

ANÁLISE DE GENES EXPRESSOS DURANTE ESTÁDIOS FINAIS DA MATURAÇÃO DE FRUTOS DE CAFÉ

Ilara G. F. BUDZINSKI¹, Sandra M. B. CAÇÃO¹, Cristine E. A. CARNEIRO, Luiz Filipe P. PEREIRA² E-mail: lpereira@japar.br e Luiz Gonzaga E. VIEIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, PR, ² Embrapa Café, Londrina, PR.

Resumo:

A maturação uniforme dos frutos do cafeeiro relaciona-se diretamente com a qualidade da bebida. Diferentes floradas em um mesmo cafeeiro propiciam frutos em estádios desiguais de maturação podendo resultar em uma maior dificuldade na colheita, maior gasto com mão de obra e queda na qualidade do produto. Em frutos climatéricos, o processo final da maturação é desencadeado por um grande acúmulo de etileno, seguido por mudança bioquímicas e fisiológicas que promovem principalmente a desestabilização da parede celular dos frutos, composta principalmente por compostos pectícos. As pectinas são degradadas devido à solubilização e despolimerização da parede celular vegetal em decorrência da ação de enzimas como: pectinametilesterase, poligalacturonase, xiloglucanases, xilanases, pectinaliasas e β -galactosidases. Nosso objetivo principal é caracterizar e entender as mudanças na expressão gênica e enzimática que ocorrem durante a maturação dos frutos de café, visando melhorar a uniformidade da maturação. Neste trabalho foram feitos estudos de expressão de genes que codificam para ACC oxidase, expansina, pectinametilesterase e poligalacturonases, através da análise “*in silico*” do banco de dados do Projeto Genoma Café, e experimentos de expressão dos genes e enzimas. Análise de transcritos demonstrou um aumento de ACC oxidase em frutos verde-cana seguido da atividade de pectinametilesterases em estágios intermediários de maturação (frutos avermelhados). A atividade da PG foi detectada nos estádios finais de maturação, principalmente em frutos cereja.

Palavras-chave: maturação, poligalacturonase, pectinametilesterase, expansina, genoma, *Coffea*

GENE EXPRESSION ANALYSIS DURING THE FINAL STAGES OF COFFEE FRUIT RIPENING

Abstract:

The quality of coffee is directly related with the ripening stage of the fruits during harvest time. In climacteric fruits a dramatic increase in ethylene biosynthesis promotes the subsequent steps of fruit ripening, with biochemical and physiological changes. Those changes include: softening of cell wall, sugar accumulation, modification of phenolic and organic acid compounds, accumulation of anthocyanins and carotenoids. Our main goal is to characterize the changes occurring in coffee fruit ripening, with the objective to improve the uniformity of fruit maturation, and consequently the quality of the coffee produced. We observed an increase of transcripts of ACC oxidase during the initial fruit ripening stages (green fruits), followed by an increase of PME at intermediate stages (green-red and red). PG activity was higher at the end of maturation (cherry and dark-cherry).

Key words: ripening, polygalacturonase, expansin, pectinase, genome, *Coffea*

Introdução

Em plantios de café adensado, entre os fatores de manejo que merecem ser considerados é o aumento da desuniformidade de maturação dos frutos, ocasionando problemas na qualidade de bebida e menor eficiência na colheita. As alternativas tradicionais para resolver estes problemas - o emprego de colheita seletiva e uso de reguladores de crescimento - apresentam desvantagens de ordem agrônômica (queda de folhas e frutos, diminuição da qualidade da bebida) e econômica (aumento do custo de produção).

Sabe-se que a maturação é um evento geneticamente programado, caracterizado por inúmeros processos bioquímicos e fisiológicos que alteram cor, sabor, aroma e textura do fruto (Brandy, 1987). O processo final de maturação do café inicia-se com o aumento da atividade respiratória e com a síntese de etileno, acompanhado do metabolismo de açúcares e ácidos graxos, além do decréscimo da adstringência e síntese de compostos voláteis, como aldeídos, ésteres, cetonas e álcoois que caracterizam o aroma do fruto maduro (Carvalho e Chalfoun, 1985). Nesta fase da maturação também ocorre a degradação da clorofila e início da mudança de coloração da casca, que passa de verde à coloração vermelho – cereja ou amarela. Também ocorrem grandes modificações na parede celular vegetal, ocasionando maciez do mesmo,

deterioração do tecido e susceptibilidade a patógenos. Estas modificações são reguladas, em partes, através da expressão de genes que codificam para enzimas modificadoras da parede celular como, por exemplo, as expansinas, pectinametilesterases (PME), poligalacturonases (PG) (Fisher e Bennett, 1991).

As expansinas são proteínas da parede celular vegetal que induzem o relaxamento e extensão da parede em pH ácido, visto que é nesta condição que as células das plantas crescem mais rapidamente e a parede torna-se mais flexível (Cosgrove, 1998). As expansinas hidrolisam as ligações entre a hemicelulose e as microfibrilas de celulose, assim induzem o alongamento/extensão irreversível da parede celular e também o seu relaxamento, desempenham também importante papel nos processos de desenvolvimento da planta como na organogênese, germinação da semente, desenvolvimento do tubo polínico (Li et al; 2003). As pectinas, uma mistura de polissacarídeos ricos em ácidos galacturônicos, no decorrer da maturação são degradadas durante a solubilização e despolimerização da parede celular dos frutos. Duas das principais enzimas envolvidas neste processo são a pectinametilesterase (PME) e a poligalacturonase (PG). A PME catalisa a desmetilação dos ésteres metílicos dos ácidos poligalacturônicos. A atuação da PME ocorre temporalmente anterior a PG que é inibida pela presença dos radicais metil (Braverman, 1963). Após a atividade da PME a PG catalisa a hidrólise das ligações α -1,4, entre os resíduos de ácido poligalacturônico desmetilados (Konno et al, 1985). A PG também está envolvida em outros processos fisiológicos, onde ocorre a separação celular, como: abscisão e deiscência, germinação do pólen e formação do tubo polínico (Brown e Crouch, 1990; Taylor et al., 1990; Meakin e Roberts, 1991; Pressey, 1991). Durante a maturação ocorre também o alongamento, relaxamento e extensão da parede celular, devido à atuação de endo-1-4 β -glucanases, (Hayashi; Wong; Maclachlan, 1984) celulasas, e xyloglucanases (Fry et al., 1992). Atualmente, com a clonagem e a manipulação de genes envolvidos na maturação de frutos, torna-se possível retardar ou até mesmo inibir esse processo fisiológico, através da utilização de técnicas DNA antisense ou interferência de RNAi.

Portanto, tendo em vista a importância da uniformidade de maturação dos frutos para a qualidade de bebida, colheita e custo de produção do café, neste trabalho foram feitos estudos de expressão de genes que codificam para ACC oxidase, expansina, pectinametilesterase e poligalacturonases, através da análise “in silico” do banco de dados do Projeto Genoma Café, e experimentos de expressão dos genes e enzimas.

Material e Métodos

Com exceção da seqüência do gene de ACC oxidase os genes analisados foram baseados em *ESTs* provenientes do banco de dados do genoma café. As seqüências foram selecionadas e clusterizadas para formação de *contigs* com os programas BLAST (Altschul et al, 1990), BLASTX e BLAST P. Foram selecionados clusters ou *contigs* com genes expressos durante diferentes fases do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos. As seqüências obtidas foram blastadas com outras seqüências de aminoácido e nucleotídeos no NCBI, e também examinadas através do programa ClustalW (Thompson et. al, 1994). Após a análise das seqüências e *contigs* de interesse, oligonucleotídeos foram desenhados para análise da expressão via RT-PCR e /ou clonagem dos genes.

Análise da expressão do gene via RT – PCR e Northern blot

Frutos de *Coffea arabica* (IAPAR – 59) em diferentes estádios de maturação, além de outros tecidos foram utilizados para extração de RNA total de acordo com o protocolo de Chang, et al. (1993). Para análise via RT-PCR o cDNA foi sintetizado utilizando o kit ThermoScripttm RT-PCR System (Invitrogen). Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor PCR 2.1 – TOPO para o sequenciamento e comparação das seqüências com o banco de *ESTs* do Genoma Café. Para análise via Northern blot, 10 μ G de RNA de diferentes tecidos foram utilizados para hibridização em membrana com sondas marcadas com dCTP- α P32 de acordo com protocolo descrito por Ausubel et al. (1994).

Extração e quantificação de Poligalacturonase

Frutos de *Coffea arabica*, cultivar IAPAR-59, em diferentes estádios de maturação (verde, verde-amarelado, avermelhado, vermelho e cereja), foram coletados e armazenados em tubos hermeticamente fechados em freezer -80°C . Para a extração de proteínas dos frutos de café, oito gramas de fruto correspondente a cada um dos estádios de maturação foram macerados em nitrogênio líquido. O extrato enzimático da Poligalacturonase (PG) foi obtido através da metodologia descrita por Karakurt e Huber (2003). A atividade da PG foi determinada pela incubação do extrato enzimático com ácido poligalacturônico por duas horas a 34°C . Os açúcares redutores liberados após cessada a atividade enzimática foram dosados pelo método de Somogy, adaptado por Nelson (1994). Uma unidade de atividade de PG foi definida com a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 nmol de açúcar redutor por duas horas sob as condições de ensaio. A quantidade total de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976)

Resultados e discussão

Com o objetivo de identificar dentro do Projeto Genoma Café genes de expansinas e PGs, que estejam relacionados com a maturação de frutos, foram analisadas 153 seqüências para expansinas, 262 para PME e 130 para PG.

A clusterização das 153 seqüências de expansinas resultou na formação de 22 *contigs* e 14 *singlets*. Os 22 *contigs* tiveram suas seqüências analisadas e verificou-se a presença de alta homologia entre os mesmos, posteriormente foram selecionados três *contigs* de interesse denominados de: *Caexp1* (1283 pares de bases), *Caexp2* (1288 pb) e *Caexp3* (1587 pb), por apresentarem seqüências provindas de bibliotecas de frutos (FR). Cada um dos *contigs* também foi analisado

através do BLASTX (NCBI), o *Caexp1* demonstrou bom alinhamento com seqüências de α expansinas provenientes de *Populus tremula x Populus tremuloides*, *Cicer arietinum*, *Zinnia elegans*, *Prunus armeniaca*, *Sambucus nigra*, com identidade entre 75% e 79%. Para o *Caexp2* o melhor alinhamento verificado foi com seqüências de *Mangifera indica*, *Petunia x hybrida*, *Populus tremula x Populus tremuloides*, *Prunus cerasus*, com identidade entre 85% e 86%. E *CaExp3* demonstrou bom alinhamento para *Prunus armeniaca*, *Populus tremula x Populus tremuloides*, *Petunia x hybrida*, *Prunus cerasus*, com identidade entre 73% e 76%. Atualmente, estão sendo realizadas análises mais detalhadas de cada *contig* para posterior construção de primers e clonagem. Também estão sendo feitas análises para diferenciação das α e β expansinas encontradas no banco do genoma café.

Para o gene de PME, foi selecionado um *contig* contendo três seqüências, sendo duas de bibliotecas de frutos. Também foram selecionadas seqüências singlets que apresentaram alta similaridade com PMEs de frutos climatéricos. A partir das seqüências e *contigs* selecionados foi possível clonar um fragmento de 277 pb (*Capme1*) que apresentou alta similaridade a outras PMEs de frutos. Resultados tanto de RT-PCR como de Northern blot (Figura 1) demonstraram uma atividade de transcrição posterior à de ACC oxidase, e anterior a atividade tanto de transcritos como enzimática de PG aqui demonstrada (Figura 2 e 3). A atividade de PME também foi acentuada em ramos.

Para a PG a clusterização das 130 seqüências gerou 10 *contigs* de interesse, por apresentarem seqüências de bibliotecas de fruto. O *contig Capg1*, foi considerado o de maior interesse, por apresentar 3 seqüências num total de 5, provenientes de bibliotecas de fruto FR1 (frutos estágio 1 e 2). Verificou-se que o *Capg1* é similar às seqüências de poligalacturonase de diferentes organismos como: *Lycopersicon esculentum*, *Pyrus communis*, *Arabidopsis thaliana*. A partir destes resultados foram sintetizados oligonucleotídeos para clonagem do gene e estudos de expressão via RT-PCR. Foi observada uma presença maior de transcritos de *CaPg1* em frutos vermelho quando comparada aos transcritos de frutos verde (Figura 2). O padrão de transcrição em folhas é similar ao de frutos verde, indicando um background “constitutivo” de PG. Também foi observado uma grande atividade de transcritos de PG em ramos, similar à encontrada no Northern Blot de PME, seguidos por menor intensidade em raízes, botões florais e flores.

Na quantificação da atividade enzimática da PG nos frutos em diferentes estádios de maturação (Figura 3) verificou-se inicialmente a baixa atividade enzimática no fruto verde. A partir do início da maturação (fruto verde-avermelhado) verifica-se aumento contínuo da atividade da PG, que continua até atingir seu ponto ideal de maturação (fruto cereja), e começar o processo de senescência na planta. Frutos passados do ponto de colheita também apresentam alta atividade enzimática da PG (dados não apresentados). Nos frutos verdes a baixa atividade enzimática era esperada, pois os compostos pécicos ainda se encontram na forma metilada. A alta atividade da PG nos frutos cereja deve-se a presença de maiores quantidades de pectinas desmetiladas pela ação da PME, visto que, de acordo com Braverman (1963), a presença de grupos metílicos nos ácidos poligalacturônicos, que formam as pectinas por meio de ligações glicosídicas, atuam como inibidores da atividade da PG.

As análises de expressão feitas com Northern blot e RT-PCR apresentaram uma seqüência temporal quanto a detecção de transcritos dos genes analisados (Figura 1 e 2). Inicialmente houve uma forte indução da expressão de ACC oxidase nos estádios intermediários de maturação comparada com os frutos verdes. Em frutos cereja, observa-se uma diminuição da expressão em relação ao estágio anterior. A expressão de PME inicia-se um pouco depois e com menor intensidade que a ACC oxidase, com um incremento nos frutos vermelhos. Os dados preliminares da análise de PG por RT-PCR demonstram uma quantidade menor de números de transcritos em frutos verdes comparadas com frutos vermelhos, devendo se comportar também seqüencialmente após a atividade da PME.

Após a análise dos genes de expansina e a verificação da expressão dos genes escolhidos em diferentes tecidos de café, daremos início a escolha de genes com expressão específica em frutos. Estes genes deverão ser utilizados tanto na busca de promotores específicos, assim como para estudos de transformação genética em vetores de RNAi, visando o desenvolvimento de tecnologias que permitam uma maior uniformidade dos frutos na época de colheita.

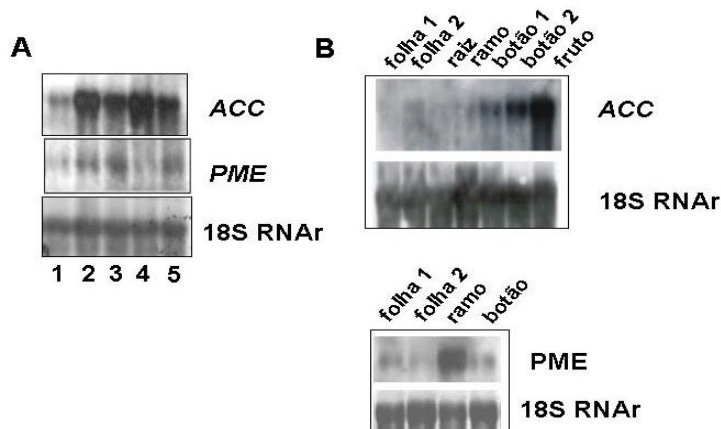


Figura 1. Análise de Northern blot de RNA de diferentes tecidos de café hibridizados com *Caaco1* (Pereira et al. 2005) e *Capme1*. A) RNA total de frutos de café em diferentes estádios de maturação: 1) verde; 2) verde-

avermelhado; 3) avermelhado e 4) vermelho e 5) cereja. B) RNA total de diferentes tecidos: folhas 1 e 2 foram coletadas com 5 e 12 cm de comprimento; botões florais 1 e 2 foram coletados com 8 e 15 mm respectivamente.

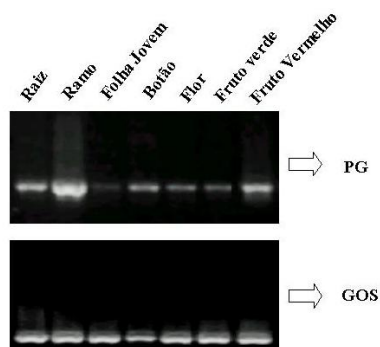


Figura 2. Análise de expressão de genes de PG via RT-PCR. cDNA de diferentes tecidos foram utilizados para amplificação com oligonucleotídeos para *Capgl*. Amplificação do gene *GOS* (Gaborit et al. 2003) foi utilizado para padronização das concentrações de cDNA.

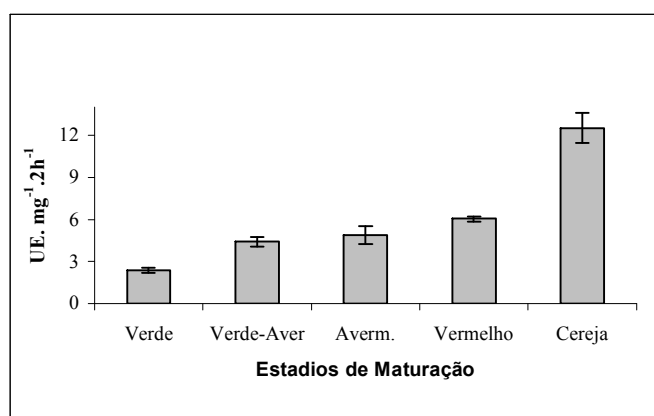


Figura 3. Atividade da Poligalacturonase (PG) nos frutos verde (VE), verde-avermelhado (VA), avermelhado (AV), vermelho (VM) e cereja (CE). Uma unidade de atividade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 nmol de açúcar redutor por duas horas sob as condições de ensaio. Barra representa o desvio padrão (n=6).

Referências bibliográficas

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1994). Current protocols in molecular biology. New York. *John Wiley & Sons*.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72:248-254.
- Brandy, C.J. (1987). Fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol.* 38:155-179.

- Braverman, J.B.S. (1963). *Introduction to the Biochemistry of food*. Elsevier Publ. Amsterdam. 336p
- Brown, S.M.; Crouch, M.L. (1990). Characterization of a gene family abundantly expressed in pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell*. 2:263-274.
- Carvalho, V.D.; Chalfoun, S.M.; Chagas, S.J. de R. (1989). Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico-química, química e microflorado grão beneficiado. In: *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeiras, 15*, Maringá. Resumos... Rio de Janeiro: MIC/IBC. pp.25-26.
- Chang, S.; Puryear J.; Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol*. 11:113 -116.
- Cosgrove, D.J. (1998). Cell wall loosening by Expansins. *Plant Physiol*. 118: 333-339.
- Fischer, R.L.; Bennett, A.B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 42:675-703.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K., and Matthews, K.J. (1992). Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J*. 282: 821-828.
- Gaborit, C.; Caillet, V.; Deshayes, A.; Marraccini, P. (2003). Molecular cloning of a full-length cDNA and gene from *Coffea arabica* encoding a protein homologous to the yeast translation initiation factor SU11: expression analysis in plant organs. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 15:
- Hayashi, T.; Wong, Y.S. (1984). Maclachlan, G. Pea xyloglucan e cellulose. II. Hydrolysis by pea endo -1,4 - β - glucanase. *Plant Physiol*. 75: 605-610.
- Karakurt, Y.; Huber, D.J.; (2003). Activities of several membrane and cell-wall hydrolases, ethylene biosynthetic enzymes, and cell wall polyuronide degradation during low-temperature storage of intact and fresh-cut papaya (*Carica papaya*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 28:219-229.
- Konno, H.; Yamasaki, Y.; Katoh, K. (1983). Degradation of pectic polysaccharides extracted from suspension cultures of carrot by purified exo-polygalacturonase. *Plant Physiology, Washington*. 61:20-26.
- Li, Y.L.; Jones, S.J.; Mc Queen-Manson. (2003). Expansins and cell growth. *Plant Biol*. 6: 603-610.
- Meakin, P.J.; Roberts, J.A. (1991). Anatomical and biochemical changes associated with the introduction of oilseed rape pod dehiscence. *Ann Bot*. 63:193-197.
- Nelson, N.A. (1994) A photometric adaptation of the somogy method for the determination of glucose. *Journal of Biology Chemistry*, Baltimore. 153:375-380.
- Pressey, R. (1991). Polygalacturonase in tree pollens. *Phytochemistry*. 30:1753-1755.
- Taylor, J.E.; Taylor, J.E.; Tucker, G.A.; Lasslett, Y.; Smith, C.J.S.; Arnold, C.M.; Watson, C.F.; Schuch, W.; Grierson, D.; Roberts, J.A. (1990) Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic plants. *Planta*. 183:133-138.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucl. Acid. Res*. 22:4673-4680.