

EXPRESSÃO GÊNICA EM GRÃOS DE CAFÉ SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS PÓS-COLHEITA – UMA ANÁLISE PRELIMINAR¹

Terezinha de Jesus Garcia Salva²; Cristiana Gaspari-Pezzopane³; Nemaila Bonturi⁴; Mirian Perez Maluf⁵

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

² Pesquisadora, D.Sc., Centro de Café “Alcides Carvalho”- IAC, Campinas SP, tsalva@iac.sp.gov.br

³ D.Sc., Centro de Café “Alcides Carvalho”, IAC, Campinas SP, cristiana.gaspari@gmail.com

⁴ Aluna de Pós-Graduação, B.Sc Engenharia Química, Unicamp, Campinas SP, nebonturi@yahoo.com.br

⁵ Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café, Brasília DF, maluf@iac.sp.gov.br

RESUMO: O conhecimento sobre como os tipos de processamento pós-colheita interferem na qualidade final de bebida é essencial para que cafês com qualidades especiais possam ser desenvolvidos. Dentre as características que podem ser diretamente influenciadas pelo processamento, a composição química do grão é a de maior interesse. Fatores como a regulação da expressão de genes e a atividade de enzimas específicas são determinantes para esta composição. Neste contexto, o objetivo deste estudo preliminar foi avaliar como os processamentos por via seca e úmida afetam o padrão de expressão dos genes isocitrato liase (ICL), β -mananase (MAN) e α -galactosidase (GAL). Frutos cereja foram submetidos a condições de secagem natural, despulpamento e demucilamento. A expressão dos genes foi quantificada pela metodologia de RT-PCR em tempo real. A análise comparativa da expressão dos 3 genes indicou que no processamento via seca a expressão de ICL e MAN nas sementes foi maior do que em sementes de frutos processados por via úmida. Para o gene GAL, não foram observadas diferenças expressivas no perfil de expressão em sementes dos frutos submetidos aos diferentes tratamentos. Esses resultados diferiram dos obtidos em outros estudos já descritos na literatura, em que, apesar de ter sido avaliada a expressão de genes, foram utilizadas etapas de processamento distintas das utilizadas neste trabalho. Esses resultados revelaram, portanto, que há necessidade de se padronizarem os processamentos experimentais em pesquisas visando avaliar efeitos dos tratamentos pós-colheita sobre a qualidade do café.

Palavras-chave: processamento, expressão gênica, desenvolvimento de fruto.

GENE EXPRESSION IN COFFEE GRAINS SUBMITTED TO DIFFERENT POST-HARVEST PROCESSING METHODS – A PRELIMINARY ANALYSIS

ABSTRACT: How post-harvesting treatments affect final cup quality represents an essential knowledge for the development of special coffee blends. Among fruit characteristics directly influenced by processing, chemical composition of the grain represents a major interest. Biochemical factors such as fruit-specific gene expression regulation and enzyme activity are responsible for this composition. In this context, the objective of this preliminary study is to evaluate how dry and wet processes can affect gene expression pattern of the genes isocitrate liase (ICL), β -mannanase (MAN) and α -galactosidase (GAL). Cherry fruits were submitted to natural dry, depulping and demucilating processing methods. Gene expression was estimated using real-time RT-PCR. Comparative analyses of accumulation patterns indicated that ICL and MAN expression is higher in fruits dried naturally than in wet-processed fruits. Also, no considerable differences were observed for GAL gene expression pattern among treatments. These observations differ from others already described in the literature, which although evaluated gene expression as well, used different steps for fruit processing than those described here. Therefore, these studies indicated that the establishment of experimental method parameters is necessary for further evaluations of the influence of post-harvest processing methods on final coffee cup quality.

Key words: fruit processing, fruit development, gene expression

INTRODUÇÃO

A qualidade final do café está diretamente relacionada com a composição química da semente. O estabelecimento desta composição é controlado especialmente pela origem genética, sendo influenciado também pelas técnicas de cultivo, pelas condições ambientais e pelo tipo de tratamento pós-colheita. Assim, atualmente os métodos de processamento por via úmida, em contraposição ao tratamento tradicional por via seca, vêm sendo adotados por resultar em cafês com qualidade de bebida superior. No entanto, as bases fisiológicas e químicas para esta qualidade ainda não são totalmente compreendidas. Alguns estudos já foram realizados visando elucidar como os tratamentos pós-

colheita podem influenciar a qualidade da bebida, focando especialmente a composição química de grãos (Santos et al., 2009), a atividade de enzimas relacionadas com a germinação (Selmar et al., 2006) e a expressão de genes específicos (Bytoff et al., 2007). De maneira geral, estes estudos sugerem que o processamento por via úmida favorece o início da germinação do embrião, caracterizado pelo aumento da expressão e da atividade da enzima isocitrato liase (ICL). No entanto, os resultados destes estudos são pouco conclusivos devido à falta de padronização dos tratamentos e das análises propostas, e indicam que para uma compreensão dos efeitos dos processamentos sobre a qualidade da bebida é necessário inicialmente estabelecer critérios únicos para estas comparações.

Neste contexto, a proposta deste estudo preliminar foi estabelecer critérios para as análises da influência de tratamentos pós-colheita na expressão de genes relacionados com a germinação de frutos de café, a partir da utilização de processamentos via seca e úmida, nas mesmas condições utilizadas para a produção de cafés comerciais. Assim, frutos cereja da cultivar Mundo Novo foram coletados e submetidos a condições de secagem em terreiro, após lavagem, despulpamento e lavagem, ou desmucilamento seguido de manutenção por 0 ou 24 horas em condições úmidas. Os genes avaliados foram os que codificam para as enzimas isocitrato liase, associada com germinação, β -mananase e α -galactosidase responsáveis pela mobilização de açúcares na semente. Os resultados obtidos diferiram dos anteriormente publicados, indicando a necessidade de se estabelecerem parâmetros comuns para este tipo de caracterização.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Tratamentos – Todos os experimentos foram realizados no Centro de Café “Alcides Carvalho”/ IAC, Campinas, SP, durante o ano agrícola de 2007/2008. Frutos no estágio cereja da cultivar Mundo Novo foram coletados e separados em 3 grupos. O primeiro grupo, denominado CN, recebeu o tratamento “natural”, ou seja, os frutos foram lavados e secos em terreiro, ao sol, até atingir o nível de umidade de aproximadamente 11%. Para compor as amostras do segundo grupo, CL, os frutos foram despulpados e fermentados por 24h, lavados e secos ao sol até cerca de 11% de umidade. O terceiro grupo, CD, consistiu de sementes de frutos descascados e desmucilados, mantidos em condições de umidade controlada por 0 (controle) (CD T0) ou 24 horas (CD T24h), e então secos em terreiro nas mesmas condições do tratamento CL. Ao final da secagem, os frutos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C .

Extração de RNA total e controle da extração - O RNA total dos frutos foi extraído de acordo com Chang *et al.* (1993). A dosagem do RNA total foi feita em espectrofotômetro UV (Shimadzu), medindo-se a absorbância a 260 nm e 280 nm. A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. O kit RevertAidTM Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) foi usado para a síntese de cDNA, de acordo com as recomendações do fabricante. Para todas as amostras foram utilizados 500 ng de RNA total. A qualidade do cDNA foi avaliada pelo padrão de amplificação do gene β -Actina.

Síntese dos oligos - Os oligonucleotídeos gene-específicos (primers) utilizados para a avaliação da expressão dos genes isocitrato liase (ICL), β -mananase (MAN) e α -galactosidase (GAL) em cafeeiros foram desenhados a partir dos *contigs* identificados para cada gene no Banco de Dados do Genoma Café. Em seguida, realizou-se teste em PCR semi-quantitativo com a finalidade de verificar a capacidade de amplificação dos primers, bem como a temperatura ideal para anelamento, utilizando-se cDNA de frutos. Posteriormente, foi realizado, de acordo com o manual do equipamento, o teste de eficiência dos primers pelo método de PCR em tempo real, empregando-se diluições seriadas de cDNA de frutos.

Quantificação da expressão gênica – esta análise foi realizada utilizando-se a metodologia de RT-PCR quantitativo, realizada na plataforma ABI7300 System (Applied Biosystems). Para as reações foi utilizado o Kit Syber Green (Invitrogen) e as condições de reações seguiram as recomendações do fabricante. Para confirmar a presença de amplicons únicos para cada gene avaliado, os produtos do PCR foram submetidos à curva de dissociação, com temperatura variando entre 60°C e 95°C . Os resultados foram analisados através do software SDS version 1.3.1 (Applied Biosystems), e a frequência relativa dos transcritos foi estimada através do uso dos parâmetros “threshold”, “baseline” e CT (Iskandar et al., 2004). O gene GAPDH foi usado como controle e a amostra calibradora foi a de frutos com tratamento natural (CN). A avaliação da expressão para cada gene foi feita em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão de 3 genes distintos (ICL, MAN e GAL) foi avaliada em frutos da cultivar Mundo Novo submetidos a 3 diferentes processamentos. Os genes codificam para enzimas relacionadas com a germinação e mobilização de carboidratos em sementes de café. Para quantificação da expressão foi utilizada a metodologia de PCR em tempo-real, e a variação dos níveis de expressão entre as amostras foi estabelecida pela comparação da quantidade estimada de transcritos para cada gene em relação à amostra CN.

Na Figura 1 são apresentados os resultados das análises de quantificação relativa. Para os 3 genes avaliados a expressão foi maior na amostra CN, ou seja, em grãos de frutos integrais secos em condições de terreiro. Nas amostras processadas por via úmida houve uma diminuição no nível de expressão de ICL, sendo que as amostras CL e CD T24h apresentaram o mesmo perfil de expressão. Este perfil de expressão difere daquele já descrito na literatura, que indica

que a expressão de ICL é mais intensa desde o início do processamento por via úmida (Selmar et al., 2006, Bytof et al., 2007). De acordo com estes estudos substâncias inibidoras de germinação presentes na polpa (casca e mucilagem) impediriam a germinação em grãos processados por via seca. Já os frutos despulpados e lavados ou desmucilados, ao perderem a polpa completamente, iniciariam o processo de germinação. Neste caso, um aumento da expressão de ICL estaria associado com essa germinação. Em outro estudo, Pezzopane (2008) detectou aumento do nível de expressão de ICL em frutos cereja quando comparado com outros estágios de desenvolvimento do fruto. Assim, estes resultados sugerem que talvez a ICL não seja um indicador eficiente da germinação de sementes de café. Outro aspecto importante, é que estes estudos foram realizados utilizando-se processamentos pós-colheita e metodologias de avaliação da expressão de genes distintas.

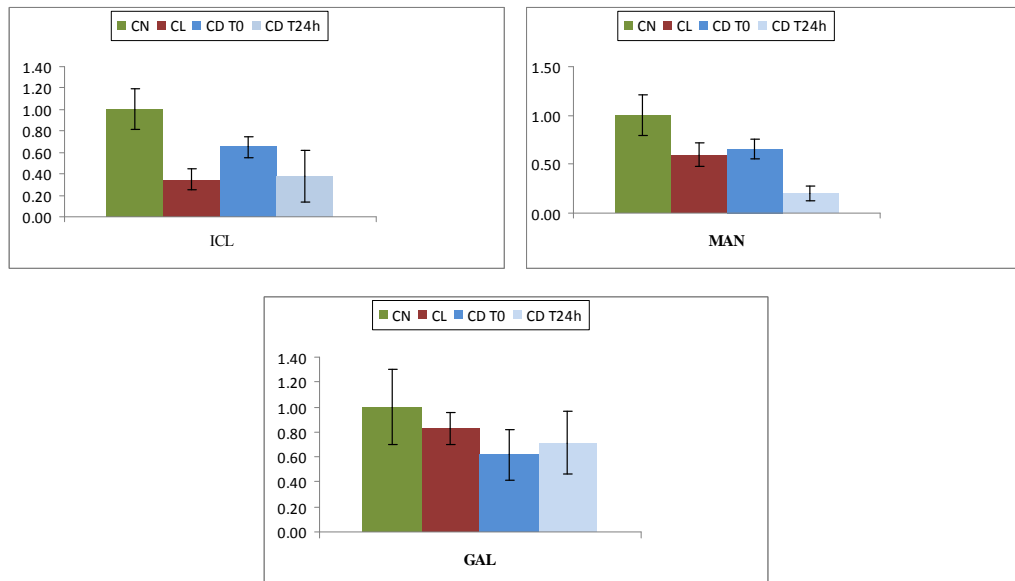


Figura 1- Quantificação relativa de transcritos específicos dos genes isocitrato liase (ICL), b-mananase (MAN) e a-galactosidase (GAL) em frutos submetidos a secagem natural (CN), despulpamento (DL) e desmucilamento tempo 0 (CD T0) e tempo 24h (CD T24h).

O perfil de expressão do gene MAN também apresentou diferenças entre as amostras. Como observado para ICL, a amostra CN apresentou o maior nível de expressão. A enzima β -mananase também está relacionada com a germinação do embrião, sendo responsável pela degradação da parede celular em torno do embrião, facilitando seu desenvolvimento (Marracinni et al., 2001). Os resultados mostraram uma diminuição no acúmulo de transcritos MAN nas amostras procesadas por via úmida, CL e CD. Esta enzima é necessária somente no início da germinação, e sua atividade é inibida por mecanismos de feedback. Assim, a diminuição dos transcritos em amostras por via úmida pode ser explicada por este mecanismo, caso a germinação tenha sido iniciada após a remoção da polpa.

As diferenças no nível de expressão observadas para o gene GAL não foram tão evidentes, como para ICL e MAN. Neste caso, ocorreu diminuição do acúmulo de transcritos GAL nas amostras CL e CD. A enzima α -galactosidase também é responsável pela mobilização de carboidratos presentes na parede celular (Zhu & Goldstein, 1994). As análises para GAL sugerem que este gene também não é um bom indicador para estudos do efeito de processamentos pós-colheita na qualidade final do café.

CONCLUSÕES

- O gene B-MAN pode representar um indicador da germinação de sementes de café.
- Para uma caracterização molecular do efeito de tratamentos pós-colheita na qualidade final do café é essencial o estabelecimento de parâmetros e padronização de metodologias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BYTOF, G.; KNOPP, S-E.; KRAMER, D.; BREITENSTEIN, B.; BERGERVOET, J.H.W.; GROOT, S.P.C.; SELMAR, D. Transient Occurrence of Seed Germination Processes during coffee post-harvest treatment. *Annals of Botany*, v.100, p. 61-66, 2007.
- CHANG, S.; PURYEAR, J. E.; CAIRNEY, J. A single and efficient method for isolating RNA from pinetrees. *Plant Molecular Biology*, v.11, p. 113-116, 1993.
- MARRACCINI, P.; ROGERS, J.W; ALLARD, C.; ANDRE, M.L.; CAILLET, V.; LACOSTE, N.; LAUSANNE, F.; MICHAUX, S. Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta*, v. 213, p.296-308, 2001.
- PEZZOPANE, C.G. Atributos fenológicos, agronômicos e expressão gênica durante a frutificação do cafeeiro. **Tese**. 1v. 105p. Doutorado. USP/ESALQ, Fitotecnia. 2008.
- SANTOS, M.A.; CHALFOUN, S.M.; PIMENTA, C.J. Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição, físico química e química do café (*Coffea arabica* L). **Ciênc. agrotec.**, v. 33, p. 213-218, 2009.
- SELMAR D.; BYTOF G.; KNOPP S-E.; BREITENSTEIN B. Germination of coffee seeds and its significance for coffee quality. *Plant Biology*, v.8, p. 260-264, 2007.
- ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase. **Gene**, v.140, n. 2, p.227-231, 1994.