

ANÁLISES DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR) DE GENES CANDIDATOS PARA A TOLERÂNCIA À SECA EM CAFEIEIRO¹

Felipe Vinecky²; Gabriel Sérgio Costa Alves³; Natália Gomes Vieira⁴; Luciana Pereira Freire⁵; Ingrid Gomes Renoldi Heimbeck³; Romário Gava Ferrão⁶; Aymbiré Francisco Almeida da Fonseca⁷; Maria Amélia Gava Ferrão⁸; Vânia Aparecida Silva⁹; Pierre Marraccini¹⁰; Alan Carvalho Andrade¹¹

1 Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café com apoio da FINEP e INCT-Café (CNPq/FAPEMIG)e.

2 Doutorando, M.Sc., Departamento de Biologia Celular - UnB – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF, fevinecky@yahoo.com.br

3 Doutorando, M.Sc., UFLA – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

4 Mestranda, Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

5 Bolsista, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

6 Pesquisador, D.Sc., Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), Vitória-ES

7 Pesquisador, D.Sc., Embrapa/INCAPER, Vitória-ES

8 Pesquisadora, D.Sc., Embrapa Café/INCAPER, Vitória-ES

9 Pesquisadora, D.Sc., EPAMIG/URESM, Lavras-MG

10 Pesquisador, PhD., CIRAD UMR AGAP, Montpellier, FR, marraccini@cirad.fr

11 Pesquisador, PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), alan@cenargen.embrapa.br

RESUMO: A seca é uma das principais limitações climáticas à produção do cafeeiro. A importância dessa limitação deve aumentar, em função das mudanças reconhecidas no clima global e, também, porque a cafeicultura vem sendo expandida para regiões marginais onde a baixa pluviosidade e temperaturas desfavoráveis se constituem grandes limitações à produção do café. A seca induz diversas respostas fisiológicas e moleculares nas plantas, incluindo alterações da expressão gênica, visando atingir ajuste osmótico, a indução de reparadores de sistemas moleculares e a expressão de diversas proteínas protetoras. Existem diversas formas de se avaliar a expressão gênica em plantas submetidas ao estresse hídrico. Uma técnica amplamente utilizada nos últimos anos, para a análise quantitativa da expressão gênica é a de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão de 14 genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro, pré-selecionados em estudos de macroarranjos de cDNA, utilizando clones de *Coffea canephora* (Clone 22 – sensível e clones 14, 73 e 120 – tolerantes ao estresse hídrico).

Palavras chave: *Coffea canephora*, expressão gênica, genes candidatos, seca.

GENE EXPRESSION ANALYSIS BY QUANTITATIVE REAL TIME PCR (QPCR) OF CANDIDATE GENES FOR DROUGHT TOLERANCE IN COFFEE

ABSTRACT: Drought is one of the main weather constraints of coffee production. Its importance should increase, according to the recognized changes in global climate, and also because coffee is being expanded to marginal regions where low rainfall and unfavorable temperatures are major limitations to coffee production. Drought induce various physiological and molecular responses in plants including changes of gene expression, in order to achieve osmotic adjustment, the induction of repair systems and molecular expression of various protective proteins. There are several ways to evaluate the gene expression in plants subjected to water stress. A widely used technique in recent years for the quantitative analysis of gene expression is the real-time quantitative PCR (qPCR). The objective of this study was to analyze the expression of 14 candidate genes for drought tolerance in coffee, pre-selected in macroarrays studies, using *Coffea canephora* clones (Clone 22 – susceptible and clones 14, 73 and 120 – tolerant to water stress).

Key words: *Coffea canephora*, candidate genes, drought, gene expression.

INTRODUÇÃO

A tolerância das plantas à seca demanda características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e de arquitetura para que possam suplantarem as condições de limitação de água. Caracteres morfológicos, tais como a raiz, a arquitetura

ou forma foliar, respostas bioquímicas na planta, incluindo acúmulo de osmólitos, detoxificação ou síntese de compostos de proteção e adaptações fisiológicas que podem elevar a eficiência do uso da água, contribuem para a tolerância à seca dos vegetais. Damatta *et al.* (2003) verificaram que o melhor rendimento de um clone tolerante à seca, comparado a um clone sensível, estava associado com a manutenção da área foliar em maiores potenciais hídricos, como consequência da menor condutância estomática (g_s). A adaptação à seca pode também envolver mudanças na expressão gênica. Em experimentos com plantas submetidas à estresses osmóticos, realizados com *Arabidopsis thaliana*, mostraram um grande número de genes que são diferencialmente expressos, englobando cerca de 12% do transcriptoma total dessa planta (Kreps *et al.*, 2002). Estes genes são associados e participam na regulação de inúmeras funções celulares, o que reflete a complexidade na adaptação à resposta ao estresse hídrico. A expressão desses genes em resposta à seca parece ser bastante conservada nas diferentes espécies vegetais. Curiosamente, a resposta ao estresse e a senescência sinalizam a sobreposição de rotas, de mais de dois terços dos fatores de transcrição induzidos durante a senescência (Chen *et al.*, 2002).

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

Em trabalhos prévios, genes responsivos ao estresse hídrico foram identificados a partir de experimentos com hibridização de macroarranjos, usando cDNAs obtidos a partir de RNA de folhas café de duas cultivares, uma tolerante ao estresse hídrico (Clone 14) e outra sensível (Clone 22), ambas submetidas a irrigação normal (controle) e estressada (Vinecky, 2009). Neste trabalho foi verificada a expressão de 14 genes previamente encontrados, validando-os a partir de PCR Quantitativo em Tempo Real, sendo que a expressão desses genes foi analisada utilizando-se cDNA proveniente dos clones de *C. canephora* (clones 14, 22, 73 e 120) cultivados em casa de vegetação com ou sem estresse hídrico. Os resultados obtidos com as análises de qPCR corroboraram com os resultados de expressão diferencial previamente observados nos experimentos com macroarranjos.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foram plantas dos clones tolerante (14, 73 e 120) e sensível (22) à seca da variedade Conilon de *C. canephora*, selecionados pelo INCAPER (Ferrão *et al.*, 2000) e cultivados em casa de vegetação (UFV), com irrigação (I) e sem irrigação (NI = condição de estresse hídrico nas folhas com $\Psi_{pd} = -3.0$ MPa). O potencial de base (Ψ_{pd} : “pre-dawn water potential”) foi medido usando uma bomba de Scholander. As folhas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas à temperatura de -80°C até a extração dos RNA totais.

A análise da expressão dos genes previamente identificados como diferencialmente expressos, nos experimentos de macroarranjos, foi feita com reações de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR) utilizando-se o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Esse procedimento foi realizado com 14 genes diferenciais. O experimento de qPCR foi realizado com a utilização do fluoróforo Platinum[®]SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen).

Para as extrações de RNA total utilizou-se o Kit Concert[®] (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante. Após a análise da qualidade do RNA, procedeu-se o tratamento com o Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) para a retirada de todos os vestígios de DNA genômico. Para as reações de qPCR, o RNA obtido de amostras de folhas dos clones 14 e 22 (irrigado e não irrigado) e mais outros dois clones tolerantes (clones 73 e 120), também em condições de estresse e controle, foram utilizados. Após verificada a ausência de DNA nas amostras, foi realizada a síntese reversa do mRNA para a obtenção da fita de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Improm-II[™] Reverse Transcriptase conforme o protocolo do fabricante (Promega).

A quantificação de transcritos dos genes pesquisados foi padronizada usando os dados do gene constitutivo da ubiquitina como normalizador interno. As reações foram feitas em triplicatas. De acordo com Cruz *et al.* (2009), o gene *CcUBQ10* codificando para a ubiquitina (SGN-U637098, Mueller *et al.*, 2005; GW488515, Mondego *et al.*, 2011) apresentou ser constitutivo e estável em vários tecidos de plantas de *C. arabica*, sendo portanto, um bom controle endógeno para experimentos de PCR quantitativo em tempo real.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das análises de dados de macroarranjos realizados previamente, um conjunto de 29 genes foi selecionado para a construção de pares de *primers*, visando-se a realização dos experimentos de qPCR. Os resultados

das análises de qPCR desses genes, responsivos ao estresse hídrico, em grande parte, corroboraram com os dados previamente obtidos com os experimentos de macroarranjos, onde para a maioria dos genes testados, foi observada expressão diferencial, principalmente entre os tratamentos controle e não irrigados.

Na Figura 1 observa-se a expressão do gene que codifica o TRAF-like, que é um motivo característico de fatores de transcrição (*zinc finger*) associado com a recepção da sinalização de estresse sendo representado pelo *CcTRAF1* (SGN-U630916, Mueller *et al.*, 2005; GW488515, Vidal *et al.*, 2010). Foi verificada a maior expressão desse gene nas condições não irrigadas dos clones (com exceção do clone 120).

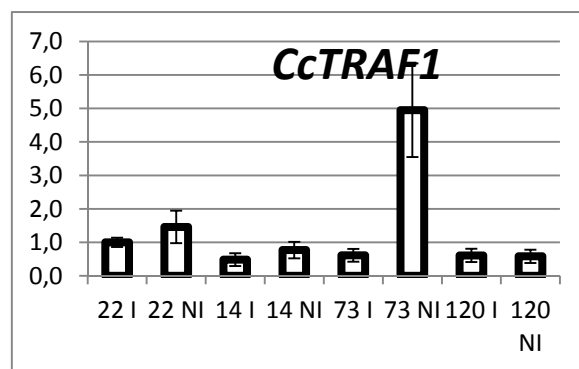


Figura 1: Expressão do gene TRAF-like amplificado por qPCR com o par de *primers* desenhado a partir do *CcTRAF1*.

A expressão do gene codificando a prephenate desidrogenase *CcPDH1* (SGN-U639636, Mueller *et al.*, 2005; GT655248, Vidal *et al.*, 2010) foi também testada usando-se dois pares de *primers* específicos dos *CcPDH1* e *CcPDH2* (Figura 2). Observou-se aumento da expressão desse gene com o estresse hídrico, principalmente para o clone 73. É importante de anotar que a prephenate desidrogenase é uma enzima que controla a via de síntese dos aminoácidos aromáticos como a tirosina e a fenilalanina, os quais são precursores de Vitamina E (tocoferol) que possui a função de proteger membranas biológicas contra o estresse oxidativo (Rippert *et al.*, 2004).

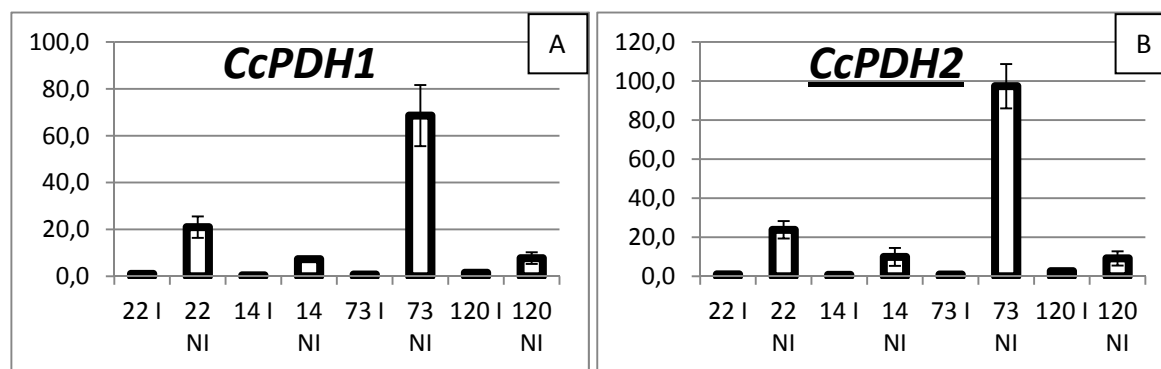


Figura 2: Expressão do gene da proteína prephenate desidrogenase analisado por qPCR com os pares de *primers* desenhados a partir dos ESTs *CcPDH1*(A) e *CcPDH2* (B).

Para os genes “no hits” (“UNK” para “*unknown*”) que codificam para proteínas de função desconhecida, as reações de qPCR confirmaram os dados obtidos com os macroarranjos como se observou para *CcUNK7* (GT650205, Vidal *et al.*, 2010) e *CcUNK8* (SGN-U636790, Mueller *et al.*, 2005; GT649212, Vidal *et al.*, 2010), (Figuras 3A e B respectivamente).

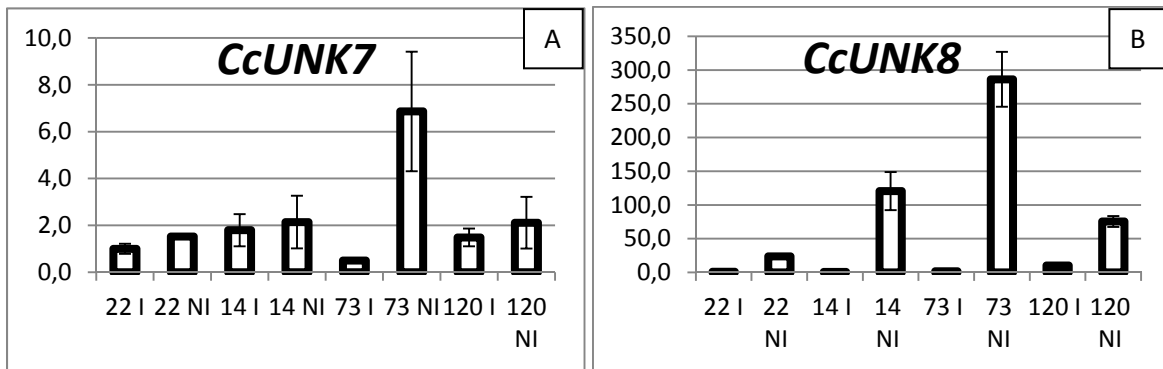


Figura 3: Expressão dos genes codificando as proteínas desconhecidas *CcUNK7*(A) e *CcUNK8*(B) avaliada por qPCR.

A expressão do gene “putative early light induced protein” (ELIP), associada ao estresse ocasionado pela luz (fotossensível) e codificada pelo *CcELIP2* (SGN-U631550, Mueller *et al.*, 2005; GT649657, Vidal *et al.*, 2010) (Figura 4A). Foi observado uma maior expressão desse gene nas condições estressadas para os clones 14 e 73 enquanto o inverso foi observado para os clones clones 22 e 120. Isso sugere que existem diferentes mecanismos envolvidos na tolerância a seca das plantas analisadas.

Segundo Surpin *et al.* (2003), a expressão do gene “vesicle transport v-SNARE 11-like” (*CcSNR1*: SGN-U639266, Mueller *et al.*, 2005; GT648914.1, Vidal *et al.*, 2010) pode ocorrer em situações de estresse osmótico, atuando no transporte de osmoprotetores. Este gene representado pelo *CcSNR1* apresenta uma maior expressão na condição de estresse hídrico somente no clone 73 (Figura 4B).

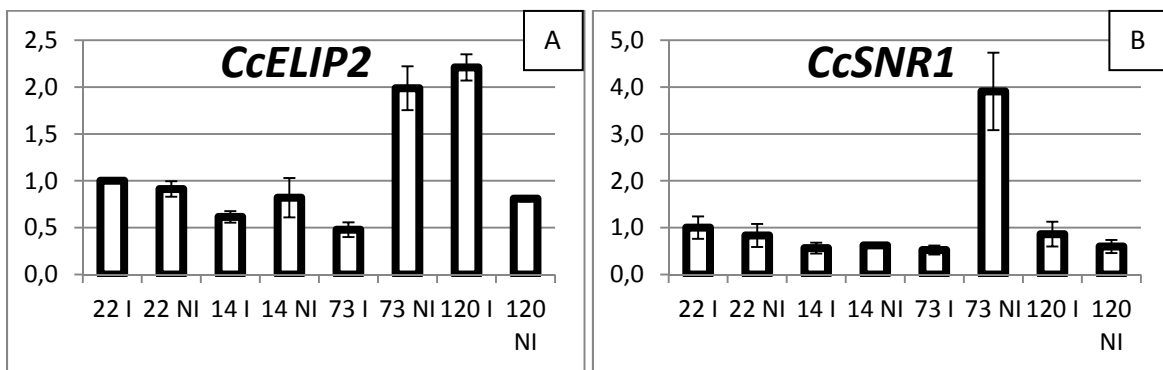


Figura 4: Expressão dos genes codificando para a “putative early light induced protein” (ELIP) (A: *CcELIP2*) e a “vesicle transport v-SNARE 11-like” (B: *CcSNR1*).

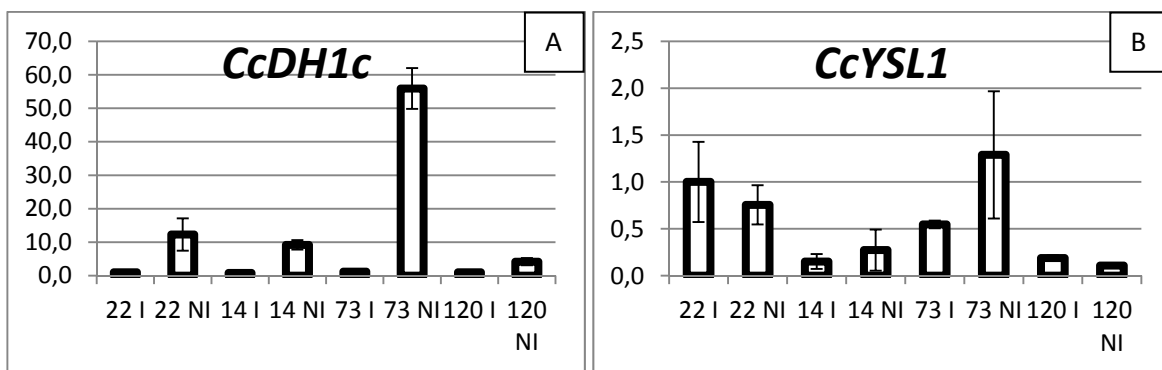


Figura 5: Expressão do gene codificando a desidrina (A: *CcDH1c*) e a “metal-nicotiamine transporter YSL1 (B: *CcYSL1*).

Para o *CcDHLc* (SGN-U629840, Mueller *et al.*, 2005; DV699245, Lin *et al.*, 2005) codificando uma desidrina, os resultados de qPCR confirmaram os resultados com os experimentos de macroarranjo mostrando um aumento na expressão com o estresse hídrico (Figura 5A). Para o *CcYSL1* (SGN-U636857, Mueller *et al.*, 2005; GT649384, Vidal *et al.*, 2010), que codifica para uma proteína que apresenta similaridade com o transportador YSL1, foi observada uma maior expressão na condição de estresse hídrico para o clone 73 (Figura 5B).

Para o *CcEDR1* (GT648653, Mondego *et al.*, 2011) que codifica para uma proteína com alta similaridade a proteína EDR1, foi observado para todos os clones avaliados uma maior expressão na condição estressada (Figura 6A).

De acordo com Wiederrecht *et al.* (1987), a expressão do gene “small heat shock protein” (sHSP) atua na forma de protetor de macromoléculas. Os resultados de qPCR para o *CcHSP1*: GT651392 (Vidal *et al.*, 2010) codificando para essa proteína, mostram uma ampla indução da expressão na condição de estresse hídrico (Figura 6B).

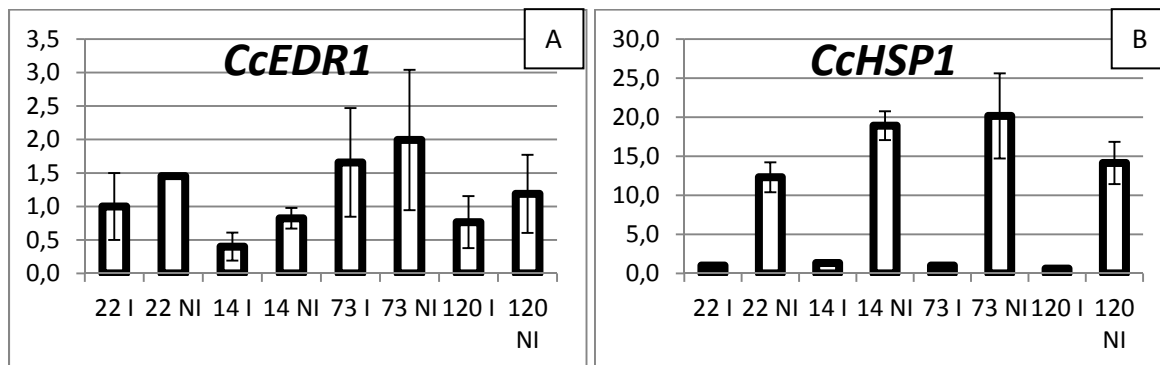


Figura 6: Expressão do gene codificando a proteína EDR1 (A: *CcEDR1*) e uma “small heat shock protein” (B: *CcHSP1*).

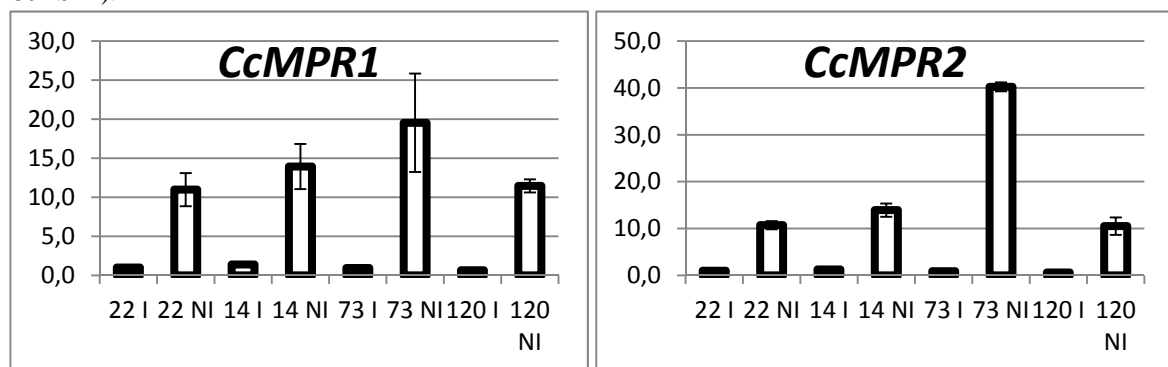


Figura 7: Expressão do gene codificando a NADPH-dependent mannose 6-fosfato reductase (A: *CcMPR1* e B: *CcMPR2*).

Os genes de café, que codificam proteínas com similaridade à NADPH-dependent mannose 6-fosfato reductase ou oxireductase, foram identificados e validados tanto nos experimentos de macroarranjo como na reação de qPCR, quando se utilizou os *primers* desenhados a partir do *CcMPR1* (Figura 7A) e do *CcMPR2* (Figura 7B).

CONCLUSÕES

A maior parte dos genes pré-selecionados em experimentos de macroarranjos apresentaram resultados de qPCR diferenciais na condição de estresse hídrico. Devido ao fato de o macroarranjo ter sido realizado apenas com os clones 14 e 22 pode-se concluir que existem outros mecanismos atuando no clone 73. Em geral, os dados obtidos por qPCR indicaram uma resposta mais acentuada no clone 73, em condições de estresse hídrico quando comparado aos demais clones avaliados. Quatorze genes apresentaram resultados correspondentes com a expressão observada nos experimentos de macroarranjo.

A expressão diferencial de alguns genes, entre os materiais genéticos testados, indica que diferentes mecanismos podem estar associados à tolerância à seca em cafeeiro. A elevada expressão da maioria dos genes no clone 73 na condição estressada pode representar que existem diferentes mecanismos envolvidos na tolerância dos clones, visto que esses (clones 14 e 120) apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas nas raízes, relacionando assim ao estresse osmótico e por sua vez, o clone 73 pode apresentar mecanismos voltados para a parte aérea da planta, principalmente as folhas, envolvendo proteínas que protegem a planta contra o estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, W.; PROVART, N. J.; GLAZEBROOK, J.; KATAGIRI, F.; CHANG, H. S.; EULGEM, T.; MAUCH, F.; LUAN, S.; ZOU, G.; WHITHAM, S. A.; BUDWORTH, P. R.; TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, X.; LAM, S.; KREPS, J. A.; HARPER, J. F.; SI-AMMOUR, A.; MAUCH-MANI, B.; HEINLEIN, M.; KOBAYASHI, K.; HOHN, T.; DANGL, J. L.; WANG, X.; ZHU, T. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 3, p. 559-574, Mar. 2002.
- CRUZ, F.; KALAOUN, S.; NOBILE, P.; COLOMBO, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L. M. G.; ROMANO, E.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; VASLIN, M.; ALVES-FERREIRA, M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, n. 4, p. 1380, Feb. 2009.
- DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; PINHEIRO, H.A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M.E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 1, p. 111-117, 2003.
- FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; SILVEIRA, J.S.M.; FERRÃO, M.A.G.; BRAGANÇA, S.M. EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. **Rev. Ceres** v. 273: p. 555-560, 2000.
- KREPS, J.A.; WU, Y.; CHANG, H. S.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J. F. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, n. 4, p. 2129-2141, 2002.
- LIN C, MUELLER LA, MC CARTHY J, CROUZILLAT D, PÉTIARD V, TANKSLEY SD. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theor Appl Genet.**,v. 112, n. 1, p. 114-130, 2005.
- MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; TOKUDA, E.K.; PARIZZI, L.P.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G.; AND BRAZILIAN COFFEE GENOME PROJECT CONSORTIUM. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology** n. 11, p. 30, 2011.
- MUELLER, L.A.; SOLOW, T.H.; TAYLOR, N.; SKWARECKI, B.; BUELS, R.; BINNS, J.; LIN, C.; WRIGHT, M.H.; AHRENS, R.; WANG, Y.; HERBST, E.V.; KEYDER, E.R.; MENDA, N.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. The SOL Genomics Network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond. **Plant Physiol** n. 138, p. 1310-1317, 2005.
- 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 *C. canephora* P. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 1, p. 101-108, 2005.
- RIPPERT, P.; SCIMEMI, C.; DUBALD, M.; MATRINGE, M. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, n. 1, p. 92-100, 2004.
- SURPIN, M.; et al. The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 12, p. 2885-2899, 2003.
- VIDAL, R.O.; MONDEGO, J.M.C.; POT, D.; AMBRÓSIO, A.B.; ANDRADE, A.C.; PEREIRA, L.F.P.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.G. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology** n.154, p.1053-1066, 2010.
- VINECKY, F. Identificação e caracterização de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro / Dissertação de mestrado. – Lavras : UFLA, 2009.
- 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**, Cambridge, v. 48, n. 3, p. 507-515, 1987.