

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO ABCSÍCICO, DURANTE A FASE DE MATURAÇÃO DE SEMENTES DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora*.

Edvaldo A. A. DA SILVA¹ E-mail:amaral@ufla.br, Elvis A. BRAGA¹, Kelly Martins DE BRITO², Felipe VINECKY² e Alan C. ANDRADE²

¹Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG; ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Resumo:

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio natural envolvido na regulação da expressão gênica em importantes processos fisiológicos vegetais. Durante o crescimento vegetativo das plantas, o ABA atua nas respostas a vários fatores de estresses ambientais tais como seca e condições de alta salinidade. O ácido abscísico também desempenha importante função fisiológica, durante o processo de formação de sementes, sendo necessário para desencadear a síntese de lipídeos e proteínas de reserva, na ocorrência de dormência e na aquisição de tolerância à desidratação e ao frio. Desta forma, a caracterização da expressão gênica sob a regulação do ácido abscísico, durante a maturação de sementes de espécies vegetais, pode proporcionar importantes ferramentas para aplicação na biotecnologia e engenharia genética. Entretanto, muito pouco é sabido sobre as bases genéticas e os determinantes moleculares destes aspectos, em sementes do café. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de determinar os teores de ABA durante a fase de maturação de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, assim como, identificar e caracterizar os genes regulados por esse hormônio. Amostras das sementes de *Coffea arabica* cv. Rubi e *C. canephora* cv. Apoatã IAC foram coletadas dos 120 até 270 d.a.f. (dias após a floração), em intervalos de 30 dias. Os embriões foram isolados, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizados e macerados. Parte das amostras foi utilizada para a quantificação de ABA e a outra parte, para a extração de RNA. A análise da expressão foi realizada em membranas, contendo DNA de 96 genes, previamente selecionados na Base de Dados do Genoma Café. A seleção dos genes foi baseada em estudos anteriores, realizados com *Arabidopsis*, indicando o efeito do ABA na regulação de genes similares. Os resultados indicam um acúmulo máximo de ABA, por volta de 180 d.a.f. para *C. arabica* e 210 d.a.f. para *C. canephora*. Resultados preliminares da expressão gênica, indicam que a variação no teor de ABA, durante a fase de maturação de sementes de café, tem efeito direto na expressão de vários dos genes analisados.

Palavras-chave: Sementes de café, tolerância à dessecação, germinação, ácido abscísico, expressão gênica.

DETERMINATION OF ABA CONTENT DURING SEED DEVELOPMENT OF *Coffea arabica* E *Coffea canephora*.

Abstract:

Abscisic acid (ABA) is a natural hormone involved in gene regulation of important physiological processes of plants. During vegetative growth, ABA is involved in the stress responses to several abiotic stresses such as drought and high salt. ABA is also important during seed development, being involved in the synthesis of seed storage proteins and lipids, the promotion of seed-desiccation tolerance and dormancy. Therefore, the characterization of genes under ABA regulation, during the process of seed development, can provide an important tool for plant biotechnology. However very little is known about the process of ABA regulation, during coffee-seed development. Therefore, the aim of the present work was to determine the ABA content during seed development of two coffee species (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) as well as to identify genes under ABA regulation. Seed samples of *Coffea arabica* cv. Rubi and *C. canephora* cv. Apoatã IAC were collected during the period of 120 till 270 d.a.f. (days after flowering), in 30-days intervals. Seed embryos were isolated, frozen in liquid nitrogen, lyophilized and grinded to a fine powder. Half of the samples were used for ABA determination and the other half for RNA extraction. Expression analysis were performed by dot-blot with 96 selected genes identified in the Coffee-EST Database. The candidate genes were selected based on similarity with well characterized ABA-regulated genes from *Arabidopsis*. Results show that there is a maximum increase in ABA content around 180 d.a.f. for *C. arabica* and 210 d.a.f. for *C. canephora*. ABA-content variation correlates with changes in expression of several genes tested.

Key words: coffee seeds, desiccation tolerance, ABA, ABA regulation, gene expression

Introdução

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio natural envolvido na regulação da expressão gênica em importantes processos fisiológicos vegetais. O ABA regula aspectos importantes do desenvolvimento de plantas, incluindo a síntese de proteínas de reserva e lipídeos nas sementes, promove a tolerância à dessecação e dormência e inibe as transições das fases de crescimento embriogênico para crescimento germinativo e de crescimento vegetativo, para reprodutivo (LEUNG & GIRAUDAT 1998; ROCK 2000; ROHDE et al. 2000). Além disso, o ABA está envolvido na regulação gênica de alguns aspectos da resposta fisiológica vegetal aos estresses ambientais, tais como seca, estresse osmótico, salino, frio e em

resposta a ataques por patógenos (LEUNG & GIRAUDAT 1998; ROCK 2000; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2000).

A maturação de sementes começa quando os embriões interrompem a divisão celular e começam um processo de aumento do volume, devido ao acúmulo das proteínas e compostos de reserva. Esta transição está diretamente correlacionada com um aumento no conteúdo de ABA nas sementes, que por sua vez, induz a expressão gênica de um inibidor do ciclo celular (ICK1), o que resulta na interrupção do ciclo celular na fase de transição G1/S (WANG et al. 1998). Em várias espécies, durante o processo de formação de sementes, ocorrem dois picos de acúmulo de ABA. Estudos genéticos realizados com a planta modelo *Arabidopsis*, demonstram que o primeiro pico de acúmulo de ABA é herdado da planta mãe e ocorre imediatamente antes o início da fase de maturação das sementes (KARSSSEN et al. 1983). Em algumas espécies (ex. *Brassica napus*), esses picos estão correlacionados com baixa germinação de embriões (FINKELSTEIN et al. 2002), embora em outras espécies (ex: milho), não existe a mesma correlação (RIVIN & GRUDT 1991). O segundo pico de acúmulo de ABA em sementes de *Arabidopsis* depende de síntese do próprio embrião (KARSSSEN et al. 1983). Embora a síntese de ABA nos embriões das sementes é de somente um terço do nível detectado aos 10 dias após a polinização, esta síntese é sem dúvida essencial para a indução de dormência nas sementes, a qual é mantida mesmo após um decréscimo substancial (6 vezes) dos níveis de ABA durante a maturação. O conteúdo de ABA em sementes maduras do tipo selvagem de *Arabidopsis* é somente algumas vezes superior ao conteúdo de ABA detectado em sementes de um mutante não-dormente e deficiente na síntese de ABA, o que sugere que o nível endógeno de ABA não é o único sinal para a manutenção da dormência em sementes maduras. Entretanto, comparações envolvendo sementes dormentes e não-dormentes de girassol (LE PAGE-DEGIVRY & GARELLO 1992), cevada (WANG et al. 1995) e fumo (GRAPPIN et al. 2000) demonstram que a dormência está correlacionada com nova síntese de ABA durante o processo de embebição. Os genes que codificam as proteínas dehidrinas (LEA's) são um exemplo de fatores genéticos vegetais cuja expressão é aumentada em resposta à desidratação, baixa temperaturas e aplicação de ácido abscísico (CLOSE 1997). O acúmulo das dehidrinas também ocorre durante o processo de maturação das sementes. (ZHU et al. 2000) Além disso, a expressão destes genes é aumentada em resposta a qualquer estresse ambiental que tenha um componente de desidratação tais como alta salinidade e temperaturas abaixo de zero. Dados recentes indicam que as dehidrinas funcionam como protetores celulares aos processos de desidratação associados a baixas temperaturas, atuando como estabilizantes das membranas celulares e outras estruturas (CLOSE 1997).

Alguns aspectos fisiológicos durante o processo de maturação de sementes, tais como o acúmulo de reservas nas sementes e a expressão das dehidrinas, são controlados em grande parte, pela ação coordenada de fatores de transcrição. Sequências específicas localizadas nos promotores dos genes que codificam as proteínas de reserva e as dehidrinas, são essenciais para conferir a especificidade da resposta à presença dos hormônios, bem como o tempo e o tecido, onde estas proteínas serão produzidas (FINKELSTEIN et al. 2002). Na planta modelo *Arabidopsis*, vários destes fatores de transcrição, bem como os elementos localizados nos promotores, envolvidos nas respostas já estão caracterizados. Mutações ou alterações genéticas nestes fatores de transcrição, como por exemplo nos genes (ABI1, ABI3, ABI4 ou ABI5) de forma combinada com mutações nos genes FUS3 ou LEC1, resultam em plantas com sementes altamente pigmentadas, que não acumulam proteínas de reserva, não conseguem adquirir tolerância à dessecação e em alguns casos são vivíparas (KEITH et al. 1994; MEINKE et al. 1994; PARCY et al. 1997; NAMBARA et al. 2000; FINKELSTEIN et al. 2002). Em várias espécies vegetais, os níveis de ABA endógeno é essencial para a indução de dormência e conseqüentemente, inibição da germinação. Efeitos antagônicos ao ABA, pela ação de outros hormônios como as giberelinas, etileno e os brassinosteróides têm também sido bem documentados (FINKELSTEIN et al. 2002).

Recentemente, foi também constatado, o envolvimento do ácido abscísico na regulação de algumas etapas do processo de germinação de sementes de caféiro. Observa-se claramente um acúmulo transitente de ABA na fase inicial de embebição das sementes de caféiro, onde a protrusão radicular coincide com níveis de ABA próximo de zero. Neste caso, existe uma correlação negativa entre os níveis de ABA no embrião e o início do processo de germinação de sementes de caféiro, de maneira semelhante ao que ocorre em outras espécies. Entretanto, os efeitos antagônicos das giberelinas ao ABA, em sementes de caféiro não foram observados (AMARAL DA SILVA 2002).

Em resumo, o envolvimento do ácido abscísico na regulação de vários processos fisiológicos importantes como maturação de sementes, dormência e tolerância à dessecação e ao frio, em várias espécies vegetais, já é estabelecido e caracterizado o que proporcionando importantes ferramentas para aplicação na biotecnologia e engenharia genética. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o de determinar os teores de ABA durante a fase de maturação de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, assim como, identificar e caracterizar os genes regulados por esse hormônio.

Material e Métodos

Para a extração e quantificação dos níveis de ABA das sementes de caféiro nas fases de maturação e embebição, os embriões das sementes de *Coffea arabica* da cultivar Rubi e *Coffea canephora* cultivar Apoatã IAC foram isoladas durante a maturação e embebição, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas. As amostras (15 embriões por amostra) foram maceradas em almofariz e imediatamente transferidas para solução de extração (metanol + BHT) por 16 horas a 4 °C, de acordo com o protocolo estabelecido por RAYKHEL et al., (1987). Os extratos foram centrifugados e o sobrenadante liofilizado até secagem completa. A quantificação dos níveis de ABA foi então realizada utilizando-se um Kit de detecção imunológica (Sigma-Aldrich).

Conforme descrito acima, uma parcela do material coletado e pulverizado para as determinações do teor de ABA das sementes foi utilizado para a extração de RNA, utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções

do fabricante. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e visualizada após coloração com brometo de etídio. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro, utilizando-se comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

A construção dos arranjos e as hybridizações para as análises de expressão em membranas de nylon, foi realizada de acordo com o descrito por VALERIO et al. (2004), com pequenas modificações. A diferença é que neste trabalho, foram utilizados produtos amplificados por PCR dos clones identificados na Base de Dados do Genoma Café.

Resultados e Discussão

Os resultados de determinação do conteúdo de ABA nas diferentes amostras de embriões coletadas durante o desenvolvimento dos frutos de café, estão apresentados na figura 1. Os dados mostram que existe uma diferença temporal no acúmulo de ABA para as diferentes espécies estudadas. No caso de *C. arabica*, nota-se claramente um acúmulo máximo de ABA, por volta de 180 d.a.f. e para *C. canephora* este pico ocorre aos 210 d.a.f. Esses dados indicam que o aumento no conteúdo de ABA em *C. Canephora* é mais lento, quando comparado com *C. arabica*. Essas diferenças podem estar relacionadas com as diferenças observadas na tolerância à dessecação e ao frio, destas duas espécies (EIRA et al., 2000).

Resultados preliminares das análises da expressão gênica, indicam que existe uma correlação da alteração do conteúdo de ABA, durante a fase de maturação de sementes de café, com a variação transcricional de vários dos genes testados. Novas repetições dessas análises estão sendo realizadas, com o intuito de se minimizar as variações de "background". Análises de Northern Blot para a confirmação de alguns dos resultados também estão sendo realizadas.

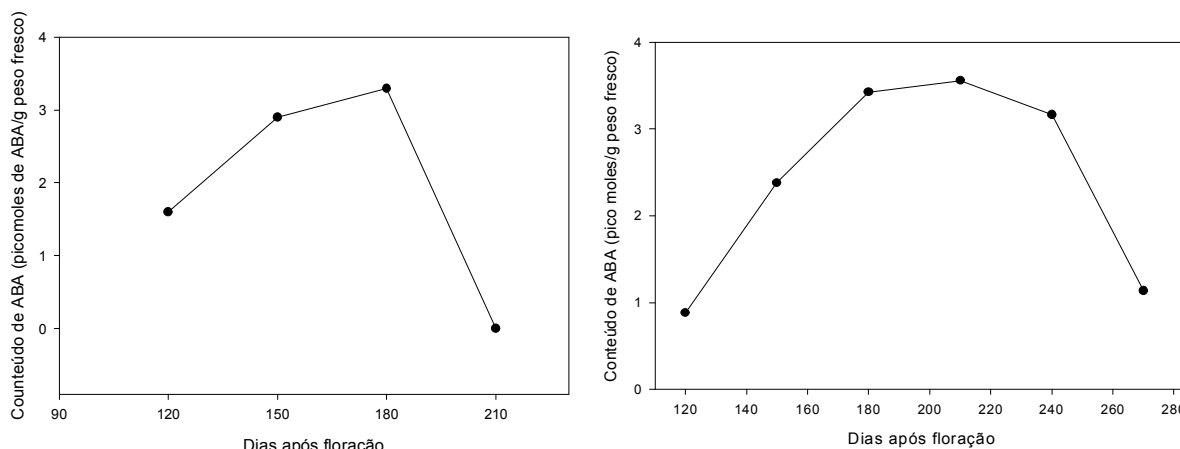


Figura 1 – Conteúdo de ABA durante o desenvolvimento de sementes de *Coffea arabica* (A) e *Coffea canephora* (B).

Referências bibliográficas

- AMARAL DA SILVA, E. A. Coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation. Plant Physiology. Wageningen, Wageningen University: 106.(2002)
- CLOSE, T. J. (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*,100: 291-296.
- EIRA, M. T. S., C. WALTERS, et al. (1999) Tolerance of Coffea spp. seeds to desiccation and low temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*,11:97-105.
- FINKELSTEIN, R. R., S. S. GAMPALA, et al. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14:s15-45.
- GRAPPIN, P., D. BOUINOT, et al. (2000) Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta*,210(2): 279-285.

- KARSSSEN, C., D. BRINKHORST-VAN DER SWAN, et al. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* v.157, p.158-165,1983
- KEITH, K., M. KRAML, et al. *fusca3*: A Heterochronic Mutation Affecting Late Embryo Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* v.6,n.5, p.589-600.,1994.
- LE PAGE-DEGIVRY, M. T. and G. GARELLO. In situ abscisic acid synthesis: A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* v.98, p.1386-1390,1992
- LEUNG, J. and J. GIRAUDAT. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol Biol* v.49, p.199-222.
- MEINKE, D. W., L. H. FRANZMANN, et al. (1994) Leafy Cotyledon Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* v.6,n.8, p.1049-1064.
- NAMBARA, E., R. HAYAMA, et al. (2000) The role of *ABI3* and *FUS3* loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. *Developmental Biology* v.220,n.2, p.412-423.
- PARCY, F., C. VALON, et al. (1997) The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell* v.9,n.8, p.1265-77.
- RAYKHEL, NV, HUNGHEES, DW AND GALAU, GA (1987). An enzyme-immunoassay for quantitative analysis of abscisic acid in wheat. In *Molecular Biology of Plant Growth Control*. Alan R. Liss, New York, pp. 197-207.
- RIVIN, C. J. and T. GRUDT. (1991) Abscisic acid and the developmental regulation of embryo storage proteins in maize. *Plant Physiology* v.95, p.358-365.
- ROCK, C. D. (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* v.148, p.357-396.
- ROHDE, A., S. KURUP, et al. (2000) *ABI3* emerges from the seed. *Trends in Plant Science* v.5,n.10, p.418-419.
- SHINOZAKI, K. and K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3):217-223.
- VALERIO L, DE MEYER M, PENEL C, DUNAND C. (2004) Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry*, 65(10):1331-42.
- WANG, H., Q. QI, et al. (1998) *ICK1*, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both *Cdc2a* and *CycD3*, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J*, 15(4): 501-10.
- WANG, M., S. HEIMOVAARA-DIJKSTRA, et al. (1995) The monoclonal antibody JIM 19 modulates abscisic acid action in barley aleurone protoplasts. *Planta*,196:271-276.
- ZHU, B., D. W. CHOI, et al. (2000) Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Mol Gen Genet*, 264(1-2):145-53.