

## EXPRESSÃO GÊNICA DA ENDO-BETA-MANANASE EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE CAFÉ

Flávia Carvalho Santos – pós-doutoranda UFLA; Stela Dellyzette Veiga Franco da Rosa - pesquisadora Embrapa Café/UFLA; Édila Vilela de Resende Von Pinho - Prof. UFLA., Apoio da EMBRAPA, CAPES, CNPq e Fapemig

Algumas enzimas são consideradas essenciais no processo de germinação de sementes. Em sementes de café a germinação é limitada pelo endosperma, necessitando do amolecimento deste na região micropilar ou endosperma *cap*, para que ocorra a emergência da radícula. De acordo com estes autores o processo de amolecimento é desempenhado por várias enzimas, principalmente, a endo- $\beta$ -mananase, que está presente no endosperma das sementes desta espécie, localizada na região próxima à radícula. Desta forma, o amolecimento é considerado uma consequência da atividade das enzimas, as quais hidrolisam a parede celular, processo este muito investigado em sementes de tomate, café e alface. Este amolecimento do endosperma correlaciona-se com o aumento da atividade da enzima endo- $\beta$ -1,4-mananase.

Diante do exposto, foi proposto nessa pesquisa quantificar a expressão do gene endo- $\beta$ -mananase (MAN) durante o desenvolvimento de sementes de cafeeiro. Frutos de café da cultivar Rubi foram colhidos no campo experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA) nos estádios de desenvolvimento verde, verde-cana, cereja, passa e seco. Os frutos foram colhidos dos ramos médios das plantas e nas partes medianas dos ramos. Após a colheita, os frutos em cada estádio foram selecionados para uniformização do estádio de maturação, considerando escala fenológica proposta por Pezzopane et al. (2003), e os frutos de cada estádio foram submetidos à determinação do teor de água pelo método da estufa ( $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 24 horas) (Brasil, 2009).

As sementes foram isoladas dos frutos manualmente com o uso de estiletes e os materiais vegetais extraídos foram: embriões, endospermas e sementes intactas. Após a extração dos materiais vegetais, estes foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *deep freezer* a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para a extração de RNA foi utilizado o reagente *Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen)* de acordo com o manual do reagente. A quantidade e qualidade do RNA total foram avaliadas utilizando espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare Life Sciences). O RNA íntegro foi tratado com *DNAseI RNase Free (Ambion)*. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *HighCapacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. O cDNA foi utilizados como *template* para a análise da expressão gênica quantitativa através ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*) pelo sistema de detecção SYBR Green.

Após determinar a diluição 1:5 e a eficiência dos *primers* entre 94% a 97%, foi realizado o ensaio da expressão relativa, através do método  $C_T$  comparativo. Todas as amostras foram realizadas com três repetições, incluindo controles negativos e endógenos. Os dados foram analisados no *software* v. 2.0.1, do sistema 7500 de PCR em tempo real (*Applied Biosystems*) no Laboratório Central de Análise de Sementes/Fitotecnia/UFLA.

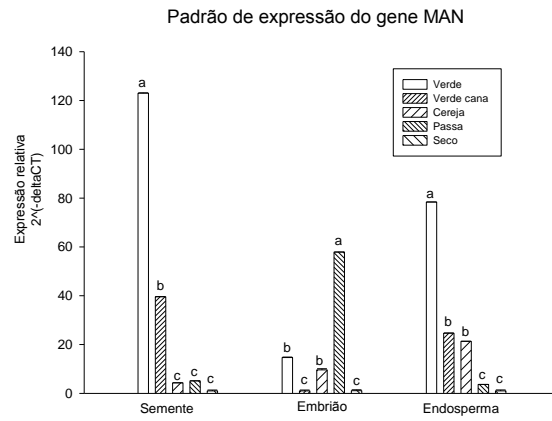
Para cálculo da expressão, primeiramente cada amostra foi normalizada com os controles endógenos 14-3-3 e ubiquitina, utilizando a equação  $\Delta C_T = C_T(\text{gene alvo}) - C_T(14-3-3 + \text{ubiquitina})/2$  e a quantificação relativa foi obtida pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . A linha de corte (*Threshold*) foi definida automaticamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $5 \times 3$ , sendo cinco estádios de maturação dos frutos (verde, verde-cana, cereja, passa e seco) e três partes da semente (embrião endosperma e semente inteira). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Scott Knot a 5% de probabilidade.

### Resultados e conclusões

A análise do transcrito MAN (Figura 1), revelou mudança no pico tanto na distribuição nas partes da semente quanto no desenvolvimento. Observa-se um pico de transcrição nas sementes no estádio verde, na semente inteira e no endosperma, e um pico no estádio “passa”, avaliado no embrião. Segundo Silva (2002) a atividade da endo- $\beta$ -mananase ocorre inicialmente no endosperma “cap” e apenas mais tarde no resto do endosperma. É importante salientar que as sementes não foram pré-embebidas. Várias pesquisas tem mostrado presença da endo- $\beta$ -mannase durante a germinação de sementes, onde estas foram pré-embebidas e realizadas no estádio cereja.

Observa-se, de maneira geral, que com o avanço dos estádios de desenvolvimento há uma redução do transcrito da enzima endo- $\beta$ -mannase, isso significa que há um aumento acúmulo de reserva, ou seja, mannanas. Acredita-se que uma das funções da manana é aumento da dureza do endosperma.

Quanto ao pico de transcritos no estádio “passa”, no embrião, entende-se que há transcrição de endo- $\beta$ -mannase antes de submeter as sementes à embebição. Sabe-se que os níveis de atividade de endo- $\beta$ -mananase e de  $\beta$ -manosidase no resto do endosperma e no embrião, antes da protrusão da radícula, é baixo.



Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% pelo teste de Skott Knot

**Figura 1:** Quantificação da expressão do gene MAN nas sementes de café, nos estádios verde, verde cana, cereja, passa e seco em diferentes partes das sementes (semente inteira, embrião e endosperma).