

DETERMINISMO GENÉTICO E MOLECULAR DO METABOLISMO DE DITERPENOS EM *Coffea* spp.

Ferreira Lucia P²; Dias Rafael Ce³; Durand Noel⁴; Guyot Bernard⁴; Ramos Juliana²; Perthuis B⁵; Sandrin-Garcia Paula²; Benassi Marta T³; Marraccini Pierre⁵; Pereira Luiz Fp⁶; Leroy Thierry⁵; Vieira Luiz Ge²; Pot David^{2,5}

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

² IAPAR (Instituto Agrônomico do Paraná) LBI-AMG CP 481 86001-970 Londrina (PR) Brasil

³ Universidade Estadual de Londrina – UEL, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Londrina, (PR) Brasil

⁴ CIRAD-UMR Qualisud, TA B-95/16, 73 rue JF Breton, 34398 Montpellier, France

⁵ Cirad, UMR DAP, Montpellier, F-34398 France

⁶ Embrapa Café – LBI/IAPAR CP 481 86001-970 Londrina (PR) Brasil

RESUMO: Cafestol e caveol são os dois principais diterpenos presentes nos frutos de café. Esses compostos específicos do cafeeiro têm se mostrado importantes na saúde humana, induzindo alterações no colesterol e ações anticancerígenas. Apesar da sua importância, há pouca informação sobre os princípios genéticos e moleculares de seu metabolismo. Análises fenotípicas através de HPLC, com cafés de diferentes espécies (vários genótipos por espécie), indicam uma variabilidade importante para cafestol, caveol e 16OMC. As análises *in silico* dos EST de *Coffea* permitiram identificar cDNAs parciais correspondente a um gene de CPS, dois de KO e um de KS. Análises de expressão desses genes por RTq-PCR quantitativa, em tecidos separados durante o desenvolvimento dos frutos, estão em andamento. Resultados preliminares indicam que os quatro genes alvos apresentam expressão diferencial durante o desenvolvimento dos tecidos do fruto. Os resultados de expressão serão discutidos considerando o interesse na identificação dos genes potencialmente envolvidos na regulação da concentração de cafestol e caveol.

Palavras-Chave: Lipídeos, diterpenos, caveol, cafestol, qualidade.

GENETIC AND MOLECULAR DETERMINISM OF DITERPENS METABOLISM IN *Coffea* spp.

ABSTRACT: Cafestol and kahweol are the two main diterpenes present in coffee beans. The health effects of these coffee specific compounds such as cholesterol raising or anticarcinogenic actions have been reported. Despite their importance, little information is available on the genetic and molecular bases of their metabolism. Phenotypic analyses through HPLC of coffee beans from different species (with several genotypes per species) pointed out a significant variability for cafestol, kahweol and 16OMC. *In-silico* analysis of *Coffea* EST allowed the identification of partial cDNA corresponding to one gene for CPS, two for KO and one for KS. Expression analysis of these genes during fruit development by RTq-PCR is ongoing. Preliminary results indicate that the four target genes present differential expression in developing fruit tissues. Expression results will be discussed regarding their interest towards the identification of the genes potentially involved in the regulation of cafestol/kahweol concentration.

Key words: Lipids, diterpens, kahweol, cafestol, quality

INTRODUÇÃO

Os lipídeos de café desempenham papel importante na qualidade da bebida e do aroma, principalmente devido à hidrólise de triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos que são em seguida oxidados (Fourney et al., 1982; Speer et al., 1993). Eles têm um uso comercial importante, pois são largamente empregados para a aromatização de café solúvel (Clarke, 1985). Dentro da fração lipídica, alguns compostos são específicos do gênero *Coffea*: o cafestol e o caveol, que pertencem à classe dos diterpenos se destacam não somente por razão de seus efeitos hipotéticos na qualidade da bebida, mas principalmente devido às suas consequências na saúde humana. Por exemplo, o uso do óleo de grão de café como um filtro solar foi patenteado (Grollier e Plessis, 1988) e propriedades anti-inflamatórias, são atribuídas aos diterpenos (Bertholet 1987, 1988). Além disso, vários estudos para analisar a influência dos diterpenos do café na saúde humana têm sido realizados, mostrando efeitos tanto no nível de colesterol no sangue e como quimioprotetor contra toxinas com ação carcinogênica. As funções de quimioproteção desempenhadas pelo cafestol e caveol em grãos verdes e torrados de café conduziram a buscas de algumas patentes que tratam destes diterpenos. Apesar dessa importância, os lipídeos de café têm sido muito pouco estudados, sendo que nenhum trabalho conclusivo foi ainda realizado para testar a possível implicação dos lipídeos na qualidade de bebidas.

As espécies de *Coffea* são as únicas capazes de sintetizar diterpenos como o cafestol, o caveol e compostos derivados (caveol, 16-O-metilcafestol, 16-O-metilcaveol), mas, até o momento, não há nenhum relato sobre os genes envolvidos no metabolismo de diterpenos do café.

Através do Projeto Genoma Café, que consistiu no seqüenciamento em larga escala de genes expressos (ESTs) de café para buscar novos conhecimentos sobre as bases genéticas e moleculares de características agrônomicas importantes no cafeeiro (Vieira et al., 2006), muitos genes poderão ser identificados e corretamente caracterizados. O fato que as seqüências de ESTs de café estão agora disponíveis abre novos caminhos para a identificação dos principais genes que controlam as vias biológicas importantes, como as implicadas na biossíntese dos diterpenos.

Assim, os objetivos desse estudo foram: 1) avaliar a diversidade inter e intraespecífica entre algumas espécies do gênero *Coffea*, para cafestol, caveol e 16-O-methyl cafestol (16OMC); 2) analisar os modelos de acúmulo/degradação de cafestol e caveol durante o desenvolvimento do fruto; 3) estudar a expressão de quatro genes envolvidos nos passos iniciais da biossíntese de diterpenos (copalil difosfato sintase – CPS, kaurene oxidase – KO e kaurene sintase – KS), durante o desenvolvimento do fruto.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma metodologia de HPLC de fase reversa (Dias et al., submetido) foi desenvolvida para quantificação simultânea de caveol e cafestol nos diferentes tecidos de frutos e folhas. Para cada tecido analisado foram feitas duas extrações independentes para os diterpenos.

Inicialmente, as concentrações de cafestol e caveol foram analisadas nos grãos verdes de diferentes espécies de *Coffea* (*C. arabica*, *C. canephora*, *C. congensis*, *C. sessiliflora*, *C. liberica* var *liberica* e *C. liberica* var *dewevrei*). Três genótipos diferentes foram analisados (somente uma planta por genótipo) para cada espécie. Posteriormente, a diversidade intra-específica foi analisada para as espécies *C. canephora* e *C. arabica*, sendo que para cada espécie três repetições clonais de três genótipos foram analisados.

O acúmulo/degradação dos diterpenos específicos do café foram analisados ao longo do desenvolvimento do fruto, dentro dos diferentes tecidos (perisperma, endosperma e pericarpo) de três árvores de *C. arabica* cv. Iapar 59 (plantas 1, 2 e 3) e em três de *C. canephora* cv. RL R2 4-I-6 (G21, G33 e G34), ambas na safra 2005-2006.

ESTs dos genes que codificam para as proteínas envolvidas nos primeiros passos da via de biossíntese específica dos diterpenos (CPS, KO e KS) foram identificados nos bancos de dados EST de *Coffea* spp., através de buscas por palavras chaves e/ou seqüências heterólogas. Baseado nas seqüências parciais obtidas, foram desenhados *primers* específicos para cada gene.

Os níveis de expressão transcricional dos genes CPS, KO, e KS entre tecidos e durante o desenvolvimento do fruto foram avaliados nas mesmas plantas de *C. arabica* que foram usadas para analisar a evolução das concentrações de diterpenos. Foram realizadas extrações de RNA, utilizando o método Trizol® (Invitrogen), com algumas modificações. Os RNAs extraídos foram passados em uma coluna de purificação (RNeasy MinEluate Cleanup - QIAGEN) para que pudessem ser usados para as análises por RTq-PCR. Entre os cinco genes ‘housekeepings’ testados para a normalização dos sinais de expressão (Actin2, GAPDH1, Cyclohylin1, ADP1, Cathepsin1), Actina2 e Cathepsin1 foram selecionados como normalizadores de acordo com os resultados obtidos usando o programa GeNorm (Vandesompele et al., 2002). O programa Qbase (<http://medgen.ugent.be/qbase>) foi utilizado para analisar resultados de RTqPCR. Os *primers* desenhados para CPS, KO-1, KO-2 e KS, que apresentaram boa eficiência, foram usados para caracterizar a expressão destes genes durante o desenvolvimento do grão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise da variabilidade fenotípica das concentrações de diterpenos específicos do cafeeiro aos níveis intra e interespecíficos

Em resultados anteriores, análises fenotípicas da composição em diterpenos entre diferentes espécies de *Coffea* (com vários genótipos para cada espécie) mostraram que existe uma variabilidade significativa dentro do gênero *Coffea* (Pot et al 2008). Esses dados validaram os resultados de De Roos et al. (1997). Além disso, análises de três genótipos de *Coffea canephora* demonstraram que existe uma variabilidade genética dentro dessa espécie (três plantas foram analisadas para cada genótipo) (Pot et al 2008).

Nesse estudo, 13 genótipos de *Coffea arabica*, representativos da diversidade molecular dessa espécie, foram analisados (Anthony et al 2001). Para cada genótipo três repetições clonais foram analisadas para a safra (2007-2008). Os resultados sugerem que existe uma variabilidade significativa das concentrações em cafestol/caveol entre os genótipos de *Coffea arabica* (Fig 1). Os coeficiente de variação observados para caveol e cafestol alcançam 37.5 e 39.1 % respectivamente entre os genótipos.

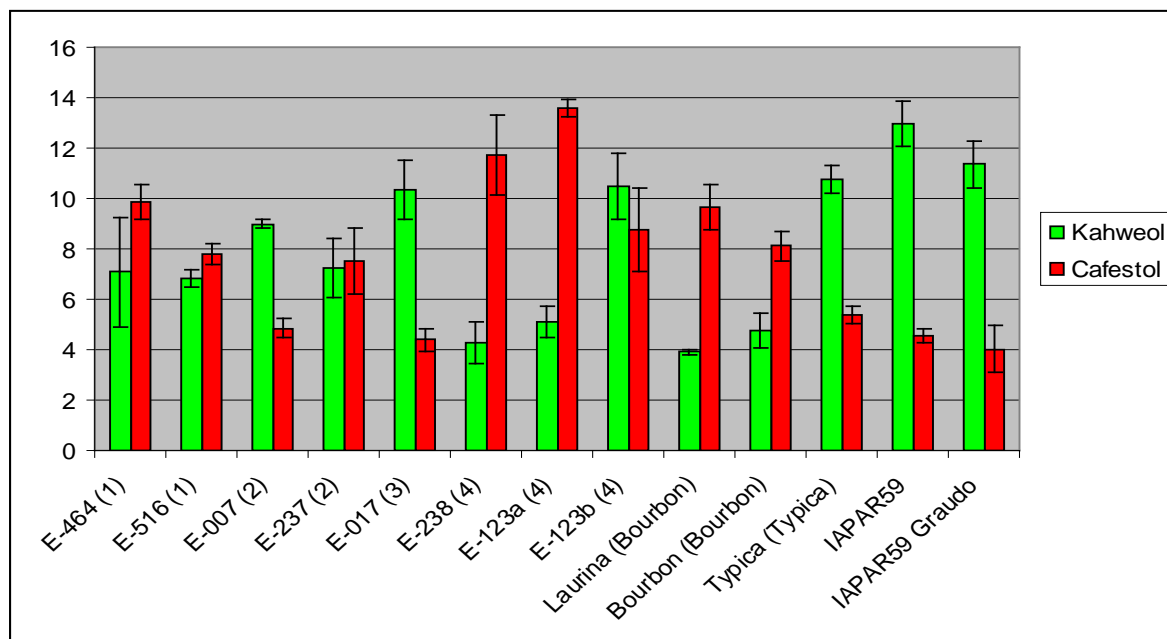


Figura 1 – Concentrações de caveol e cafestol nos grãos secos de 13 genótipos de *Coffea arabica*. Para cada genótipo, três plantas foram analisadas. Entre parênteses os grupos de diversidade identificados por Anthony et al 2001 são indicados para cada genótipo. Os genótipos IAPAR59 e IAPAR59 graúdo são genótipos do tipo Sarchimor que foram obtidos à partir de cruzamentos entre genótipos do tipo Vila Sarchi e o híbrido de timor e consequentemente eles não são genótipos de *Coffea arabica* puros. Os desvios padrões (variabilidade entre plantas do mesmo genótipo) são indicadas pelas linhas verticais.

2. Evolução da concentração de diterpenos durante o desenvolvimento do fruto

Como demonstrado anteriormente, existe uma variabilidade genética (inter e intra espécies) no gênero *Coffea*, é possível orientar os programas de seleção para obter genótipos com um teor otimizado de diterpenos. No entanto, mais informações são necessárias para obter um entendimento melhor da biossíntese do cafestol e do caveol no cafeeiro e conseguir melhorar a produção *in vivo* ou *ex vivo* desses compostos. Nesse contexto, a dinâmica de acúmulo/degradação dos diterpenos dentro dos frutos das duas espécies comerciais principais de *Coffea* (*C. arabica* e *C. canephora*) foi avaliada.

O endosperma e o perisperma de *C. arabica* apresentam altas quantidades de caveol, comparados com o pericarpo e folhas de café. As concentrações de caveol aumentam no perisperma de *C. arabica* entre 60 e 100 dias após a floração (DAF). Após este pico, há um contínuo decréscimo da concentração no perisperma e um concomitante aumento no endosperma (Fig. 2).

Um padrão semelhante foi observado para cafestol em *C. arabica* e *C. canephora*, rápido aumento entre 60 e 120 DAF (150 para *C. canephora*), seguido por decréscimo gradual da concentração no perisperma e acúmulo no endosperma (Fig. 2).

Esses padrões de evolução sugerem transferências de cafestol e caveol do perisperma para o endosperma, sendo o perisperma o tecido de formação principal dos diterpenos.

3. Expressão *in vivo* de CPS, KS e KO durante o desenvolvimento do fruto

A busca de ESTs codificando as proteínas envolvidas na biossíntese de diterpenos (CPS, KS e KO) permitiu a identificação de uma seqüência parcial para CPS, duas para KO e uma para KS. Para cada gene foram desenhados *primers* específicos para analisar a expressão por PCR quantitativa.

Por enquanto, somente uma planta de *Coffea arabica* (uma repetição biológica) foi analisada quanto o nível da expressão genética dos quatro genes analisados. Para essa planta, cinco estádios de desenvolvimento de perisperma (barras verdes) e sete de endosperma (barras vermelhas), com três repetições técnicas para cada tecido foram analisados (Fig 3).

A CPS tem uma regulação altamente diferenciada entre o perisperma (alta expressão) e o endosperma (baixa expressão) e apresenta uma maior expressão no primeiro estádio de desenvolvimento do perisperma. Para KS não há variabilidade de expressão entre os tecidos ou durante o desenvolvimento dos frutos. As duas isoformas de KO apresentam uma grande diferença no padrão de expressão. A isoforma KO-1 tem uma expressão bem diferenciada no perisperma, maior que para KO-2 (Fig. 3).

As seqüências completas dos cDNAs de CPS, KO-1, KO-2 e KS foram obtidas e submetidas ao banco de dados NCBI e são identificados pelos códigos FJ409842, FJ409843, FJ409844 e FJ409845, ainda não disponíveis para o público.

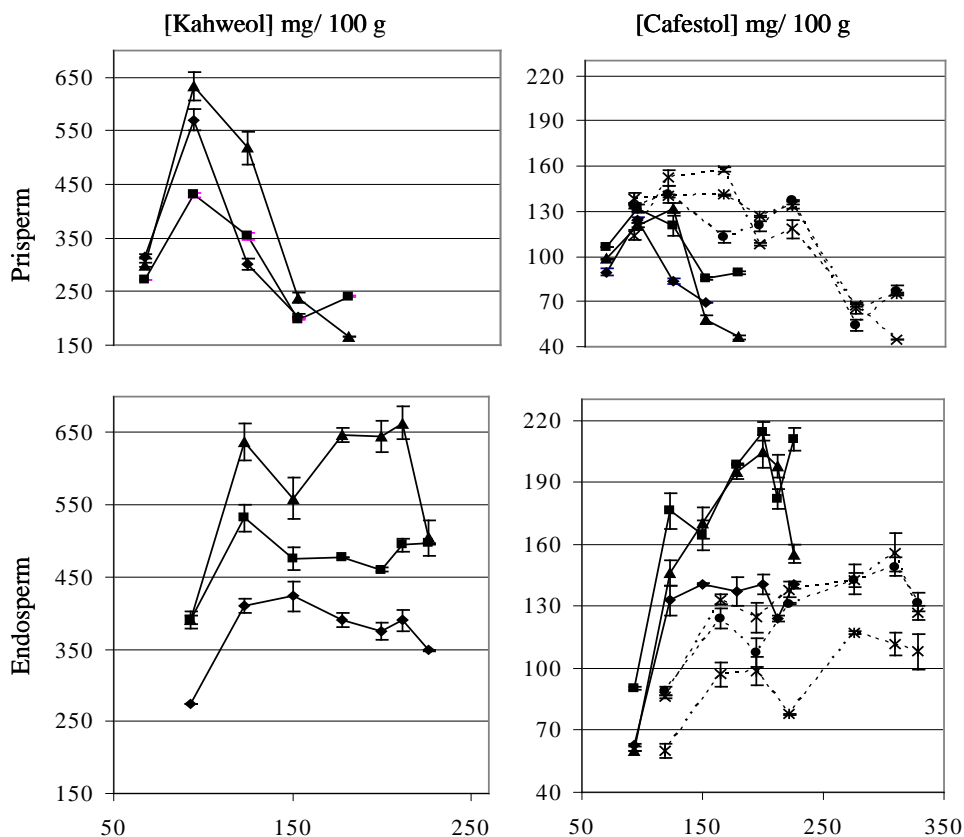


Figura 2. Evolução de cafestol e caveol durante o desenvolvimento de frutos (dias após o florescimento – DAF – no eixo X) em endosperma e perisperma de *C. arabica* (linhas contínuas) e *C. canephora* (linhas hachuradas). As concentrações são baseadas no peso do fruto fresco.

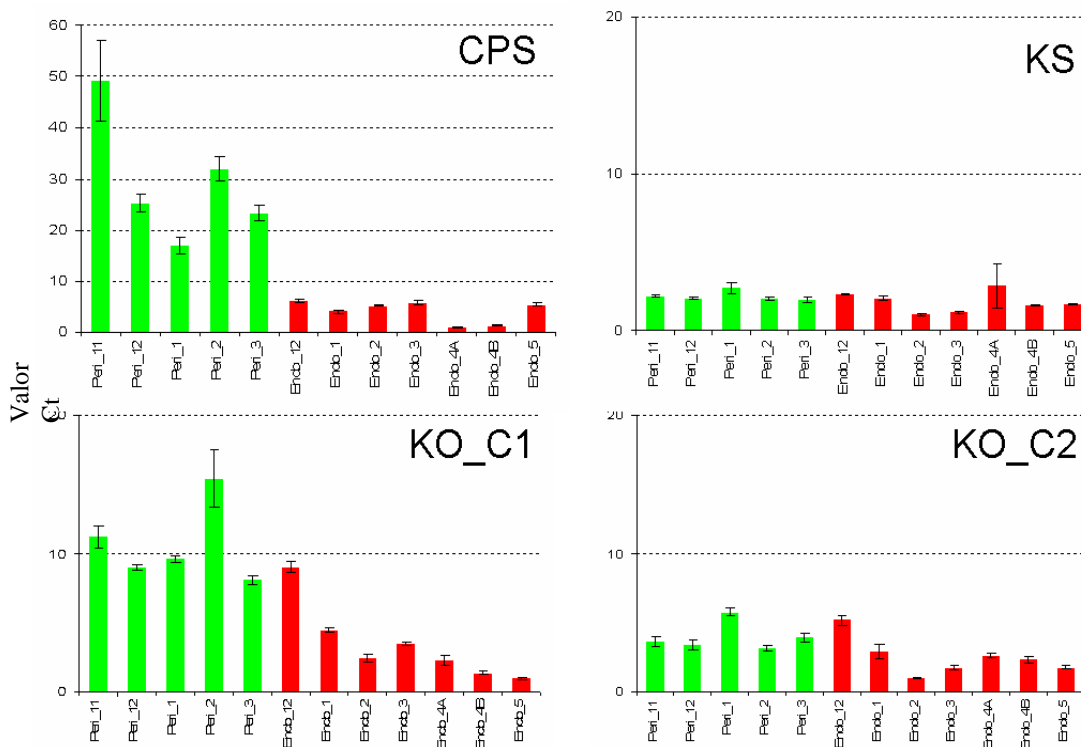


Figura 3. Evolução da expressão de genes durante o desenvolvimento do fruto (Peri= Perisperma, Endo= Endosperma, os números correspondem ao mês de coleta).

CONCLUSÕES

Foram detectadas variabilidades inter e intra-específica nos teores de diterpenos.

Os padrões de acúmulo durante o desenvolvimento do fruto sugerem que há transferência entre o perisperma e o endosperma.

Copalil fosfato sintase (CPS) parece ser uma das enzimas chave no controle do acúmulo de diterpenos e se destaca por apresentar maior expressão no perisperma do que no endosperma.

AGRADECIMENTO

Esse projeto foi financiado pelo CBPD – Café e pelo CNPq
LP Ferreira – Bolsista do CBPD-Café

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular Markers. **Euphytica** 118: 53–65, 2001.
- BERTHOLET, R. Preparation of cafestol. **US Patent** 4,692,534, 1987.
- BERTHOLET, R. Preparation of a mixture of cafestol and kahweol. **US Patent** 4,748,258, 1988.
- CLARKE, R.J. Green coffee processing. In: **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. CLIFFORD, M.N.; WILSON, K.C. (Eds), Wesport (CO) AVI Publishing, pp230-250, 1985.
- DE ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, M.B. Levels of Cafestol, Kahweol, and Related Diterpenoids in Wild Species of the Coffee Plant *Coffea*. **J. Agric. Food Chem.**, 45 (8), pp 3065–3069, 1997.
- DIAS, R.C.E.D.; CAMPANHA, F.G.; FERREIRA, L.P.; VIEIRA, L.G.E.; MARRACCINI, P.; POT, D.; BENASSI, M.T. Methodology for the evaluation of kahweol and cafestol in coffee leaves, fruit tissues and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. SUBMETIDO.
- FOURNEY, G.E.; CROS, E.; VINCENT, J.C. Etude preliminaire de l'oxydation de l'huile de café. **Proceedings of the 10th ASIC Colloquium**, Paris, France, 235-246, 1982.
- GROLLIER, J.F.; PLESSIS, S. Use of coffee bean oil as a sun filter. **US Patent** 4,793,990, 1988.
- POT, D.; FERREIRA, L.P.; DIAS, R.C.E.; DURAND, N.; GUYOT, B.; RAMOS, J.; SANDRIN-GARCIA, P.; BENASSI, M.T.; MARRACCINI, P.; PEREIRA, L.F.P.; LEROY, T.; VIEIRA, L.G.E. Genetic and molecular determinism of diterpene metabolism in *Coffea* spp. In: **22nd Internacional Conference on Coffee Science**, Campinas. 22nd Internacional Conference on Coffee Science, p. 174-174, 2008.
- SPEER, K.; SEHAT, N.; MONTAG, A. Fatty acids in coffee. **Proceedings of the 15th ASIC Colloquium** (Montpellier), 583-592, Paris, France, 1993.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3, 34.1- 4.11, 2002.
- VIEIRA, L.G.E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18:95-108, 2006.