

PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE POLIFENOLOXIDASE DURANTE A MATURAÇÃO DE SEMENTES DE CAFÉ

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

A qualidade da semente é determinada geneticamente, e a expressão de genes durante a floração, desenvolvimento e maturação é influenciada por fatores relacionados ao meio ambiente, secagem, processamento pós-colheita e no armazenamento. Essa ação do meio determina alterações, fisiológicas, bioquímicas e físicas nas sementes, que de maneira semelhante contribui para definir a qualidade das mudas. Sabe-se que a caracterização de perfis de expressão de genes durante alterações fenológicas que ocorrem durante o desenvolvimento das sementes poderia permitir a identificação dos principais genes relacionados com a qualidade.

Diante do exposto, foi proposto nessa pesquisa quantificar a expressão da polifenoloxidase durante o desenvolvimento de sementes de café. 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 estágio foram selecionados para uniformização do estágio de maturação, considerando escala fenológica proposta por Pezzopane et al. (2003), e os frutos de cada estágio foram submetidos à determinação do teor de água pelo método da estufa a 105 °C, por 24 horas.

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°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 utilizado como *template* para a análise da expressão gênica quantitativa através ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*) pelo sistema de detecção SYBR Green.

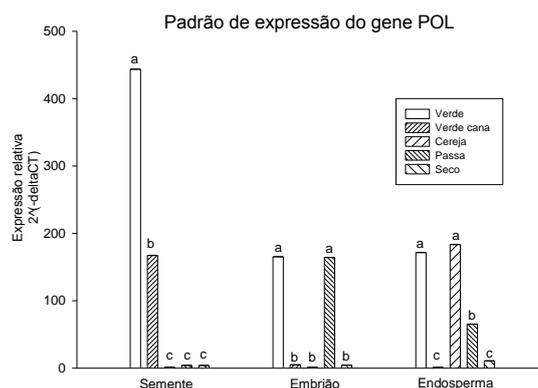
Após determinar a diluição 1:5 e a eficiência dos *primers* entre 94% a 97%, foi realizado o ensaio da expressão relativa, através do método C_T comparativo. Todas as amostras foram realizadas com três repetições, incluindo controles negativos e endógenos. Os dados foram analisados no *software* v. 2.0.1, do sistema 7500 de PCR em tempo real (*Applied Biosystems*) no Laboratório Central de 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 5x3, 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

Na Figura 1, observa-se um pico de expressão do transcrito POL1 no estágio inicial de desenvolvimento e posteriormente um pico nos estádios intermediários (cereja e passa) quando avaliados no embrião e endosperma. Há relatos na literatura da alta atividade da POL1 no desenvolvimento do endosperma. A polifenoloxidase é uma enzima que está relacionada com o escurecimento enzimático de frutos e vegetais e, também, com a qualidade da bebida em café. Esta enzima foi detectada em várias partes do fruto de café e se encontra ligado às membranas celulares. No entanto, quando estas membranas sofrem danos, liberam as polifenoloxidasas que são ativadas, podendo reagir com substratos fenólicos intra e extracelulares, oxidando-os a quinonas (Amorim, 1978). A redução na atividade polifenoloxidase está relacionada à integridade de membranas, onde há comprometimento da estrutura celular, pela alteração nas membranas. Essa enzima, que é exclusiva de plastídeos, entra em contato com os compostos fenólicos, armazenados no vacúolo. Assim, durante o processamento haveria a oxidação de fenóis, que convertidos à quinonas, reagem com as proteínas.

Como foi observado anteriormente, houve alta expressão dos transcritos POL1 no fruto verde nas três partes da semente analisada. No estágio verde, há grande quantidade de água e alta atividade metabólica e respiratória, sendo assim, supomos que haverá uma alta atividade da POL1, pela manipulação do material vegetal.



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 POL1 nas sementes de café nos estádios verde, verde cana, cereja, passa e seco em diferentes partes das sementes (semente inteira, embrião e endosperma).

Adriano Delly Veiga - Pós-doutorando DAG/UFLA; Cristiane Carvalho Pereira - Agronomia UFLA; Gabriel Machado de Figueiredo - Agronomia UFLA, Gabriel Machado de Figueiredo - Agronomia/UFLA. Apoio da EMBRAPA, CAPES, CNPQ e FAPEMIG

A utilização da irrigação vem se expandindo entre os cafeicultores brasileiros, seja em regiões de escassez de chuvas, para viabilizar a implantação da lavoura e garantir a produção, ou mesmo em regiões com pouca deficiência hídrica, para a obtenção de produtividades em índices mais elevados. Com o aumento do uso da irrigação nas lavouras cafeeiras tem sido observado um acréscimo no registro de deficiências nutricionais nessas lavouras, mesmo em situações em que se constata o uso de doses de adubação um pouco acima do recomendado.

Sabe-se que a disponibilidade de água e a nutrição mineral constituem-se em fatores vitais durante alguns períodos fenológicos do cafeeiro, podendo interferir na produtividade da cultura, na composição química dos grãos, podendo também, afetar a qualidade física e fisiológica das sementes.

Um dos aspectos mais importantes da irrigação é a reposição da água ao solo em quantidade adequada e na ocasião oportuna. O excesso de irrigação geralmente reduz a produtividade e a qualidade da produção, podendo provocar o crescimento excessivo da planta, o retardamento da maturação dos frutos, a lixiviação de nutrientes solúveis (principalmente nitrogênio), queda de flores, maior ocorrência de doenças de solo e distúrbios fisiológicos, maiores gastos com energia e o desgaste do sistema de irrigação.

Estudos têm demonstrado que o metabolismo de carboidratos é muito sensível às alterações no status hídrico das plantas, sendo que o acúmulo de assimilados é afetado pela disponibilidade de água e de nutrientes, dentre outros fatores. Dentro deste contexto, este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de estudar os efeitos da fertirrigação na qualidade física e fisiológica de sementes de café.

O experimento foi conduzido em área de pesquisa da Universidade Federal de Lavras, com espécie arábica, cultivar Topázio, submetido aos tratamentos culturais conforme a necessidade, mantendo-se a lavoura livre de plantas daninhas. O sistema de irrigação por gotejamento era dotado de controle simultâneo da aplicação dos fertilizantes sendo a umidade do solo indiretamente monitorada por tensiômetros. Além do sistema tradicional (sem irrigação e adubado quatro vezes por ano durante o período das águas), foram estudadas cinco doses de adubação, 70, 100, 130, 160 e 190% do recomendado, para o cafeeiro fertirrigado por um sistema de gotejamento e dois parcelamentos, doze e quatro aplicações por ano, totalizando onze tratamentos.

Para a avaliação da qualidade das sementes produzidas nessa lavoura, após a colheita dos frutos em julho/2011, no estágio cereja, estes foram despulpados e desmucilados por submersão em água, durante 24 horas, e lavados em água corrente. Após a secagem as sementes sem pergaminho foram submetidas às análises de avaliação da qualidade fisiológica e vigor por meio da porcentagem da protusão radicular, das plântulas normais aos 30 dias e das folhas cotiledonares expandidas bem como da qualidade física pelo teste de retenção em peneiras. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizados com quatro repetições. Foi utilizado o teste de Scott Knott à 5% de probabilidade para comparação dos tratamentos.

Resultados e conclusões

Pelos resultados da porcentagem de protusão radicular e plântulas normais aos 30 dias, os tratamentos não foram discrepantes, evidenciando que as diferentes doses e parcelamento das adubações utilizadas não afetaram a germinação das sementes. Por meio da avaliação das folhas cotiledonares expandidas, foi verificada diferença significativa no vigor. Para esta variável foi observado que os tratamentos de fertirrigação, de 160 e 190% do recomendado tiveram resultados superiores e não diferiram do sistema tradicional. Semelhantes resultados foram observados para a qualidade física pelo teste de retenção na peneira 16, sendo esta a peneira de maior retenção das sementes. Para o teste de retenção de peneiras foi observado maiores valores para tratamentos com doses mais altas e parceladas em quatro aplicações.