

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DA VIA BIOSINTÉTICA DO TETRAHIDROFOLATO EM ENDOSPERMA DE CAFÉ

RODRIGO L. T. LOPES¹; PAULA M. NOBILE²; GABRIELA M. QUITÉRIO³; BÁRBARA R. BAZZO⁴; CARLOS A. COLOMBO⁵

Nº 0800025

RESUMO

O presente estudo analisa o perfil transcricional de genes associados à via biossintética do tetrahidrofolato (vitamina B) nas variedades Obatã e Catuaí de *Coffea arabica* de duas localidades e em diferentes fases de maturação, visando determinar as etapas fundamentais para a acumulação de folatos e melhoria da qualidade da bebida. Utilizando a técnica de PCR em tempo real, foi analisada a expressão de genes relacionados à bioacumulação de folatos, tendo sido observado diferença de expressão entre os genótipos, estádios de maturação e localidades.

ABSTRACT

This study examines the transcriptional profile of genes associated with the biosynthesis of tetrahydrofolate (vitamin B) in Catuaí and Obatã varieties of *Coffea arabica* in two places and at different stages of fruit maturation to determine the critical steps to the accumulation of folate. Using the technique of real-time PCR, was considered the expression of genes related to bioaccumulation of folate and has been observed difference between the genotypes, stages of maturity and localities.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café, englobando de 20 a 35% da produção e exportação (EMBRAPA, 2007) e o principal exportador de café verde do mercado internacional (SILVA, 2004).

¹ BOLSISTA CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, UNIARARAS, Araras-SP, ✉ lorencettitunes@gmail.com

² CO-ORIENTADOR: Pós-doutoranda, Centro de pesquisa e desenvolvimento de recursos genéticos e vegetais - IAC, Campinas-SP

³ COLABORADOR: Graduação, UNIARARAS

⁴ COLABORADOR: Graduação, PUCC

⁵ ORIENTADOR: Pesquisador, Centro de pesquisa e desenvolvimento de recursos genéticos e vegetais - IAC, Campinas-SP

A qualidade da bebida é um aspecto cada vez mais relevante na medida em que agrega valor substancial ao produto. Um dos principais fatores que contribuem para a qualidade do café está relacionado à constituição química presente nas sementes, como a cafeína e os ácidos clorogênicos (CLIFFORD, 1985; ASHIHARA *et al.*, 2001).

Uma das maneiras para aprimorar a qualidade da bebida é agregar valores nutracêuticos à mesma, podendo valorizar o produto no comércio externo e ao mesmo tempo, auxiliar para a melhoria da alimentação da população consumidora de café. O ácido fólico (vitamina B9) e seus derivados (juntos denominados folatos) não só aparecem como um problema nutricional de países pobres, como também é um problema epidemiológico em países ricos.

O Projeto Brasileiro do Genoma Café (PBGC) possibilitou a identificação de genes com potencial utilização de marcadores em programas de seleção assistida; neste sentido, foi realizada a prospecção de genes da biossíntese do tetrahydrofolato *in silico* presentes na base de dados do PBGC.

Assim sendo, o presente projeto analisa o perfil transcricional de genes associados à via biossintética do tetrahydrofolato (vitamina B) nas variedades Obatã e Catuaí de *Coffea arabica* de duas localidades (Adamantina-SP e Ouro Fino-MG) em diferentes fases de maturação, visando determinar as etapas fundamentais para a acumulação de folatos e melhoria da qualidade da bebida.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal. Os frutos foram coletados de duas variedades de *Coffea arabica* (Obatã e Catuaí) cultivados em condições de campo de duas localidades diferentes, Adamantina-SP (Janeiro e Abril) e Ouro Fino-MG (Fevereiro, Março, Julho, Agosto e Setembro) no ano de 2007. A última coleta foi realizada com o propósito de coletar o fruto no estágio cereja mais maduro para análise comparativa com o fruto cereja de Adamantina (AD), cujo desenvolvimento foi precoce em relação a Ouro Fino (OF). As coletas foram realizadas em tempos distintos para obtenção de frutos em diferentes estádios de maturação. Posteriormente foi realizada a dissecação do material vegetal, separando os tecidos do fruto do café, porém somente o endosperma foi utilizado para extração do RNA total.

Extração de RNA. Foi utilizado para extração do RNA total TRIzol® (Invitrogen), de acordo com o protocolo adaptado para plantas (MONTE e SOMERVILLE, 2001). A qualidade de todos os RNAs foi verificada em corrida eletroforética em gel de agarose 1%, corado com

brometo de etídeo. Em seguida realizou-se a quantificação dos mesmos utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda 260-280 nm.

Desenho de primers. As seqüências das cinco famílias gênicas selecionadas para o desenho de primers foram encontradas no banco de dados PBGC (NOBILE *et al.*, 2007), sendo elas: ciclohifrolase I (GCHI), aminodeoxichorismate sintase (ADCS), hidroximetildihidropterina pirofosfoquinase-dihidropteroato sintase (HPPK-DHPS), formil-tetrahidrofolato sintetase (FTHFS) e o metileno-tetrahidrofolate reductase (MTHFR2). Os primers foram desenhados a partir do programa Primer Express (Applied Biosystems) e a análise de estruturas possíveis secundárias, foi feita pelo programa GeneRunner v. 3.05.

Síntese de cDNA. A partir de dois µg do RNA total de cada amostra, tratado com DNase, foi sintetizado o cDNA, utilizando a Superscript II First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen) de acordo com a recomendação do fabricante.

Teste de primers. O teste foi feito por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com prata. As reações foram realizadas em termocicladores PT-100 (MJ Research, Inc.) de acordo com a seguinte programação: 94°C por 10 minutos, seguidos de 38 ciclagens (94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos) e finalizando em 72°C por 15 minutos.

Reação da PCR em tempo real. As reações da PCR-RT foram preparadas com SYBR® Green PCR Máster Mix (Applied Biosystems). Cada amostra foi processada em triplicata e em adição foi realizada uma reação sem cDNA (branco). As PCRs foram analisadas em ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelo programa LinReg, que possibilitou a criação de um valor específico de Ct (*Cycle threshold*), através de análise da curva de dissociação gerada pelo equipamento. A quantidade das moléculas alvos relativas ao calibrador, foi calculada a partir do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os genes constitutivos utilizados como controle endógeno foram GPDH, S19 (NOBILE *et al.*, 2007), RP139 e Ubiquitina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da expressão diferencial de três dos cinco genes selecionados para estudo de expressão em endosperma de café encontram-se resumidos na figura 1.

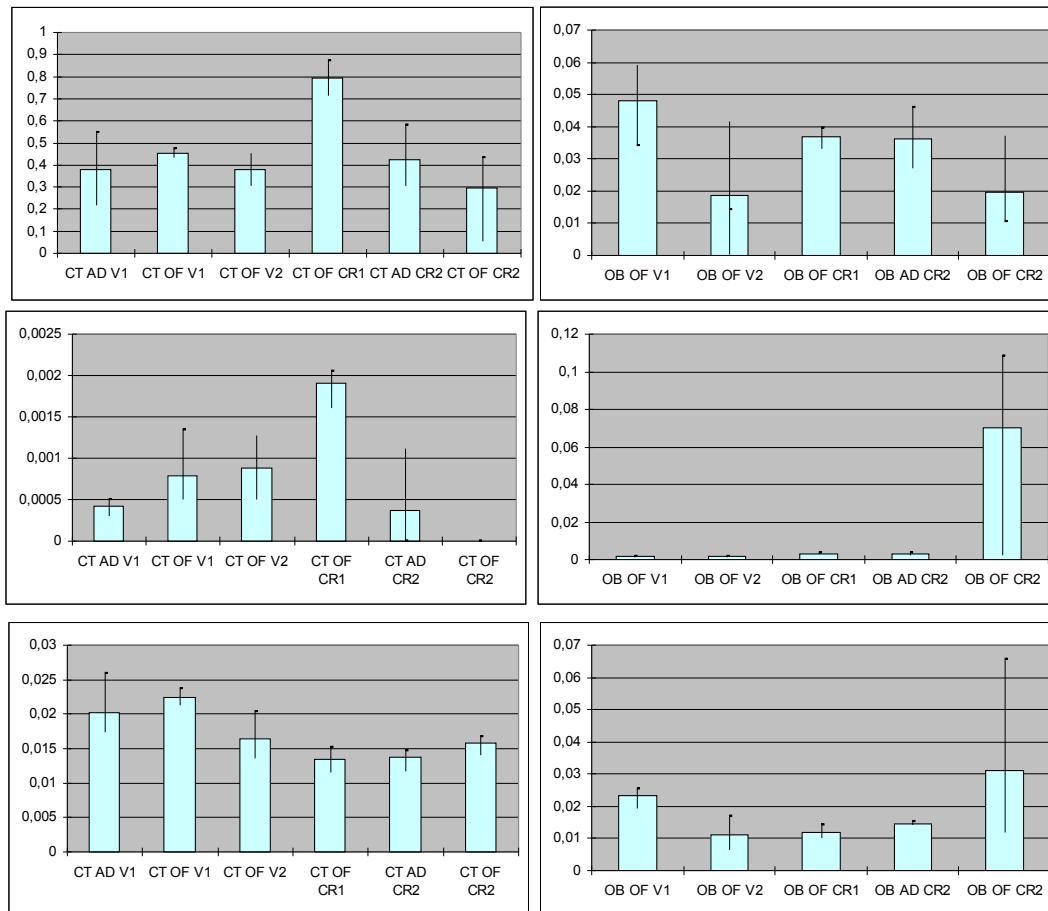


FIGURA 1. Análise de expressão diferencial nas variedades Catuaí e Obatã de *C. arabica* dos genes Tetrahydrofolato sintase (THFS) (A e B), Amino-4-desoxichorismato liase C2 (ADL) (C e D) e Hidroximetildihidropterina pirofosfoquinase (HPPK) (E e F), respectivamente.

Os valores de análise de expressão das figuras foram obtidos pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

OB – Obatã; **CT** – Catuaí; **OF** – Ouro Fino; **AD** – Adamantina. **V1** – grão verde com endosperma mole, **V2** – grão verde com endosperma quase duro, **CR1** – grão cereja coletado com um mês antes do estágio final de maturação, **CR2** – grão cereja em estágio final de maturação.

Portanto, para o gene THFS (Figuras 2-A e 2-B), nota-se maior diferença de expressão entre os estádios de maturação, sendo no Catuaí mais expresso no Cereja 1 e em Obatã, no estágio Verde 1. Para o gene ADL (Figuras 2-C e 2-D), nota-se uma grande diferença de expressão entre as variedades, sendo mais expresso nos primeiros estádios de maturação em Catuaí e no último estágio em Obatã. Por último, o gene HPPK (Figuras 2-E e 2-F) apresentou grande diferença de expressão entre os cultivares; sendo em todos os estádios

mais expresso na variedade Catuai; entre as localidades a maior diferença está no cultivar Obatã no estádio Cereja 2.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que, embora parciais, os dados revelam que o estádio de maturação, a variedade e as condições climáticas do local de coleta interferem na expressão dos genes analisados envolvidos na biossintética do Tetrahydrofolato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHIHARA, H; CROZIER, A. *Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science*. Trends Plant Sci, 2001. 6: 407-413.

CLIFFORD, M.N. *Chlorogenic acids*. Vol.1: London: In: Clarke RJ and Macrae R (Eds) Coffee, Chemistry, Elsevier Appl. Sci Publ., 1985. p.153-202

Exportação café.2007. disponível em :EMBRAPA,http://www21.sede.embrapa.br/a_embrapa/unidades_centrais/sge/publicacoes/tecnico/folderTextoDiscussao/TextoDiscussao20.pdf). Acesso em: 05/07/2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$* . Method. Methods 2001. p.402-408.

MONTE, D.; SOMERVILLE, S. *Isolation of RNA from plants tissue using Trizo*. In: DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual by David Bowtell and Joseph Sambrook 2001(Pag. 120-123).

NOBILE, P.M.; QUECINI, V.; COLOMBO, C.A.; SACCARDI, V.; MAZZAFERA, P. Análise in silico da via biossintética do tetrahydrofolato em Coffea. In SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2007. Águas de Lindóia-SP.

NOBILE, P.M.; YAMAMOTO, P.Y.; COLOMBO, C.A. Seleção de genes constitutivos para a normalização da PCR em tempo real em frutos de café. In: 4º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2007. São Lourenço-MG.

SILVA, V.O. *Perspectivas no mercado de café: perspectivas para o agribusiness em 2004 e 2005*. São Paulo: BM&F, 2004. 24p.