

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES CANDIDATOS PARA A TOLERÂNCIA À SECA EM CLONES DE CAFÉ CONILON (*Coffea canephora*)

Felipe Vinecky², Gabriel Sérgio Costa Alves², Luciana Pereira Freire³, Natalia Gomes Vieira³, Pierre Marraccini⁴, Alan Carvalho Andrade⁵

¹ Trabalho financiado pela FINEP e Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D-Café

² Bolsista CNPq, LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF

³ Bolsista CBP&D-Café (FUNAPE), LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF

⁴ Pesquisador, Cirad UMR DAP Montpellier-França / LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF Pesquisador,

⁵ Pesquisador, LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF, alan@cenargen.embrapa.br

RESUMO: O cenário da cafeicultura mundial, mostra o quanto esta cultura é importante economicamente, para diversos países. Para o Brasil, que é o maior produtor e exportador de café, esta commodity é geralmente, uma das principais fontes de renda para pequenos produtores. A seca, que vem se tornando cada vez mais intensa ao longo dos anos, prejudica a produção desses agricultores, pois reduz a produtividade, podendo causar até a perda da lavoura. Atualmente, a elucidação dos fatores genéticos que conferem tolerância à seca em espécies vegetais é uma prioridade de vários grupos de pesquisa. As respostas ao déficit hídrico certamente envolvem mudanças na expressão gênica e o primeiro objetivo do presente trabalho foi caracterizar essas alterações por meio da caracterização do perfil da expressão gênica em folhas de um clone de *C. canephora* sensível (clone 22) e um clone tolerante (clone 14), cultivados em condições controle e de estresse hídrico. A técnica que foi utilizada neste trabalho foi a hibridização com macroarranjos de DNA, a qual se mostrou eficiente para se identificar genes diferencialmente expressos entre os tratamentos utilizados (irrigado e não irrigado), assim como diferenciais entre os materiais genéticos estudados (clone tolerante x sensível). Esses genes diferencialmente expressos são potenciais candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro e podem ser objeto de estudos experimentais posteriores. Os genes selecionados nos experimentos de macroarranjos, foram também caracterizados utilizando-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).. Em sua maioria, os resultados obtidos com as análises de qPCR corroboraram com a expressão diferencial previamente observada nos experimentos com macroarranjos.

Palavras-chave: Genes candidatos, *Coffea canephora*, expressão gênica, estresse hídrico

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CANDIDATE GENES INVOLVED IN DROUGHT TOLERANCE OF CONILON CLONES (*Coffea canephora*)

ABSTRACT: The coffee business worldwide shows that coffee is economically important for many countries. For Brazil, the largest producer and exporter of coffee, this commodity is usually a major source of income to small farmers. Drought periods have become increasingly intense over the recent years, affecting the production of these farmers as it reduces productivity and can even cause irreversible crop damage. Nowadays, the elucidation of the genetic factors involved in drought tolerance is amongst the priorities of several research groups. Responses to drought stress certainly involve changes in gene expression and the goal of this work, was the characterization of the gene expression profile on leaves of a sensitive clone of *C. canephora* (clone 22) and a tolerant clone (clone 14), grown under control and water stress conditions. The technique used in this study was the hybridization of DNA macroarrays, which was efficient to identify genes differentially expressed between the treatments used (irrigated and non irrigated) as well as differences between the genotypes studied (clone tolerant x sensitive). These differentially expressed genes are potential candidates for drought tolerance in coffee and may be subject to further experimental studies. The previously selected genes on the macroarrays experiments were further characterized by real-time quantitative PCR assays (qPCR). In general, most of the results obtained by the qPCR analysis corroborated with the differential expression observed with the macroarrays experiments.

Key words: candidate genes, *Coffea canephora*, gene expression, water stress

INTRODUÇÃO:

O café é um dos principais produtos agrícolas no mundo, tendo sido considerado o segundo item em importância econômica, no comércio internacional de “commodities”. O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae e é oriundo de regiões da África, que compreendem o sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia. Este gênero contém aproximadamente 100 espécies, mas a produção comercial é baseada somente em duas espécies, *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café robusta) (Relatório de Gestão, 2003), que representam aproximadamente 76 % e 24 % do mercado total de café, respectivamente (Conab, 2008).

Embora a cafeicultura seja fortemente afetada pela seca, a maior parte do café no mundo tem sido cultivada por pequenos agricultores, em regiões onde o emprego da irrigação é uma exceção (DaMatta e Ramalho, 2006). Além disso,

as previsões de mudanças no clima global podem afetar severamente a produção cafeeira e é esperado que a escassez de água se torne ainda maior, em várias regiões. Neste contexto, a seleção de cultivares tolerantes à seca que possam resistir aos períodos de estresse hídrico, com rendimentos aceitáveis, é de extrema importância. Todavia, seleções foram feitas, mas se conhece relativamente pouco sobre como os genótipos de café respondem morfológica e fisiologicamente ao estresse hídrico (DaMatta, 2004; DaMatta e Ramalho, 2006).

Clones de *C. canephora* com melhor rendimento e estabilidade durante a seca, ou com capacidade de sobreviver a episódios de seca através de uma situação mais restrita do uso da água, podem ser de grande valor para a cafeicultura. Em estudo recente, os clones 14 e 120 apresentaram o crescimento radicular com maior profundidade quando comparados a outros dois clones sensíveis ao estresse, onde as raízes foram encontradas mais próximas à superfície (Pinheiro et al., 2005).

A identificação de genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico em cafeeiro realizado neste trabalho, envolveram as técnicas de hibridização em macroarranjos de cDNA de *C. canephora* nas condições irrigada e não irrigada e a validação dos resultados com a expressão diferencial em folhas das plantas visualizados a partir de ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Os clones tolerante (14) e sensível (22) à seca da variedade Conillon de *C. canephora* foram selecionados pelo INCAPER (Ferrão et al., 2000) e crescidos na casa de vegetação com irrigação (I) ou sem irrigação (NI = condição de estresse hídrico nas folhas com $\Psi_{PD} = -3.0$ MPa). Para todas as plantas, as folhas foram coletadas, congeladas no nitrogênio líquido e conservadas na temperatura de -80°C até a extração do RNA total.

Macroarranjos de cDNA

As membranas de alta densidade utilizadas neste trabalho foram confeccionadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para o preparo das mesmas foram utilizados produtos de PCR de clones das ESTs selecionadas, oriundos das bibliotecas de cDNA, SH2 e SH3, sequenciadas no âmbito do projeto Genoma Café (Vieira et al., 2006). As amostras de produtos de PCR foram arranjadas em placas de 384 poços. Estas amostras, foram então transferidas para membranas de náilon, carregadas positivamente (Genetix, UK), através de um sistema robotizado QBot (Genetix, UK). Um total de 3.414 amostras de DNA (produto de PCR), sendo 36 controles, foram depositadas nas membranas. Em um arranjo 3X3, as amostras foram depositadas em duplicata para maior confiabilidade das análises, perfazendo um total de 6.828 “spots” por membrana. Após a deposição das amostras de cDNA, a membrana foi colocada em papel filtro molhado com a solução desnaturante depois transferida para outro papel filtro com solução de neutralização e posteriormente o cDNA foi fixado à membrana por exposição à luz UV.

A marcação das sondas a partir do RNA total foi realizado inicialmente com o anelamento do iniciador oligo-DT. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o kit Superscript III (Invitrogen), e o radioisótopo utilizado foi o ^{33}P α -dCTP. Após a hibridização, as membranas foram expostas em Image Plates (IP), com posterior análises no equipamento Phosphoimager FLA3000 (FUJIFILM). As imagens digitalizadas foram analisadas usando o software ArrayVision 8.0 (Fujifilm, Tokio), o qual proporciona a quantificação da intensidade de sinal, emitida em cada um dos “spots”.

PCR quantitativo em tempo real

As amostras de RNA total extraído de folhas foram submetidos a um tratamento enzimático com DNaseI-RNase “free”, e 1 μg de cada amostra foi utilizado para a transcrição reversa, com a enzima ImPromII (Promega), conforme recomendações do fabricante. O cDNA fita-simples sintetizado, foi diluído (1/50) e testado por qPCR usando pares de primers específicos dos genes candidatos. Esses primers foram desenhados usando as seqüências consenso de contigs disponíveis, na Base de Dados do Genoma Café (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>). As reações de qPCR foram realizadas com 1 μl de cDNA fita-simples em um volume final de 10 μl . Foi utilizado o fluoróforo SYBR-green (SYBRGreen qPCR Mix-UDG/ROX, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e as reações foram analisadas no aparelho ABI 7500-FAST (Applied Biosystems). Para cada amostra, os níveis da expressão foram normalizados com a expressão do gene *UBQ10* (www.sgn.cornell.edu SGN-U347154), o qual codifica para a ubiquitina. Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa SDS 1.3.1 (Applied Biosystems). Os níveis da expressão gênica foram apresentados na forma de quantificação relativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão dos genes nos macroarranjos

Após as análises comparativas, verificou-se que os resultados que apresentaram a menor ocorrência de falsos positivos foi quando utilizou-se a obtenção do sinal total, com background nulo e normalização com o controle em cada imagem, como parâmetros de análise do programa Array Gauge (Fuji). Com essas condições foram realizadas as análises comparativas entre os dados obtidos para os tratamentos clone 22 irrigado versus não irrigado (22I x 22NI) (figura 1A), clone 14 irrigado versus não irrigado (14I x 14NI) (figura 1B), clone 22 irrigado versus 14 irrigado (22I x 14I) (figura 1C) e clone 22 não irrigado versus clone 14 não irrigado (22NI x 14NI) (figura 1D).

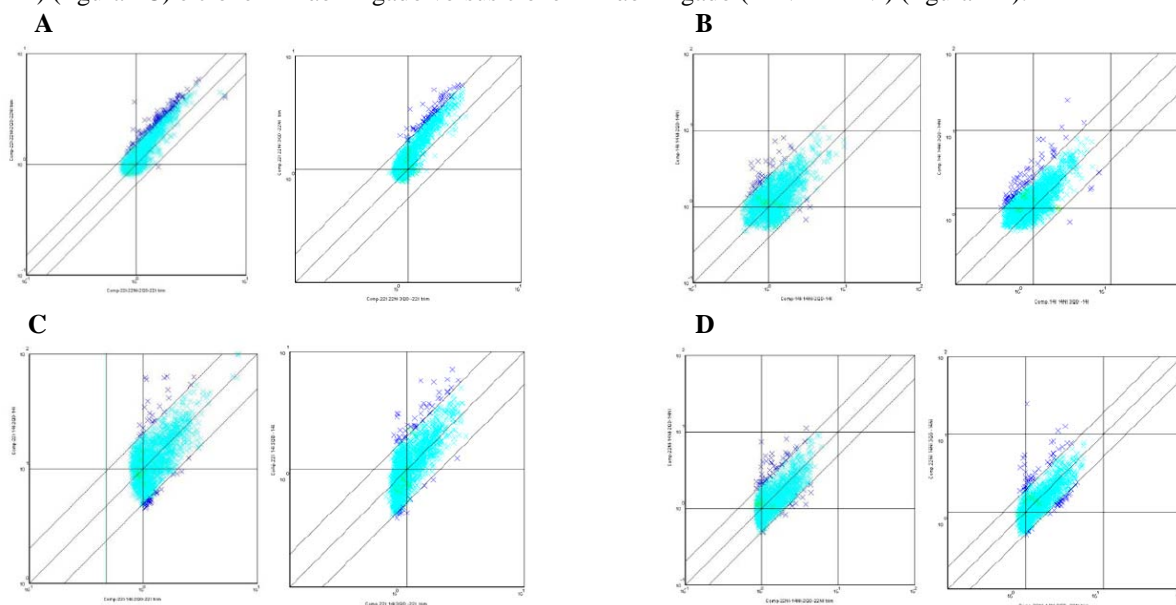


Figura 1: Gráficos de dispersão do 2º e 3º quadrantes da membrana com os dados de macroarranjo, utilizando controle entre imagens do software Array Gauge (Fuji). **A** - clone 22I x 22NI, **B** - clone 14I x 14NI, **C** - clone 22I x 14I, **D** - clone 22NI x 14NI.

Identificação dos genes diferencialmente expressos nos macroarranjos

Entretanto, mesmo com os parâmetros utilizados, foi necessária uma inspeção visual dos resultados diferenciais para a eliminação de falso positivos que normalmente ocorriam em manchas das diferentes imagens das membranas. Com este procedimento, alguns genes foram selecionados para os ensaios de qPCR. Na figura 2 estão representados 4 clusters nas membranas, mostrando a expressão diferencial entre os tratamentos.

Cluster	14I	14NI	22I	22NI
Contig17896				
Contig18100				
Contig18390				
SH3-056-B04				

Figura 2: Análise visual dos spots da membrana de macroarranjo, selecionados como diferenciais para as análises de qPCR.

Na figura 2 foi possível observar que a expressão dos 4 genes foi diferencial. No Contig17896 (proteína desconhecida) e no Singlet SH3-056-B04 (provável proteína homóloga de café da “small heat shock protein”) o sinal esteve presente em todas as condições, porém com expressão diferencial na condição de estresse hídrico de ambos os clones. Para os Contigs 18100 (No Hit) e 18390 (dehidrina) foi detectado um sinal com maior intensidade na condição estressada quando comparado à condição irrigada.

Caracterização por PCR quantitativo em tempo real

Alguns dos genes com expressão diferencial e potencial envolvimento na resposta ao estresse hídrico em cafeeiro, previamente identificados nas membranas de macroarranjo, foram selecionados para validação em experimentos de qPCR. Para os experimentos de qPCR, foram desenhados primers específicos com base nas seqüências dos genes selecionados e foi analisada a expressão destes genes em folhas dos clones 22 e 14 nas condições estressada e irrigada.

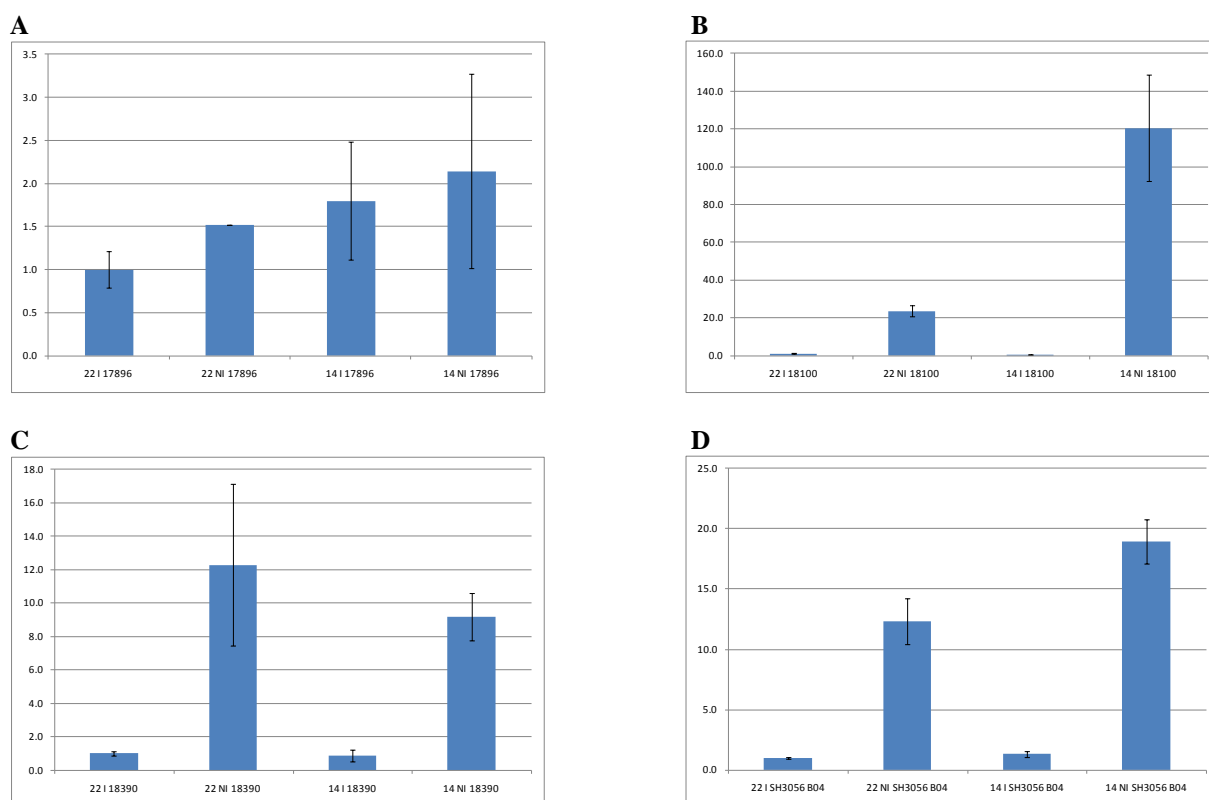


Figura 3: Resultado das análises de qPCR de 4 genes, que apresentaram expressão diferencial nas membranas de macroarranjo.

A expressão gênica encontrada por qPCR, utilizando-se os primers desenhados a partir das seqüências dos Contigs 17896 e 18100, apresentado nas figuras 3A e 3B, respectivamente, foi correlacionada com os dados obtidos com os experimentos de macroarranjos. Nestes casos, a expressão foi maior na condição não irrigada do clone tolerante. As análises BlastX indicam que esses contigs são considerados “no hits” ou apresentam similaridade com proteínas com função desconhecida.

De acordo com Nylander et al (2001), as desidrinases são expressas nas condições de estresse hídrico, e os dados observados com os experimentos de macroarranjo foram confirmados por qPCR, utilizando-se um par de primers desenhado a partir da seqüência do Contig 18390 (figura 3C). De acordo com Wiederrecht et al. (1987), a expressão do gene “small heat shock protein” atua na forma de protetor de macromoléculas. Os resultados de qPCR utilizando-se o par de primers desenhado a partir do Singlet SH3-056-B04 (figura 3D), mostrou elevada expressão na condição de estresse hídrico.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos de hibridização com macroarranjos, utilizando-se RNA total de folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora*, cultivados em condições controle e estresse hídrico, permitiu a identificação de vários genes com expressão diferencial tanto entre os clones estudados, quanto entre os tratamentos (irrigado vs. não irrigado). Esses experimentos mostraram-se eficientes para identificar genes candidatos responsivos ao estresse hídrico, além de possibilitar a comparação dessas respostas entre materiais genéticos contrastantes para a tolerância ao estresse hídrico. Expressão diferencial pôde ser observada para os Contigs 17896 e 18100 os quais não apresentam descrição na literatura, e o Contig 18390 e o Singlet SH3-056-B04 que codificam, respectivamente, para desidrina e SHSp, já caracterizados em outras espécies vegetais como responsivos à seca.

Em sua maioria, os dados obtidos nas análises de macroarranjo de cDNA, foram validados com a técnica de qPCR, onde os resultados de expressão mostraram a mesma tendência diferencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASE DE DADOS DO GENOMA CAFÉ. Disponível em: <<https://alanine.cenargen.embrapa.br/caFEST>>. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - Conab. **Acompanhamento da Safra Brasileira Café, Safra 2008, Quarta Estimativa**. Brasília, dez. 2008.

DAMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding, **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina. v. 16, n. 1, p. 1-6, Jan/Apr 2004.

DAMATTA, F.M. & RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, vol.18, no.1, p. 55-81, Jan/Mar, 2006.

DAMATTA, F. M.; SILVEIRA, J. S. M.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, MARCELO, E. Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DE CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais Simpósio de Pesquisa de Cafés do Brasil**. Brasília: EMBRAPA CAFÉ / MINASPLAN, 2000. v. 2, p. 907-910.

FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G. Avaliação de clones elites de café Conilon em condição de estresse hídrico no estado do Espírito Santo. **I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Poços de Caldas-MG, CD-rom: 402-404, 2000.

NYLANDER, M.; SVENSSON, J.; PALVA, E. T.; WELIN, B. V. Stress induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 45, n. 3, p. 263-279, Feb. 2001.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. de M.; LOUREIRO, M. E.; DUCATTI, C. Drought tolerance is associated with root depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora* Pierre. **Annals of Botany**, Inglaterra, v. 96, n. 1, p. 101-108, Jul. 2005.

RELATÓRIO DE GESTÃO CAFÉ. Relatório de gestão da Embrapa Café, Brasília, Embrapa Café, 2004. 142 p.

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.A.H.; METHA, A.; OLIVEIRA, A.C.; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MONTE, D.C.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E.T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; ALMEIDA, E.R.P.; JORGE, E.C.; BARROS, E.V.S.A.; DA SILVA, F.R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H.E.; DORRY, H.F.A.; CARRER, H.; ABREU, I.N.; BATISTA, J.A.N.; TEIXEIRA, J.B.; KITAJIMA, J.P.; XAVIER, K.G.; LIMA, L.M.; CAMARGO, L.E.A.; PEREIRA, L.F.P.; COUTINHO, L.L.; LEMOS, M.V.F.; ROMANO, M.R.; MACHADO, M.A.; COSTA, M.M.C.; GROSSI DE SÁ, M.F.; GOLDMAN, M.H.S.; FERRO, M.I.T.; TINOCO, M.L.P.; OLIVEIRA, M.C.; SLUYS, M.A.V.; SHIMIZU, M.S.; MALUF, M.P.; EIRA, M.T.S.; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P.D.S.C.; OLIVEIRA, R.L.; HAKAKAVA, R.; BALBAO, S.F.; TSAI, S.M.; MAURO, S.M.Z.; SANTOS, S.N.; SIQUEIRA, W.J.; COSTA, G.G.L.; FORMIGHIERI, E.F.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.G. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Braz. J. Plant Physiol.** 18: 95-108, 2006.

WIEDERRECHT, G.; SHUEY, D. J.; KIBBE, W. A.; PARKER, C. S. The *Saccharomyces* and *Drosophila* heat shock transcription factors are identical in size and DNA binding properties. **Cell**, USA, v. 48, n. 3, p. 507-515, Feb. 1987.