

## EXPRESSÃO DOS GENES GA E ABI3 EM SEMENTES DE CAFÉ EM DESENVOLVIMENTO

Flávia Carvalho Santos – pós-doutoranda UFLA; Sttela Dellyzette Veiga Franco da Rosa - pesquisadora Embrapa Café/UFLA; Édila Vilela de Resende Von Pinho - Prof. UFLA. Apoio da EMBRAPA, CAPES, CNPq e Fapemig

Durante o processo de crescimento, maturação e amadurecimento dos frutos de cafeeiro, vários genes são ativados como aqueles relacionados com a síntese de fenóis, oligossacarídeos, lipídeos, trigonelina, ácidos clorogênicos, ácidos alifáticos, cafeína, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas e ácidos húmicos, além daqueles que possuem funções hormonais. Assim, foi proposto nessa pesquisa quantificar a expressão do gene ácido geiberélico (GA) e ácido abscísico (ABI3) durante o desenvolvimento de sementes de cafeeiro.

Frutos de café, cultivar Rubi, foram colhidos no campo experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA), nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana, cereja, passa e seco. Os frutos foram colhidos dos ramos médios das plantas e nas partes medianas dos ramos. Após a colheita, os frutos em cada estágio foram selecionados para uniformização do estágio de maturação, considerando escala fenológica proposta por Pezzopane et al. (2003), e os frutos de cada estágio foram submetidos à determinação do teor de água pelo método da estufa, a 105°C por 24 horas.

As sementes foram isoladas dos frutos manualmente com o uso de estiletes e os materiais vegetais extraídos foram: embriões, endospermas e sementes intactas. Após a extração dos materiais vegetais, estes foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *deep freezer* a -80°C.

Para a extração de RNA foi utilizado o reagente *Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen)* de acordo com o manual do reagente. A quantidade e qualidade do RNA total foram avaliadas utilizando espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare Life Sciences). O RNA íntegro foi tratado com *DNaseI RNase Free (Ambion)*. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *HighCapacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. O cDNA foi utilizado como *template* para a análise da expressão gênica quantitativa através ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*) pelo sistema de detecção SYBR Green.

Após determinação da diluição 1:5 e eficiência dos *primers* entre 94% a 97%, foi realizado o ensaio da expressão relativa, através do método  $C_T$  comparativo. Todas as análises foram realizadas com três repetições, incluindo controles negativos e endógenos. Os dados foram analisados no *software* v. 2.0.1, do sistema 7500 de PCR em tempo real (*Applied Biosystems*), no Laboratório Central de Análise de Sementes/Fitotecnia/UFLA.

Para cálculo da expressão, primeiramente cada amostra foi normalizada com os controles endógenos 14-3-3 e ubiquitina, utilizando a equação  $\Delta C_T = C_T(\text{gene alvo}) - C_T(14-3-3 + \text{ubiquitina})/2$  e a quantificação relativa foi obtida pela fórmula  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ . A linha de corte (*Threshold*) foi definida automaticamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x3, sendo cinco estádios de maturação dos frutos (verde, verde-cana, cereja, passa e seco) e três partes da semente (embrião endosperma e semente inteira). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Scott Knot a 5% de probabilidade.

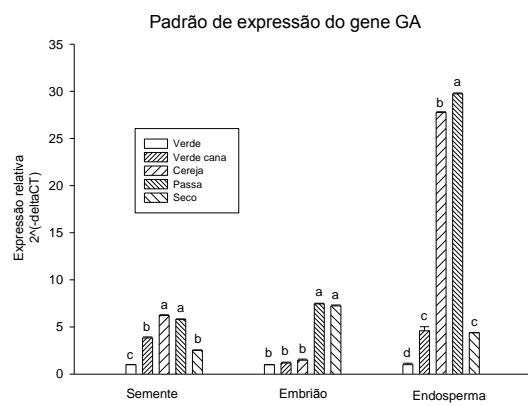
### Resultados e conclusões

De acordo com a Figura 1, pode ser observado que há maior expressão do transcrito GA nos estádios cereja e “passa”, na semente inteira, nos estádios cereja e “seco”, no embrião e no estágio “passa”, no endosperma. De maneira geral, verificou-se que nos estádios finais de desenvolvimento da semente, houve maior expressão em todas as partes da semente (semente inteira, embrião e endosperma). O GA é um hormônio vegetal importante em inúmeros processos fisiológicos tais como a germinação de sementes, alongamento do caule, desenvolvimento de expansão foliar, floral e de sementes. Junto com o ABA, o GA está envolvido na dormência de sementes e é fundamental na germinação de sementes de muitas espécies.

Maior expressão do transcrito ABI3 (Figura 2) pode ser verificada no estágio final do desenvolvimento, com destaque para o estágio “passa”, tanto no embrião quanto no endosperma. Estudos moleculares de maturação de sementes em espécies modelos revelaram que a maturação é impulsionada principalmente por três genes chaves: ABAINSENSITIVE3 (ABI3), FUSCA3 (FUS3), LEAFYCOLTILEDON1 (LEC1). Sabe-se que o PsABI3 é expresso em estádios tardios, juntamente com a síntese de proteínas de armazenamento e maturação tardia. Os genes ABI3, FUS3, LEC1 e LEC2 possuem regulação na maturação sementes.

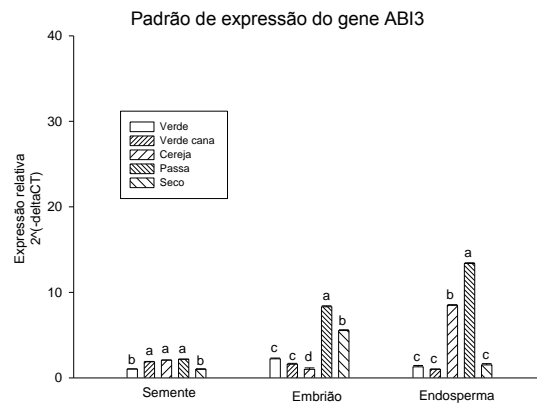
De acordo com dados da literatura, o ABA possui papel importante em inúmeros processos fisiológicos como maturação de sementes, crescimento e regulação do desenvolvimento, dormência de sementes além de ser responsável pela adaptação do ambiente numa condição de stress. Níveis de ABA são baixos durante a embriogênese, aumenta consideravelmente durante a maturação e geralmente se

correlacionam com o estado fisiológico do tecido da semente. À medida que o embrião entra na fase de maturação, o conteúdo de ABA aumenta nas sementes, e o resultante da relação ABA / GA elevada promove a maturação, induz a dormência e inibe a progressão do ciclo celular, crescimento do embrião e a germinação.



Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% pelo teste de

**Figura 1:** Quantificação da expressão do gene GA nas sementes de café, nos estádios verde, verde cana, cereja, passa e seco em diferentes partes das sementes (semente inteira, embrião e endosperma).



Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% pelo teste de

**Figura 2:** Quantificação da expressão do gene ABI3 nas sementes de café nos estádios verde, verde cana, cereja, passa e seco em diferentes partes das sementes (semente inteira, embrião e endosperma).