

PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM SEMENTES DE CAFÉ ARÁBICA SUBMETIDAS A DIFERENTES FORMAS DE PROCESSAMENTO E SECAGEM

Juliana C. M. Schenk²; Lilian Padilha³; Sttela D.F.V. Rosa⁴; Mirian P. Maluf⁵

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

²Bolsista Pos Doutor, PNPd-CNPq, Campinas-SP. julianamartinati@gmail.com

³Pesquisador, DSc, Embrapa Café-DF, lilian.padilha@embrapa.br

⁴Pesquisador, DSc, Embrapa Café-DF, sttela.rosa@embrapa.br

⁵Pesquisador, PhD, Embrapa Café-DF, mirian.maluf@embrapa.br

RESUMO: Sementes de *Coffea arabica* reduzem rapidamente a sua qualidade inicial o que resulta num período curto para sua comercialização. Os frutos do café são colhidos no estágio cereja o qual coincide com a máxima qualidade fisiológica das sementes, sendo o processamento pós colheita destas sementes determinante na manutenção da sua qualidade. Este trabalho teve como finalidade caracterizar os perfis da expressão de genes em sementes submetidas a diferentes tipos de processamentos e secagens. Para tanto, frutos cereja de café sem processamento e sementes com a mucilagem removida por fermentação ou por desmucilagem mecânica foram secas à sombra ou em secadores até o teor de água de 35 e 12%. A viabilidade das sementes foi analisada pelo teste de germinação, e foram caracterizadas as respostas dos genes da Isocitratolase -ICL, α -galactosidase- α GAL, LEA 2 e Dehidrina. Utilizou-se sementes recém colhidas como calibrador para avaliar a expressão gênica nos diferentes tratamentos. As sementes desmuciladas mecanicamente ou por fermentação e secas à sombra até 12%, apresentaram maior viabilidade medida pela porcentagem de plântulas normais no teste de germinação. A expressão do gene da ICL teve seu nível aumentado com o processamento das sementes, em até duas vezes e a secagem até 12% de umidade aumentou em até 11 vezes a expressão relativa desse gene. O gene α GAL foi superexpresso nas sementes desmuciladas mecanicamente, estando reprimido nos demais tratamentos. O processo de secagem reprimiu a expressão desse gene nas sementes. A expressão do gene da LEA2 foi reprimida nas sementes mantidas nos frutos e a dessecação em secador promoveu a redução drástica no nível de expressão relativa deste gene em sementes desmuciladas. Por outro lado, a secagem em secador até teores de água de 12% aumentou a expressão do gene da dehidrina quando comparado à expressão nas sementes secas à sombra. Neste trabalho, foram identificados padrões de alterações na expressão gênica correlacionadas com o processamento e/ou secagem das sementes, e o trabalho será continuado buscando identificar rotas gênicas ligadas à qualidade das sementes de café.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*, PCR em tempo real, remoção da mucilagem, dessecação

PROFILES OF GENE EXPRESSION IN ARABIC COFFEE SEEDS UNDER DIFFERENT METHODS FOR PROCESSING AND DRYING

ABSTRACT: Arabica coffee seeds quickly lose their initial quality and the consequence of this is a short period for the seed trade. Coffee cherry fruits contain seeds with the maximum physiological quality, and post-harvest processing methods will be critical to maintain their viability. In this study, gene expression profiles were characterized in seeds submitted to different processing and drying methods. Therefore, coffee cherry fruits without any processing and seeds with mucilage removed either by fermentation or mechanical processing were dried mechanically or under shade until 35% and 12% moisture content. Seed viability was determined by the germination test and the expression profile of genes isocitrate lyase- ICL, α -galactosidase- α -GAL, LEA2 and dehydrin was evaluated. The calibrator values to compare gene expression between the different treatments were those from fresh seeds. Seeds processed either mechanically or by fermentation and dried until 12% moisture content had higher viability measured by germination test. ICL gene was twice up-regulated in seeds processed. Drying seeds until 12% moisture content increased up to 11 times the relative gene expression in seeds where mucilage was removed by fermentation. α GAL was overexpressed in seeds where mucilage was removed by mechanical processing, and down regulated in seeds submitted to all other processing methods. Drying seeds down-regulated the expression of α GAL. The LEA2 gene expression was down-regulated in seeds maintained in fruits without processing, and mechanical drying strongly reduced the relative expression in seeds without mucilage. Seeds mechanically dried had dehydrins over expressed compared to those dried under shade. In this work, we were able to identify change patterns in seed gene expression correlated with the processing and/or drying methods and further investigation will contribute for understanding routes related to quality of coffee seeds.

KEYWORDS: *Coffea arabica*, Real time PCR, removing the mucilage, desiccation

INTRODUÇÃO

A qualidade das sementes é importante para a obtenção de mudas vigorosas, bem como, para a manutenção de bancos de germoplasma, sendo que essa qualidade é influenciada por inúmeros fatores pré e pós colheita. Entre esses estão incluídas as condições ambientais durante a fase de produção das sementes, a incidência de pragas e doenças, a colheita das sementes no ponto de maturidade fisiológica, o processamento dos frutos para a obtenção das sementes, o manejo adequado da secagem e do grau de umidade das sementes para evitar danos mecânicos e para favorecer seu armazenamento, dentre outros (Krishnan et al, 2003; Marshal e Levis, 2004; Simic et al. 2007).

As sementes de café são obtidas, principalmente, por dois tipos de processamentos dos frutos: o de via seca, que resulta no café em côco ou café natural; e o de via úmida, que produz os cafés em pergaminho, sendo os frutos despolidos, descascados e as sementes desmuciladas (Vilela, 1998). Durante o processamento das sementes podem ocorrer diversos processos celulares, alterações metabólicas e químicas, incluindo a peroxidação lipídica, a ruptura da membrana, danos no DNA, diminuição da síntese de RNA e proteínas que se traduzem em efeitos prejudiciais à semente (Jyoti & Malik, 2013). Com o intuito de ampliar o conhecimento de genes correlacionados com a qualidade das sementes de café na etapa de pós colheita, este trabalho avaliou o perfil da expressão de quatro genes em sementes com 35% e 12% de umidade obtidas por diferentes combinações de métodos de processamento e secagem.

MATERIAL E MÉTODOS,

Sementes de *C. arabica* cultivar Catuaí Amarelo IAC 62 foram obtidas de frutos colhidos em junho de 2011 na Fazenda Experimental de Varginha da Fundação Procafé, em Varginha, MG. O processamento dos frutos e sementes e as análises da germinação de sementes foram realizadas no laboratório de análise de sementes da UFPA/Lavras, MG. As análises de expressão gênica foram realizadas no laboratório de biologia molecular da Embrapa Café/IAC-Centro de Café, Campinas, SP. Os frutos colhidos no estádio cereja foram submetidos a três diferentes tipos de processamentos: a) café natural ou café em côco: os frutos selecionados foram submetidos imediatamente à secagem sem passar pelo processamento para a retirada da mucilagem; b) café desmucilado pela fermentação: frutos selecionados foram despolidos mecanicamente e desmucilados por fermentação em água durante 24 horas. c) café desmucilado mecanicamente: frutos selecionados foram descascados e desmucilados mecanicamente, antes da secagem. Após o processamento das sementes, essas foram secas em secador ou à sombra até os teores de água de 35% e 12%. Um tratamento adicional com sementes recém colhidas e processadas manualmente foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até o momento das análises de expressão gênica.

O teste de germinação das sementes foi realizado segundo as Regras para Análises de Sementes (Brasil, 1999), onde foi determinada a percentagem de plântulas normais.

Para as diferentes condições de pós colheita das sementes foram analisadas a expressão dos genes: Isocitratoliasa; α -galactosidase; LEA2 e desidrina. Para a obtenção dos transcritos, as sementes foram maceradas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído segundo protocolo sugerido por Chang et al. (1993). Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase e utilizou-se o kit RevertAid™ Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) para a síntese do cDNA. Os genes de interesse foram amplificados em tempo real – qRT-PCR – com o kit Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) nas seguintes condições para amplificação: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 45 ciclos de 95°C/2', 62°C/30" e 72°C/30". Os resultados das quantificações relativas dos genes selecionados foram analisados utilizando-se a quantificação relativa, calculada a partir do valor de 2^{-DDCt} , sendo $DCt = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene controle}}$, e $DDCt = DCt_{\text{gene alvo}} - DCt_{\text{calibrador}}$, onde Ct é o ciclo definido como *threshold*, ou seja, onde a fluorescência é detectável e é inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias (Tyagi et al., 1998). Amostras de sementes recém-colhidas foram utilizadas como calibrador para determinação da expressão relativa dos genes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de café recém-colhidas no estádio cereja apresentavam um teor de água de 65% e foram consideradas como calibrador para análise da expressão relativa dos demais tratamentos investigados. Após o processamento, as sementes apresentavam os teores de água de 65%, 52% e 56% para os tratamentos natural, sementes desmuciladas e sementes submetidas à fermentação para retirada da mucilagem, respectivamente. Os resultados para a germinação das sementes demonstraram que, de uma maneira geral, quando as sementes foram mantidas nos frutos - processamento natural ou café em côco- elas apresentaram qualidade fisiológica inferior às aquelas submetidas aos demais tipos de processamento (Tabela 1). As sementes desmuciladas mecanicamente ou por fermentação e secas à sombra até 12%, apresentaram maior percentagem de plântulas normais no teste de germinação, indicando maior viabilidade destas sementes.

Tabela 1: Germinação de sementes submetidas a diferentes tipos de processamento e secagem até os teores de água de 35 e 12%.

Processamento	Secagem	Umidade	
		35%	12%
Natural	Sombra	1 bB	50 aA
	Secador	3 bB	39 aB
Desmucilado	Sombra	78 bA	88 aA
	Secador	80 aA	77 aB
Fermentado	Sombra	89 aA	88 aA
	Secador	84 aA	74 bB

Para cada tipo de processamento, médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5%.

Estudos realizados em sementes submetidas a diferentes tratamentos pós-colheita sugeriram que a enzima ICL tenha um papel importante na germinação dessas, uma vez que foi observado um aumento significativo no nível destes transcritos durante o processamento de sementes (Bytof et al., 2007). Também em nossos estudos, independente do tipo de processamento, a expressão do gene da ICL foi duas vezes maior nas sementes processadas quando comparadas com as sementes no momento da colheita (Figura 1a). Por outro lado, o tipos de processamentos das sementes influenciaram os perfis de expressão dos genes da α -galactosidase e da dehidrina (Figuras 1b e 1c): a retirada da mucilagem mecanicamente aumentou a expressão desses dois genes, enquanto que no processamento das sementes pela fermentação, ambos os genes se mantiveram reprimidos. Essa resposta diferente pode ser devido a principal diferença entre os tratamentos estar relacionada ao processo da fermentação depender da imersão das sementes em água por 24h para que ocorra a fermentação da mucilagem e, esta perca sua aderência ao pergaminho das sementes. Certamente, isso contribui para o acionamento de diferentes rotas de proteção contra o estresse.

Após a secagem, as sementes que tiveram a mucilagem removida pela fermentação e que foram secas até 12% de umidade apresentaram os maiores níveis de expressão para ICL. Selmar et al. (2004) também observaram uma quantidade maior de transcritos da ICL em sementes de café durante a secagem e baixa expressão em sementes de café frescas.

A α -galactosidase é uma das três principais enzimas envolvidas na modificação ou degradação da parede celular que também participa da síntese de carboidratos em frutos durante os processos de desenvolvimento e maturação (Zhu & Goldstein, 1994). Além disso, Segundo Farias (2012) o aumento da expressão este gene está ligado ao processo de expansão do embrião e degradação da parede celular durante o início da germinação. Após o processamento (Figura 1b), sementes desmuciladas apresentaram 4,3 vezes maior expressão relativa do gene de α galactosidase em comparação as sementes no momento da colheita. As sementes mantidas nos frutos ou fermentadas apresentaram esse gene reprimido, indicando não haver sinalização para início do processo de germinação. Por outro lado, a secagem das sementes de maneira rápida em secador ou mais lentamente à sombra resulta na repressão deste gene em relação ao momento da colheita, independentemente da forma como as sementes foram processadas.

Em sementes classificadas como ortodoxas, a redução do teor de água é uma sinalização para que elas se preparem para disparar o seu processo de germinação quando submetidas a condições ótimas. As sementes de café são consideradas como intermediárias e as melhores condições para manutenção da qualidade destas sementes, ainda é uma variável que não é bem explicada na literatura. Alguns genes tem papel bem definido na tolerância à dessecação como as proteínas abundantes na embriogênese tardia ou LEA, classe em que as também dehidrinas estão inclusas. A expressão do gene da LEA 2 foi em média, 7,5 vezes maior nas sementes desmuciladas ou fermentadas, estando reprimidas nas sementes que foram mantidas nos frutos (Figura 1c). A secagem em secador ao reduzir o teor de água de 35 para 12% de umidade promoveu a redução drástica na expressão relativa do gene da LEA 2 que foi de 14,9 para 2,0 vezes e de 39,8 para 3,9 vezes nas sementes desmuciladas mecanicamente e fermentadas, respectivamente. A expressão relativa do gene dehidrina foi suprimida em 1,8 vezes nas sementes fermentadas quando comparada às sementes recém colhidas, provavelmente, devido ao efeito provocado pela imersão das sementes em água para a retirada da mucilagem pela fermentação (Figura 1d). A secagem lenta após o processamento nos tratamentos natural e fermentado mantém esse gene reprimido. Por outro lado, a secagem em secador até teores de água de 12% aumenta a expressão do gene da dehidrina quando comparado à expressão nas sementes secas a sombra.

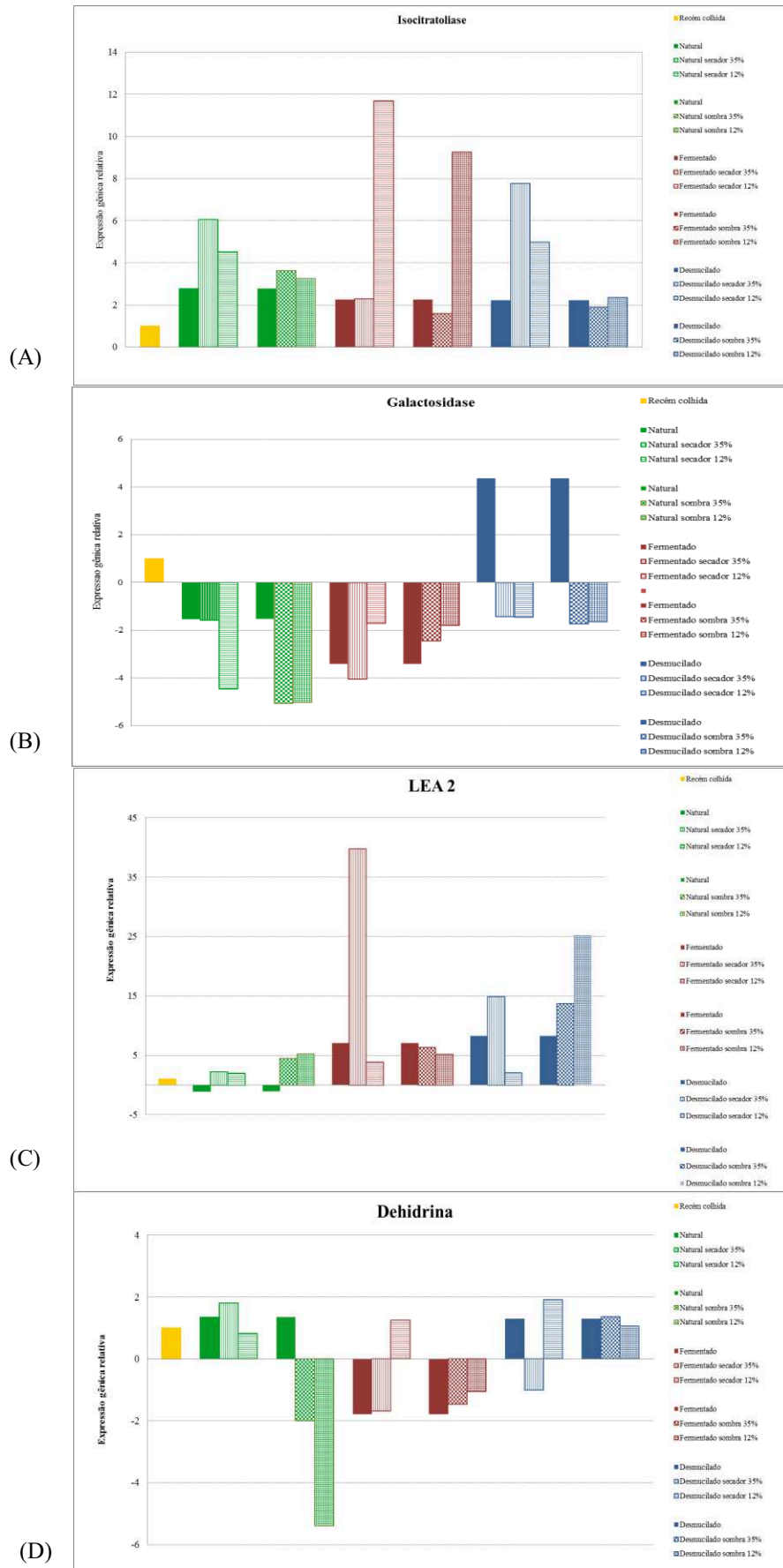


Figura1. Perfis de expressão dos genes da(A) Isocitratolase, (B) α -Galactosidase, (C) LEA 2 e (D) Dehidrina em sementes de café arábica submetidas a três tipos de processamento –natural, desmucilado mecânico, desmucilado pela

fermentação - secas em secador ou à sombra até os teores de água de 35% e 12%. A expressão gênica observada nos diferentes tratamentos é relativa àquela observada nas sementes recém colhidas.

CONCLUSÕES

A manipulação das sementes após a colheita, seja mantendo-as nos frutos ou processando esses frutos para a liberação das sementes, induz o aumento da expressão do gene da ICL. A secagem até 12% contribui para incremento significativo na expressão desse gene quando a remoção da mucilagem das sementes é realizada pela fermentação.

A forma de retirada da mucilagem das sementes, mecanicamente ou pela fermentação, interfere nos perfis de expressão dos genes da α -galactosidase e da desidrina.

Após a colheita, a retirada da mucilagem das sementes favorece o aumento da expressão do gene LEA2 sendo que as sementes mantidas nos frutos mantém esse gene reprimido. A resposta deste gene é influenciada pelo método de secagem das sementes.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pelo apoio financeiro nas pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p. <http://www.bs.cca.ufsc.br/publicacoes/regras%20analise%20sementes.pdf>
- BYTOF, G.; KNOPP, S.-E.; KRAMER, D.; BREITENSTEIN, B.; BERGERVOET, J. H. W.; GROOT, S. P. C., et al. Transient occurrence of seed germination processes during coffee post-harvest treatment. *Annals of Botany*, v. 100, p. 61–66, 2007.
- CHANG S.; PURYEAR J.; CAIRNEY J. A single and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular Biology*, v.11, p.113-116, 1993.
- FARIAS, E.T. Expressão genica no embrião e no endosperma micropilar de sementes de café (*Coffea arabica* L.) durante a germinação. 71f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Agricultura). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrômicas – Campus de Botucatu. Botucatu, 2012.
- JYOTI; MALIK, C.P. Seed deterioration: a review. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, v. 2, no. 3, p. 374–385, 2013.
- KRISHNAN, P.; NAGARAJAN, S.; DADLANI, M.; MOHARIR, A.V. Characterization of wheat (*Triticum aestivum* L.) and soybean (*Glycine max* L.) seed under accelerated aging condition by proton nuclear magnetic spectroscopy. *J Seed Sci Technol.*, v. 31, p. 541-550, 2003.
- MARSHAL, A.H. AND LEVIS, D. N. Influence of seed storage conditions on seedling emergence, seedling growth and dry matter production of temperate forage grasses. *J Seed Sci Technol.*, v.. 32, p. 493-501, 2004.
- SELMAR, D.;BYTOF, G.;S.-E. KNOPP, S-E. New aspects of coffee processing: The relation between seed germination and coffee quality. *Proceedings of the 19eme Colloque Scientifique International sur le Café, ASIC, Paris, 2002.*
- SISIMIC, B.; POPOVIÆ, R.; SUDARIC, A.; ROZMAN, V.; KALINOVIC, I.; COSIC. J. Influence of Storage Condition on Seed Oil Content of Maize, Soybean and Sunflower, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, v. 72, no. 3, p. 211-213, 2007.
- TYAGI, S.; BRATU, D.P.; KRAMER, F.R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotech.*, v. 16, p. 49-53, 1998.
- VILELA, E.R.; PEREIRA, R.G.F.A. Pós-colheita e qualidade do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA: armazenamento e processamento de produtos agrícolas. Lavras: UFLA/SBEA, p. 219-274, 1998.
- ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase. *Gene*, v. 140, n.2, p. 227-231, 1994.