionalmente genes-chave expressos durante o crescimento e a maturação de frutos de cultivares de *Coffea arabica* L, pois a planta apresenta várias floradas, fato que resulta na maturação desigual de frutos, inclusive na mesma florada. Para o estudo foram utilizadas frutos em desenvolvimento das cultivares: Mundo Novo IAC 388-17, Catuaí Vermelho IAC 144, Icatu Vermelho IAC 4045, Obatã IAC 1669-20 e Icatu Precoce IAC 3282. Os genes escolhidos para análise foram: o fator de transcrição *Leafy Cotyledon* (LEC1) e as enzimas *álcool acyl transferase* e *ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano (ACC) oxidase*, os quais estão relacionados com os processos de desenvolvimento do embrião, composição química da semente e maturação do fruto, respectivamente. A expressão dos genes foi avaliada através da metodologia de RT-PCR, utilizando RNA total extraído dos frutos. Os resultados apresentados evidenciam que o padrão de expressão dos genes *ACC oxidase*, *LEC1* e *álcool acyl transferase* são compatíveis com o esperado em frutos climatéricos e, as variações na expressão dos genes observada entre as cultivares sugerem que a composição química e a maturação dos frutos podem diferir ao longo do desenvolvimento dos frutos.

Palavras-chave: expressão gênica diferencial, maturação, *Coffea arabica*

Characterization of genes expressed during growth and maturation of coffee fruits

Abstract:

The objective of this study was to characterize functionally key genes expressed during growth and maturation of fruits of *Coffea arabica* L cultivars. Once the coffee trees exhibit several continuous flowering bursts, fruits frequently have a non-uniform maturation. Therefore, Fruits at different developmental stages of the cultivars Mundo Novo IAC 388-17, Catuaí Vermelho IAC 144, Icatu Vermelho IAC 4045, Obatã IAC 1669-20 and Icatu Precoce IAC 3282 were collected and evaluated regarding the expression of selected genes. These were: the transcription factor *Leafy Cotyledon* (LEC1), the enzymes alcohol acyl transferase and acid 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) oxidase, related to physiological processes of embryo development, seed chemical composition and fruit maturation, respectively. Results showed that the expression patterns of evaluated genes are compatible with those expected for climateric fruits. Also, differences in the expression pattern observed among cultivars suggest that the chemical composition and the maturation time of coffee fruits may differ during development.

Key words: differential gene expression, maturation, *Coffea arabica*

Introdução

O cafeeiro arábica apresenta várias floradas em razão da variação climática e da variabilidade genética (Rena e Maestri, 1987), fato que resulta na maturação desigual de frutos, inclusive da mesma florada. A diferença de maturação entre e na mesma florada dificulta e onera a colheita, além de poder prejudicar a qualidade da bebida.

Durante o ciclo fenológico do cafeeiro ocorrem concomitantemente as fases vegetativa e reprodutiva, sendo esta última dividida nas seguintes etapas: gema dormente, gema intumescida, abotoado, florada, pós-florada, chumbinho, expansão dos frutos, grão verde, verde cana, cereja, passa e seco (Pezzopane, et al., 2003).

Durante a frutificação do café vários genes são ativados, promovendo alterações fisiológicas e metabólicas. Genes ativados nessa fase de desenvolvimento estão relacionados com a síntese de fenóis, oligossacarídeos, lipídeos, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácidos alifáticos, cafeína, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas e ácidos húmicos (Clarke e Macrae, 1985). Apesar da importância desses genes para a maturação dos frutos, são poucos os estudos disponíveis com relação ao controle da expressão dos mesmos e, seu papel na maturação dos frutos e no desenvolvimento da qualidade final da bebida, não é conhecida.

A compreensão funcional de genes envolvidos no crescimento e na maturação dos frutos de café pode subsidiar estudos de melhoramento de características agrônomicas importantes como: a uniformidade de maturação dos frutos e a duração do ciclo (precoce, médio e tardio).

O objetivo do estudo foi caracterizar funcionalmente genes-chave expressos durante o crescimento e a maturação de frutos de cultivares de *Coffea arabica* L.

Material e Métodos

O estudo foi realizado em um campo de cultivares de café do Centro Experimental do Instituto Agrônomo, Campinas, SP, na safra de 2005/2006. Foram utilizadas cinco cultivares de *C. arabica*: Mundo Novo IAC 388-17, Catuaí Vermelho IAC 144, Icatu Vermelho IAC 4045, Obatã IAC 1669-20 e Icatu Precoce IAC 3282.

A caracterização gênica incluiu as seguintes etapas: (i) busca de ESTs (*expressed sequence tags*) em banco de dados de café, oriundos do projeto genoma do café, relacionados aos processos de crescimento e maturação dos frutos, utilizando-se o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990); (ii) síntese de oligonucleotídeos com base nas seqüências específicas dos locos de ESTs avaliados; (iii) coleta dos frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, de acordo com escala fenológica proposta por Pezzopane, et al., 2003: ovário fecundado, chumbinho, expansão, verde, verde cana, cereja e endosperma; (iv) extração de RNA; (v) síntese de cDNA (DNA complementar) a partir do RNA total, feita pela técnica de transcrição reversa; (vi) amplificação por PCR (RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) e separação dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Resultados e Discussão

Na busca de ESTs em banco de dados de café foram identificados vários genes como os que codificam para: o fator de transcrição *Leafy Cotyledon* (LEC1) e as enzimas *álcool acyl transferase* e *ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano* (ACC) *oxidase*, relacionados a processos de desenvolvimento do embrião, composição química da semente e maturação do fruto, respectivamente. O gene da *Actina* foi utilizado como controle.

Fragmentos correspondentes aos transcritos gênicos foram avaliados visualmente após separação em gel de agarose (Figura 1). A quantificação da expressão foi feita por comparação da intensidade das bandas coradas com brometo de etídeo. A escala obtida a partir dessa avaliação é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Padrão de expressão de genes de crescimento e maturação de frutos de *Coffea arabica* em diferentes cultivares, sendo o sinal (-) ausência de transcritos, (+/-) baixa expressão, (+) expressão normal e (++) alta expressão.

| Cultivares | Genes | | |
|-------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------|
| | <i>Leafy Cotyledon</i> | <i>Álcool Acyl Transferase</i> | <i>ACC oxidase</i> |
| Mundo Novo IAC 388-17 | | | |
| Ovário | +/- | +/- | ++ |
| Chumbinho | +/- | +/- | +/- |
| Expansão | + | +/- | ++ |
| Verde | +/- | ++ | +/- |
| Verde cana | +/- | ++ | ++ |
| Cereja | + | ++ | ++ |
| Endosperma | +/- | ++ | + |
| Catuaí Vermelho IAC 144 | | | |
| Ovário | +/- | +/- | ++ |
| Chumbinho | +/- | +/- | +/- |
| Expansão | + | +/- | ++ |
| Verde | +/- | +/- | +/- |
| Verde cana | + | ++ | ++ |
| Cereja | + | ++ | ++ |
| Endosperma | +/- | ++ | + |
| Icatu Vermelho IAC 4045 | | | |
| Ovário | +/- | +/- | + |
| Chumbinho | + | +/- | + |
| Expansão | +/- | +/- | + |
| Verde | +/- | +/- | +/- |
| Verde cana | +/- | ++ | ++ |
| Cereja | + | ++ | ++ |
| Endosperma | +/- | ++ | + |
| Obatã IAC 1669-20 | | | |
| Ovário | +/- | +/- | + |
| Chumbinho | +/- | +/- | + |
| Expansão | +/- | +/- | +/- |
| Verde | +/- | + | +/- |
| Verde cana | +/- | ++ | + |
| Cereja | +/- | ++ | ++ |
| Endosperma | +/- | ++ | + |
| Icatu Precoce IAC 3282 | | | |
| Ovário | +/- | +/- | +/- |
| Chumbinho | +/- | +/- | +/- |
| Expansão | +/- | +/- | ++ |
| Verde | +/- | +/- | + |
| Verde cana | + | ++ | ++ |
| Cereja | +/- | ++ | ++ |
| Endosperma | +/- | ++ | ++ |

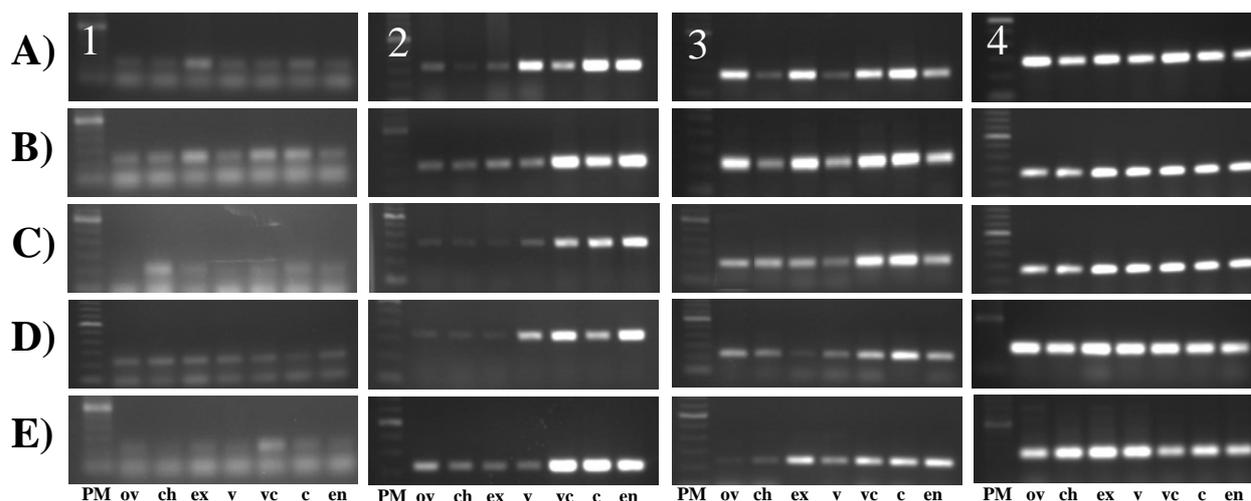


Figura 1. Amplificação por RT-PCR dos genes (1) *Leafy Cotyledon*, (2) *Álcool Acyl Transferase*, (3) *ACC oxidase* e (4) *Actina* - controle, nas cultivares (A) Mundo Novo IAC 388-17, (B) Catuaí Vermelho IAC 144, (C) Icatu Vermelho IAC 4045, (D) Obatã IAC 1669-20 e (E) Icatu Precoce IAC 3282 nas fase ovário (ov.), chumbinho (ch.), expansão (ex.), verde (v.), verde cana (v.c.), cereja (c.) e endosperma (en.), sendo o peso molecular (PM) de 100 pb e os fragmentos apresentaram aproximadamente 300 pb.

A primeira fase do ciclo de desenvolvimento do fruto é caracterizada por um rápido crescimento do ovário. O crescimento inicial ocorre em função do aumento de número de células pela divisão celular. Posteriormente ocorre o alongamento celular, responsável pelo aumento do volume e peso do fruto (Castro, Kluge e Peres, 2005). Após essas fases inicia-se o processo de maturação, que é marcado pelo aumento da produção autocatalítica de etileno e ácido abscísico e da diminuição na produção de giberelinas em frutos climatérico (Castro, Kluge e Peres, 2005), como o café.

O gene *LEC1* é requerido para a especificação da identidade cotiledonar e a completa maturação do embrião. O *LEC1* é acumulado somente durante o desenvolvimento da semente em células do embrião e em tecidos do endosperma (Lotan et al., 1998). Para estes autores, o gene *LEC1* é um importante regulador do desenvolvimento do embrião que ativa a transcrição de genes necessários para a morfogênese do embrião e a diferenciação celular (Figura 1.1 e Tabela 1).

A enzima álcool acyl transferase está relacionada ao desenvolvimento do aroma dos frutos (Beekwilder et al., 2004), por isso espera-se a maior expressão no final da maturação, quando os frutos se encontram na fase de maturação e prontos para a germinação (Figura 1.2 e Tabela 1).

A enzima *ACC oxidase* é a enzima da via biossintética do etileno e que dará origem ao mesmo. A atividade dessa enzima pode aumentar durante eventos do desenvolvimento vegetal, como na fase de maturação de alguns frutos, principalmente nos frutos climatéricos (Castro, Kluge e Peres, 2005).

Como o fruto de café é climatérico, espera-se que ocorra aumento de expressão do gene da *ACC oxidase* nas fases de maturação (verde cana e cereja), fato constatado na Figura 1.3 e Tabela 1.

De acordo com a figura 1, as cultivares apresentam diferenças na expressão dos genes avaliados.

Para o *LEC1*, observa-se um aumento de expressão na fase de expansão e cereja para a cultivar Mundo Novo, na fase de expansão e verde cana mantendo-se em cereja na cultivar Catuaí. Na cultivar Icatu Vermelho ocorre uma maior expressão na fase de chumbinho e cereja. Na cultivar Icatu Precoce esse aumento apenas ocorre na fase de verde cana, início da maturação, enquanto na cultivar Obatã apresenta uma expressão uniforme (Tabela 1 e Figura 1.1).

O gene da enzima *álcool acyl transferase* aumenta sua expressão apenas nas fases de maturação (verde cana, cereja e endosperma). No entanto, as cultivares Mundo Novo e Obatã o nível de transcritos é maior já na fase de verde, a qual representa o tamanho máximo do fruto (Tabela 1 e Figura 1.2).

Como o etileno está presente em toda a planta e em todas as fases de desenvolvimento, principalmente do fruto, observa-se a expressão do gene da enzima *ACC oxidase* em todas as fases de desenvolvimento dos frutos em todas as cultivares. O que ocorre são aumentos no nível de transcritos em diferentes fases das cultivares.

Para as cultivares Mundo Novo e Catuaí, o aumento de expressão ocorre no ovário, expansão e verde cana mantendo-se até o final do desenvolvimento. Na cultivar Icatu Vermelho o nível de transcritos é uniforme, apresentando apenas uma queda na fase verde. A cultivar Obatã tem diminuição de expressão apenas nas fases expansão e verde e, na cultivar Icatu Precoce ocorre aumento no nível de transcritos para o gene apenas na fase de expansão mas, este é mantido alto até o final do desenvolvimento.

Conclusões

Conclui-se que o padrão de expressão dos genes *ACC oxidase*, *LEC1* e *álcool acyl transferase* são compatíveis com o esperado em frutos climatéricos e, as variações na expressão dos genes observada entre as cultivares sugerem que a composição química e a maturação dos frutos podem diferir ao longo do desenvolvimento dos frutos.

Referências Bibliográficas

BEEKWILDER, J.; ALVAREZ-HUERTA, M.; NEEF, E.; VERSTAPPEN, F. W.; BOUWMEESTER, H. J.; AHARONI, A. Functional Characterization of Enzymes Forming Volatile Esters from Strawberry and Banana. *Plant Physiol.* 135 (4), p. 1865-1878. 2004.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. *Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática*. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2005. 650 p.

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee* Vol. 1: Chemistry. Elsevier Applied Science, Londres, 1985, 306 p.

LOTAN, T.; OHTO, M.; YEE, K.M.; WEST, M.A.L.; LO, R.; KWONG, R.W.; YAMAGISHI, K.; FISCHER, R.L.; GOLDBERG, R.B.; HARADA, J.J. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, vol.3, p.1195-105. 1998.

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

RENA, A.B.; MAESTRI, M. Ecofisiologia do Cafeeiro. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. *Ecofisiologia da Produção Agrícola*. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, Piracicaba, 1987, 249 p.