

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM FRUTOS DE *Coffea arabica* L. EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO

Cristiana de GASPARI-PEZZOPANE¹ E-mail: cgaspari@iac.sp.gov.br, Mirian P. MALUF², e Fernanda de O. PINTO³

¹Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Piracicaba, SP. ²Embrapa Café, Brasília, DF, ³Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP

Resumo

O cafeeiro arábica apresenta além da florada principal outras sucessivas floradas, o que resulta em uma maturação desuniforme dos frutos. A diferença de maturação entre e dentro de floradas, traz inconvenientes à colheita, tornando-a onerosa e prejudicando a qualidade final da bebida. Durante o processo de desenvolvimento e maturação dos frutos de café vários genes são ativados. O objetivo desse trabalho é então avaliar como os genes α -galactosidase e β -mannanase relacionados ao desenvolvimento e maturação dos frutos se comportam nas diferentes fases de maturação dos frutos. O *data-mining* foi realizado utilizando-se seqüências dos genes α -galactosidase e β -mannanase de *Coffea* presentes no GenBank. Oligos gene-específicos foram desenhados a partir das seqüências identificadas no Banco do Genoma Café. Análises do padrão de expressão demonstraram que transcritos correspondentes à α -galactosidase são observados a partir da fase de frutos em expansão e se mantêm presentes até o estágio de fruto cereja. Já a expressão da β -mannanase é observada ao longo de todo o desenvolvimento do fruto, com um maior acúmulo na fase de frutos verdes. Estes resultados, apesar de representarem uma caracterização inicial do padrão de expressão em frutos, são essenciais para estabelecimento de parâmetros agrônomicos e da metodologia para análise molecular em frutos de cultivares comerciais do IAC

Palavras-chave: frutos, maturação, expressão gênica

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN *Coffea arabica* L. DURING FRUIT DEVELOPMENT AND MATURATION

Abstract

Arabic coffees exhibits a major flower blooming that is frequently followed by minor flowering occurrences, resulting in a non-uniform maturation during fruit development. Differences on maturation time leads to high harvesting costs and low cup quality. Fruit development and maturation are controlled by several genes that are regulated along these processes. In this work the main objective is to evaluate the expression of two ripening genes, α -galactosidase and β -mannanase, in different stages of fruit development. Data-mining in the Coffee Genome Database allowed the identification of sequences corresponding to both genes and the development of gene-specific primers. Gene expression analysis showed that α -galactosidase transcripts are observed from immature green fruits to mature cherry fruits. The expression of β -mannanase is observed in all tested fruit stages, with an increase of transcripts accumulation on green fruits. Although these results represent an initial characterization of gene expression in fruits, they are essential for establishing agronomic parameters and molecular analyses methods for fruits from IAC elite lines.

Key words: fruits, maturation, gene expression

Introdução

C. arabica é uma espécie alotetraplóide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) e predominantemente autofértil em aproximadamente 90% das flores, enquanto que *C. canephora* e as outras espécies conhecidas do gênero *Coffea* são diplóides ($2n = 2x = 22$ cromossomos) e autoincompatíveis, multiplicando-se exclusivamente por fecundação cruzada (Berthaud, 1980; Fazuoli *et al.*, 1999). A diversidade genética de cultivares de *Coffea arabica* L. é relativamente pequena e a sua ampliação torna-se importante para o futuro do melhoramento do cafeeiro. Essa estreita diversidade deve-se ao fato de serem plantas autógamas além de terem sido introduzidas poucos representantes da espécie no Brasil.

O fruto do café é uma drupa com duas lojas de polinização independente que darão origem a duas sementes (grão comercial), dessa maneira, os frutos maduros apresentam a seguinte constituição: exocarpo (casca que apresenta a coloração), mesocarpo (polpa ou mucilagem), endocarpo (pergaminho), película prateada (testa ou resto de tegumento) e endosperma (grão) (Antunes Filho e Carvalho, 1954 e Coste, 1959).

Desde que ocorra a fertilização e as duas lojas se desenvolvam normalmente, o fruto apresentará duas sementes chamadas de “normais” ou “grão chato”. Quando ocorre o aborto em uma das sementes na fase inicial de desenvolvimento, essa tomará a forma arredondada, recebendo o nome de “grão moca”, caso o aborto ocorra em um estágio de desenvolvimento mais avançado, ficando uma ou ambas as lojas vazias, esse se chamará “fruto chocho” ou “fruto bóia” (Antunes Filho e Carvalho, 1954).

O cafeeiro apresenta um ciclo fenológico composto de fase vegetativa e fase reprodutiva, sendo que essa última pode ser dividida, de acordo com Pezzopane et al., 2003, nas seguintes fases: gema dormente, gema entumecida, abotoado, florada, pós-florada, chumbinho, expansão dos frutos, grão verde, verde cana, cereja, passa e seco.

O cafeeiro arábica, além da florada principal, apresenta outras sucessivas floradas dependendo da variação climática e da variabilidade genética (Rena e Maestri, 1987). Esse acontecimento faz com que a maturação se torne desuniforme, o que ocorre também dentro de uma mesma florada. A diferença de maturação entre e dentro de floradas, traz inconvenientes à colheita, tornando-a onerosa e prejudicando a qualidade final da bebida.

Durante o processo de desenvolvimento e maturação dos frutos de café, vários genes são ativados, entre eles os relacionados à síntese de compostos tais como fenóis, minerais, oligossacarídeos, lipídeos, trigonelina, ácidos clorogênicos totais, ácidos alifáticos, cafeína, polissacarídeos totais, aminoácidos, proteínas e ácidos húmicos (Clarke e Macrae, 1985).

O objetivo desse trabalho foi observar como alguns genes relacionados ao desenvolvimento e maturação dos frutos se comportam nas diferentes fases de maturação.

Material e Métodos

Os estudos foram realizados na cultivar Mundo Novo IAC 501 de *C. arabica* na safra 2003/2004. A cultivar encontra-se plantada em campo experimental pertencente ao Centro de Café “Alcides Carvalho” do Instituto Agrônomo da cidade de Campinas – SP.

Os frutos foram colhidos nas diferentes fases fenológicas (chumbinho, expansão, verde, verde cana e cereja) utilizando-se a escala proposta por Pezzopane et al., 2003. Após colhidos os frutos foram congelados em nitrogênio líquido para extração do RNA. Por RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*), foram sintetizados cDNAs dos respectivos RNAs das diferentes fases fenológicas. Com os cDNAs, foram feitas amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para identificar em quais fases fenológicas os genes estão sendo expressos. Os produtos da amplificação separados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

As seqüências correspondentes a genes específicos expressos durante o processo de desenvolvimento e maturação dos frutos foram identificadas nos bancos de seqüências ESTs oriundos do Projeto Genoma Café. Para uma análise inicial foram selecionados genes envolvidos na síntese de carboidratos em frutos, tais como a α -galactosidase, enzima presente durante o processo de desenvolvimento e maturação dos frutos (Zhu e Goldstein, 1994) e β -mannanase, enzima também presente em frutos (Marraccini et al., 2001). O *data-mining* foi realizado utilizando-se seqüências dos genes α -galactosidase (L27992) e β -mannanase (AJ278996) de *Coffea* presentes no GenBank. As buscas identificaram um total de 13 reads de frutos para α -galactosidase e 3 reads de frutos para β -mannanase (Tabela 1). O contig obtido a partir do alinhamento dos reads serviu como base para desenhar oligos gene-específicos. Como controle foi utilizado o gene da actina.

Tabela 1. *Data-mining* das seqüências dos genes α -galactosidase e β -mannanase.

GENES	Nº READS	BIBLIOTECAS	CONTIG	VALIDADOS
α -galactosidase	13	FR1, FR2 e FR4	3	1
β -mannanase	3	FR1 e FR2	1	1

Resultados e Discussão

Os primers de α -galactosidase e β -mannanase foram sintetizados a partir de seqüência identificadas no Projeto Genoma Café, onde a seqüência do oligo de α -galactosidase, apresenta 97% de homologia com a descrita por Zhu e Goldstein, 1994 e, a seqüência de β -mannanase, apresenta 60% de homologia com a descrita por Marraccini et al., 2001. A homologia foi observada pela função BLAST do GenBank. Pelo programa Clustal, observa-se que a homologia se dá devido as seqüências, tanto de α -galactosidase como a de β -mannanase, apresentarem regiões bastante conservadas.

Os resultados das análises de RT-PCR são apresentados na Figura 1. Os fragmentos obtidos por RT-PCR foram de aproximadamente 200 pb, o que corresponde ao tamanho esperado pela análise *in silico*, α -galactosidase 202 pb e β -mannanase 206 pb. Transcritos correspondentes à α -galactosidase são observados a partir da fase de frutos em expansão e se mantém presentes até o estágio de fruto cereja (Figura 1B). Já a expressão da β -mannanase é observada ao longo de todo o desenvolvimento do fruto, com um maior acúmulo na fase de frutos verdes (Figura 1C). Em análises anteriores, Marraccini et al, 2001, observaram um padrão de expressão distinto para estes 2 genes: a expressão de α -galactosidase foi detectada somente nos estágios finais de desenvolvimento do fruto, e a β -mannanase somente em sementes após a germinação. No entanto, o gene da β -mannanase analisado neste trabalho apresenta apenas 60% de homologia com o gene isolado por Marraccini et al., 2001, o que sugere tratar-se de um outro alelo presente na cultivar Mundo Novo. Diferenças de genótipos podem também explicar as diferenças encontradas no padrão de expressão da α -galactosidase. Neste caso, a

cultivar Mundo Novo é um genótipo com um maior número de ciclos de seleção do que a variedade Caturra, utilizada no estudo de Marracini et al., 2001. Este processo pode ter selecionado genótipos com diferentes padrões de acúmulo de açúcares durante o desenvolvimento do fruto, resultando em diferenças entre as duas variedades com relação à composição química final dos frutos.

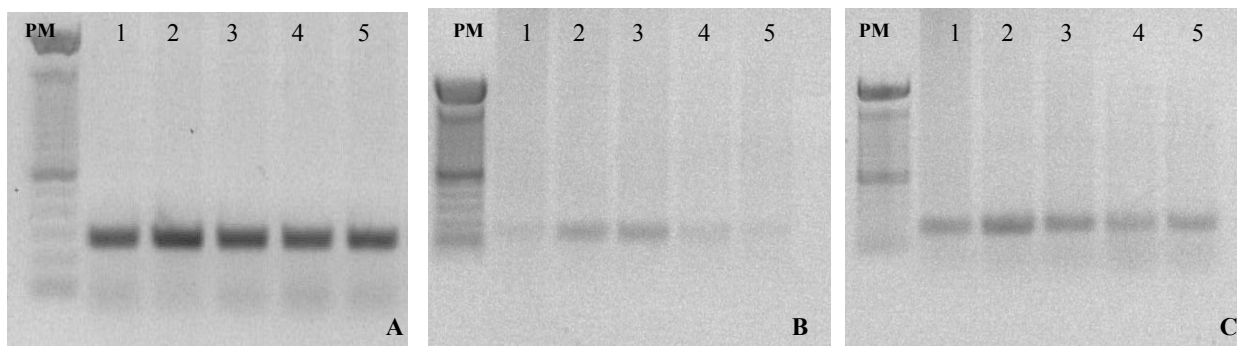


Figura 1. Reação de PCR para as amostras de frutos chumbinho (1), expansão (2), verde (3), verde cana (4) e cereja (5). (A) Actina (B) α -galactosidase (C) β -mannanase. (PM) peso molecular de 100 pb.

Referências bibliográficas

ANTUNES FILHO, H.; CARVALHO, A. Melhoramento do Cafeeiro. VII – Ocorrência de lojas vazias em frutos de café “Mundo Novo”. *Bragantia*, Campinas, v.13, n.14, p.165-179, 1954.

BERTHAUD, J. 1980. L’incompatibilit  chez *Coffea canephora* methode de test et determinisme genetique. *Café, Cacao, The’* 24: 267–274.

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

COSTE, R. *Cafetos y Cafés en el mundo*. Tomo segundo, volumen I. G.P. Maisonneuve e Larose, Paris, 1959.

FAZUOLI, L.C.; MALUF, M.P.; GUERREIRO FILHO, O.; MEDINA FILHO, H.P.; SILVAROLLA, M.B. Melhoramento clássico do cafeeiro relacionado com a biotecnologia moderna. In: III Seminário Internacional sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, Londrina, PR, Anais, 1999. p. 217-229.

MARRACCINI, P.; ROGERS, J.W; ALLARD, C.; ANDRE, M.L.; CAILLET, V.; LACOSTE, N.; LAUSANNE, F.; MICHAUX, S. Molecular and biochemical characterization of *endo- -mannanases* from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta*, v. 213, p.296-308, 2001.

MARRACCINI, P.; ALLARD, C.; ANDRE, M.L.; COURJAULT, C.; GABORIT, C.; LACOSTE, N.; MEUNIER, A.; MICHAUX, S.; PETIT, V.; PRIYONO, P.; ROGERS, J.W; DESHAYES, A. Update on Coffee biochemical compounds, protein and gene expression during bean maturation and in other tissues. 19th International Scietific Colloquium on Coffee – ASIC, Trieste, 14-18 may, 2001.

PEZZOPANE, J.R.M., PEDRO JUNIOR, M.J., THOMAZIELLO, R.A., CAMARGO, M.B.P. Escala para avalia o de est dios 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 Produ o Agrícola*. Associa o Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosf to, Piracicaba, 1987, 249 p.

ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional of a cDNA encoding coffee bean * -galactosidase*. *Gene*, v.140, n. 2, p.227-231, 1994.