

EXPRESSÃO GÊNICA DA CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM SEMENTES DE CAFÉ EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO

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

Poucos estudos têm identificado os genes envolvidos na composição bioquímica de grãos de café. O conhecimento sobre a expressão desses genes é essencial como subsídio aos estudos de melhoramento de características agrônômicas importantes, tais como: uniformidade de maturação e duração de ciclo fenológico.

Sobre a habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de radicais livres durante a dessecação sabe-se que os radicais livres acumulam porque sistemas removedores não são efetivos em organismos desidratados. Enzimas removedoras de radicais livres, como glutathione redutase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase podem reduzir os produtos tóxicos resultantes do ataque de radicais livres, antes que os danos ocorrem.

Diante do exposto, foi proposto nessa pesquisa quantificar a expressão do gene catalase (CAT3) e superóxido dismutase (SOD) durante o desenvolvimento de sementes de café. Frutos de café da 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 ($105 \pm 3^\circ\text{C}$ 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 .

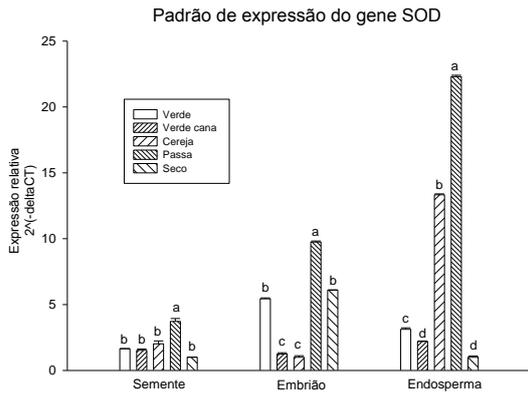
Para a extração de RNA foi utilizado o reagente *Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen)* de acordo com o manual do reagente. A quantidade e qualidade do RNA total foram avaliadas utilizando espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare Life Sciences). O RNA íntegro foi tratado com *DNAseI RNase 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 determinar a diluição 1:5 e a eficiência dos *primers* entre 94% a 97%, foi realizado o ensaio da expressão relativa, através do método C_T comparativo. Todas as amostras 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 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 $2^{-\Delta C_T}$. A linha de corte (*Threshold*) foi definida automaticamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×3 , 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.

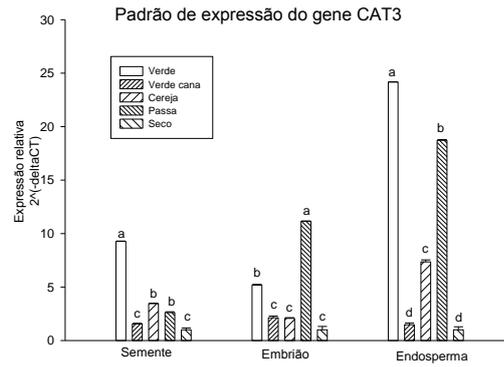
Resultados e conclusões

A expressão dos transcritos SOD (Figura 1) e CAT3 (Figura 2) apresentou comportamento similar nos estádios avançados de desenvolvimento. As enzimas protetoras que participam da remoção de ROS, como a superóxido dismutase (SODs) remove o superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) fazendo a conversão em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez pode ser decomposto pela catalase (CAT) para produzir o oxigênio e a água. O H_2O_2 é um grande responsável pelo estresse oxidativo podendo integrar na condução da regulação dos processos de maturação de frutos de café. Durante o desenvolvimento e armazenamento da semente há perda de água e como consequência há uma perda das funções da membrana, além de distúrbios no metabolismo. Esta desordem metabólica ocasionada pela secagem de sementes é acompanhada pelo acúmulo de várias espécies reativas em oxigênio (ROS), podendo desencadear inúmeros processos oxidativos deletérios, causando ruptura e alterações deteriorativas (Smirnov, 1993). Portanto, proteção contra processos oxidativos pode ser um dos principais determinantes da longevidade das sementes.



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

Figura 1. Quantificação da expressão do gene SOD 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 Skott-Knot

Figura 2. Quantificação da expressão do gene CAT3 nas sementes de café nos estádios verde, verde cana, cereja, passa e seco em diferentes partes das sementes (semente inteira, embrião e endosperma).