

ANÁLISE DA VARIABILIDADE DE SEQUÊNCIAS NO GENE *DREBID* EM DIFERENTES GENÓTIPOS DO GÊNERO *COFFEA*¹

Gabriel Sérgio Costa Alves²; Luciana Pereira Freire³; Natália Gomes Vieira⁴; Dominique This⁵; David Pot⁶; Pierre Marraccini⁶; Luciano Vilela Paiva⁷; Alan Carvalho Andrade⁸

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café, CAPES-COFEUCUB e INCT-Café (CNPq/FAPEMIG)

²Bolsista CAPES, Doutorando, gscalves2@posgrad.ufla.br

³Bolsista Consórcio Pesquisa Café, MS, Brasília-DF

⁴Bolsista Consórcio Pesquisa Café, MS, Brasília-DF

⁵Pesquisador, PhD, SupAgro AGAP, Montpellier – FR.

⁶Pesquisador, PhD, CIRAD AGAP, Montpellier – FR.

⁷Pesquisador, PhD, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG.

⁸Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, alan@cenargen.embrapa.br

RESUMO: Em várias espécies vegetais, os genes *DREB* desempenham um papel importante na resposta aos estresses abióticos. A obtenção de marcadores de diversidade fenotípica para assistir aos programas de melhoramento genético é prioritário. Neste contexto, o conhecimento da correlação entre polimorfismo genético e o mecanismo de tolerância à seca pode representar um avanço significativo para o melhoramento de plantas cultivadas. Assim, visando estudar a variabilidade genética presente no gene *DREBID* e desenvolver marcadores funcionais para alelos efetivos, polimorfismos foram caracterizados e identificados após análises de sequências alélicas isoladas de diferentes genótipos do gênero *Coffea*. As análises permitiram identificar polimorfismos na região promotora e codante do gene *DREBID* de *C. canephora* (*CcDREBID*), nos seus ortólogos e homoeólogos. Os polimorfismos encontrados possibilitaram a identificação de diferentes haplótipos. As variações de sequência ortóloga (OSVs) entre *C. canephora* e *C. eugenoides*, assim como, as variações nucleotídicas únicas de homoeólogos (HSVs) entre os subgenomas de *C. arabica*, *C. canephora* (*CaCc*) e *C. eugenoides* (*CaCe*) são apresentadas para o desenvolvimento de marcadores alelo-específico e homoeólogo-específico para este locus.

PALAVRAS-CHAVE: *DREB*, SNP, tolerância à seca, promotor.

AN ANALYSIS OF SEQUENCE VARIABILITY IN *CcDREBID* GENE AMONG DIFFERENT GENOTYPES OF *COFFEA* GENUS

ABSTRACT: In several plant species, the *DREB* genes play a key role in abiotic stress response. The development of markers for phenotype divergence is a major goal in plant breeding. In this regards, knowledge upon the correlation between genotypic polymorphisms and drought tolerance mechanism is a gain for the improvement of agronomic crops. Thus, to study the variability in *DREBID* gene and develop functional markers for effective alleles, we have characterized and identified sequence polymorphisms by isolation and analysis of allelic sequences among different genotypes in *Coffea* genus. With the results achieved it was possible to evaluate the occurrence of polymorphisms in the promoter and coding region of the *C. canephora* gene *CcDREBID*, its orthologous and homoeologous. The polymorphisms found allowed the identification of different haplotypes. The orthologous sequence variants (OSVs) of *C. canephora* and *C. eugenoides* and additionally homologous single-nucleotide variants (HSVs) for *C. arabica* subgenomes, *C. canephora* (*CaCc*) and *C. eugenoides* (*CaCe*) are presented for development of allele and homoeologous specific markers for this locus.

KEYWORDS: *DREB*, single nucleotide polymorphism, drought tolerance, promoter.

INTRODUÇÃO

Estresses abióticos têm um grande impacto sobre a adaptação das plantas e a produção agrícola. A seca, a salinidade e temperatura baixas podem acarretar perdas significativas na produção agrícola e ocasionar a mudança das áreas de cultivo. A associação de polimorfismos às variações fenotípicas para características de interesse agrônomo é um dos principais objetivos para a obtenção de plantas melhores adaptadas fisiologicamente. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) é a forma mais abundante de variação de sequência no genoma e contribuem para uma variedade de aplicações como análise de associação, mapeamento de QTLs e determinação de variabilidade genética entre os indivíduos (Risch e Merikangas 1996; Garcés-Claver *et al*, 2007; Choi *et al*, 2007). Em café, genes responsivos à seca, integrantes de diferentes vias moleculares com funções diversas, foram identificados e descritos por análises da expressão diferencial sob condições de estresse hídrico (Marraccini *et al*, 2012; Viera *et al*, 2013). Neste estudo foi demonstrado que o gene *CcDREBID*, uma forma alélica de *C. canephora*, apresenta um aumento na expressão gênica sob déficit hídrico, em genótipos contrastantes para a resposta seca.

As proteínas DREB/CBFs (*Dehydration responsive element binding/C-repeat binding-factor*) pertencem à superfamília AP2/ERF, participam da via de sinalização e transmissão ABA- independente, e como fator de transcrição podem controlar os genes de resposta ao estresse (Sakuma *et al.*, 2002). Essas proteínas pertencem à subfamília DREB que podem ser dividida em seis subgrupos, A-1 a 6 (Sakuma *et al.*, 2002). A função dos genes *DREB1/CBF* no estresse abiótico tem sido estudada em diversas culturas (Jaglo *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002; Dubouzet *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Xiong and Fei, 2006; Chen *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008; Welling and Palva, 2008; Navarro *et al.*, 2009). Inicialmente, os genes *DREB1* foram descritos como responsivos apenas à baixas temperaturas (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998;), entretanto, Haake *et al.*, (2002) relataram a indução do gene *DREB1D/CBF4* pelo ácido absísico (ABA) exógeno e ao estresse hídrico. Na família DREB, variação na sequência nucleotídica e substituição de aminoácidos têm sido estudadas e descritas (Sakuma *et al.*, 2002; Dubouzet *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2008; Mondini *et al.*, 2012), porém, ainda são escassas as informações sobre a região promotora. Neste presente estudo, relata-se como resultado a identificação de diferentes haplótipos para o gene *DREB1D* obtida pela análise da variabilidade nucleotídica presente na região promotora e codante de sequências alélicas, homólogas e homoeólogas isoladas de trinta genótipos do gênero *Coffea*. As variações de sequência ortóloga (OSVs) entre *C. canephora* e *C. eugenioides*, assim como, as variações nucleotídicas únicas de homoeólogos (HSVs) entre os subgenomas de *C. arabica*, *C. canephora* (*CaCc*) e *C. eugenioides* (*CaCe*) são apresentadas para a validação de marcadores alelo-específico e homoeólogo-específico para este locus.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal:

O material vegetal utilizado foi obtido de uma seleção de genótipos do gênero *Coffea*. Os genótipos foram escolhidos visando obter-se uma cobertura significativa da variabilidade genotípica existente no gênero *Coffea* com base em critérios como recurso genético, origem geográfica, diferenças morfológica e agrônômica. No total, 29 genótipos foram utilizados neste estudo (Tabela 1) para extração do DNAs(g) e amplificação da sequência gênica.

Amplificação do gene *DREB1D*:

As sequências promotoras e da região codante do gene *DREB1D* foram amplificadas separadamente por PCR usando diferentes combinações de primers desenhados após análise da sequência do gene *CcDREB1D* de *C. canephora*. Após amplificados, os fragmentos foram clonados e sequenciados em ambas as direções utilizando primers M13 forward/reverse e os reagentes para sequenciamento do BigDye Terminator Kit v3.1 (ABI 3129xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Para cada genótipo, 16 clones foram sequenciados e um total de 24 sequências foram analisadas para a identificação de polimorfismos.

Análise da variação nucleotídica:

As sequências foram agrupadas em dois clusters, sendo um de sequências promotoras e o outro de sequências codante, e alinhadas com o auxílio do programa SEQMAN 9.1.1 (4). 418 (DNASTAR Version 2.1.0.97, Copyright 2010-2011, Inc.). As variações nucleotídicas, SNPs e INDELS, foram detectadas e confirmadas pela análise visual dos eletroferogramas. A avaliação estatística dos polimorfismos interespecíficos entre os genótipos foi realizada no programa DnaSP versão 5 (Librado e Rozas, 2009). O número de sítios polimórficos S, a diversidade nucleotídica π (Nei, 1987) e o número de sítios segregantes θ (Watterson, 1975) com seus desvios padrões foram estimados para as sequências promotoras e codantes pelo programa DnaSP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificação do gene *DREB1D*:

Sequências, promotoras e da região codante, homólogas ao gene *DREB1D* foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de 29 genótipos. A fim de isolar os alelos de cada genótipo, os produtos de amplificação específica do gene *DREB1D* foram clonados e 16 clones sequenciados. Foram analisados 1510 pb e 868 pb da região promotora e codante, respectivamente. Dois a três alelos foram identificados de acordo com as características de ploidia de cada genótipo.

Análise da diversidade de sequência:

Primeiramente, 928 sequências (29 genótipos x 16 clones x 2 fitas sequenciadas) foram alinhadas e os polimorfismos presentes em 20% ou mais do total de sequências analisadas foram anotados em uma sequência consenso. Posteriormente, a sequência consenso foi utilizada como referência para realizar um novo alinhamento por genótipo para, assim, obter as sequências alelo-específicas. Dentro dos 2378 pb do gene *DREB1D* analisados foi possível identificar 149 SNPs, dos quais 123 estavam presentes na região promotora e 22 na região codante, excluindo inserções e deleções. Inserções e deleções foram encontradas somente na região promotora e representaram um total de 171 sítios. Entre os SNPs identificados, 13 são sinônimos, ou seja, não promovem alteração no aminoácido, e 9 são não sinônimos acarretando em alteração na sequência de aminoácidos, sendo 8 substituições neutras (E41D, V163G, F165S, D168H, G175E, D189E, V191A, G213A) e apenas 1 substituição não neutra, Isoleucina para Treonina (I6T), do sexto

aminoácido da sequência proteica DREB1D. Avaliando-se a diversidade nucleotídica da região codante foi possível identificar 21 haplótipos para todos os genótipos analisados. A diversidade nucleotídica na região promotora foi relativamente maior se comparado à região codante (Figura 1) o que possibilitou identificar 46 haplótipos para o grupo de genótipos analisados.

Table 1 Genótipos do gênero *Coffea* utilizados neste estudo e suas descrições.

Genótipo	Ploidia	Haplótipo	Genótipo	Ploidia	Haplótipo	Espécie
1. Acaia 47119	4x	hp02; hp01	10. Mundo novo	4x	hp01; hp32	<i>C. arabica</i>
2. Bourbon	4x	hp03; hp04; hp05	11. Obatã	4x	hp01; hp19	<i>C. arabica</i>
3. Catuai 25	4x	hp01; hp05	12. Palma 02	4x	hp01; hp33; hp34	<i>C. arabica</i>
4. Catuai 144	4x	hp12; hp13; hp14	13. Purpurenses	4x	hp01; hp05	<i>C. arabica</i>
5. E238	4x	hp01; hp18; hp19	14. Rubi	4x	hp01; hp37	<i>C. arabica</i>
6. Guatemalense Baixo	4x	hp26; hp27; hp28	15. Sabiá	4x	hp05; hp38	<i>C. arabica</i>
7. Guatemalense Alto	4x	hp24; hp25	16. San Bernardo	4x	hp01; hp05; hp39	<i>C. arabica</i>
8. IAPAR 59	4x	hp01; hp19	17. San Ramon Baixo	4x	hp01; hp40	<i>C. arabica</i>
9. Ikatú Colombiano	4x	hp29; hp29; hp31	18. Tupi	4x	hp04; hp19	<i>C. arabica</i>
19. Typica	4x	hp01; hp42				<i>C. arabica</i>
20. C1007	2x	hp06; hp07	24. Clone 22	2x	hp15; hp17	<i>C. canephora</i>
21. C2011	2x	hp08; hp09	25. G2020	2x	hp22; hp23	<i>C. canephora</i>
22. C2901	2x	hp10; hp11	26. UW002	2x	hp43; hp44	<i>C. canephora</i>
23. Clone 14	2x	hp15; hp16	27. UW099	2x	hp45; hp46	<i>C. canephora</i>
28. Psilanthus	2x	hp05; hp35; hp36				<i>C. benghalens</i>
29. Eugenioides	2x	hp20; hp21				<i>C. eugenioides</i>

Análise dos elementos cis:

As sequências promotoras do gene *DREB1D* foram analisadas quanto à ocorrência dos motivos *cis* de regulação do DNA. Elementos *cis* característicos de promotores foram encontrados como, TATA-, CATA- e CGCG-BOX. Outros elementos *cis* comumente encontrados em promotores de genes responsivos ao déficit hídrico também foram observados, entre os quais, os motivos ABRE, MYB e MYC (Figura 1), regulados pelos fatores de transcrição pertencentes às famílias b-ZIP e MYC, respectivamente.

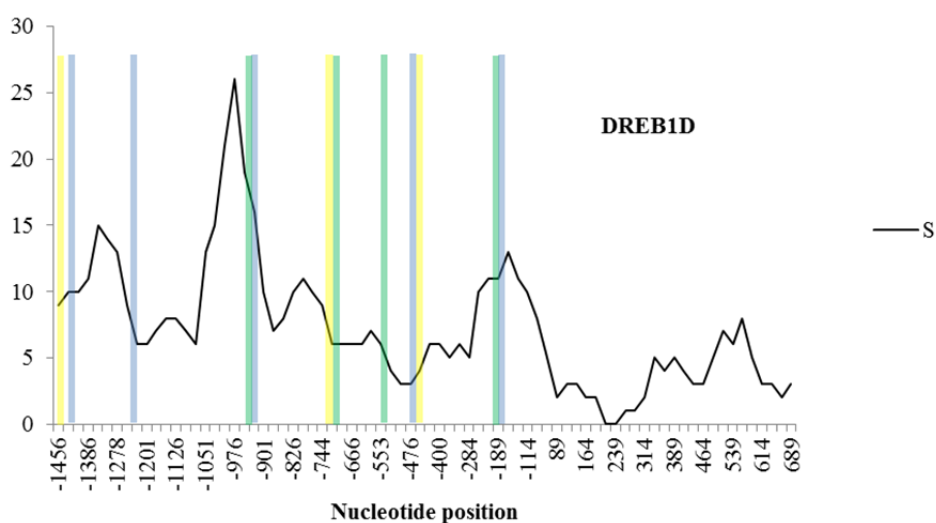


Figure 1 Número de sítios polimórficos (S) encontrados no gene *DREB1D* entre os genótipos analisados. Estão representadas as posições -1 a -1456 da região promotora e +1 a +738 da região codante. As colunas marcadas indicam a posição de alguns elementos *cis* de regulação encontrados na região promotora do gene. Os elementos *cis* indicados são: ABRE-Like (amarelo); MYB (azul) e MYC (verde).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, M.; WANG, Q.-Y.; CHENG, X.-G.; XU, Z.-S.; LI, L.-C.; YE, X.-G.; MA, Y.-Z. (2007). GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and biophysical research communications*, 353(2), 299–305.
- CHOI, D.-W.; RODRIGUEZ, E. M.; CLOSE, T. J. (2002). Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant physiology*, 129(4), 1781–7.
- CHOI, I.-Y.; HYTEN, D. L.; MATUKUMALLI, L. K.; SONG, Q.; CHAKY, J. M.; QUIGLEY, C. V., CREGAN, P. B. (2007). A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. *Genetics*, 176(1), 685–96.
- DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. G.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L.; encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 33(4), 751–63.
- GARCÉS-CLAVER, A.; FELLMAN, S. M.; GIL-ORTEGA, R.; JAHN, M.; ARNEDO-ANDRÉS, M. S. (2007). Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *TAG. Theoretical and applied genetics.*; 115(7), 907–16.
- GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; STOCKINGER, E. J.; SALAZAR, M. P.; HOUGHTON, J. M.; THOMASHOW, M. F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 16(4), 433–42.
- HAAKE, V.; COOK, D.; RIECHMANN, L.; PINEDA, O.; THOMASHOW, M. F.; ZHANG, J. Z.; CALIFORNIA, V. H. (2002). Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in Arabidopsis 1, 130(October), 639–648.
- JAGLO, K. R.; KLEFF, S.; AMUNDSEN, K. L.; ZHANG, X.; HAAKE, V.; ZHANG, J. Z.; THOMASHOW, M. F. (2001). Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant physiology*, 127(3), 910–7.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(11), 1451–2.
- LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 10(8), 1391.
- MARRACCINI, P.; VINECKY, F.; ALVES, G. S. C.; RAMOS, H. J. O.; ELBELT, S.; VIEIRA, N. G.; ... ANDRADE, A. C. (2012). Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *Journal of experimental botany*, 1–22.
- MONDINI, L.; NACHIT, M.; PORCEDDU, E.; PAGNOTTA, M. A. (2012). Identification of SNP mutations in DREB1, HKT1, and WRKY1 genes involved in drought and salt stress tolerance in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var durum). *Omics: a journal of integrative biology*, 16(4), 178–87.
- NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant physiology*, 149(1), 88–95.
- NAVARRO, M.; MARQUE, G.; AYAX, C.; KELLER, G.; BORGES, J. P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C. (2009). Complementary regulation of four Eucalyptus CBF genes under various cold conditions. *Journal of experimental botany*, 60(9), 2713–24.
- NEI, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. Retrieved from <http://books.google.co.uk/books?id=UhrSsLkjdGc>
- RISCH, N.; MERIKANGAS, K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5281), 1516–7.
- SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(3), 998–1009.
- SHEN, Y.-G.; ZHANG, W.-K.; YAN, D.-Q.; DU, B.-X.; ZHANG, J.-S.; LIU, Q.; CHEN, S.-Y. (2003). Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 107(1), 155–61.
- WATTERSON, G. A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical population biology*, 7(2), 256–76.
- WEI, B.; JING, R.; WANG, C.; CHEN, J.; MAO, X.; CHANG, X.; JIA, J. (2008). Dreb1 genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs. *Molecular Breeding*, 23(1), 13–22.
- WELLING, A.; PALVA, E. T. (2008). Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch. *Plant physiology*, 147(3), 1199–211.

- XIAO, H.; TATTERSALL, E. A. R.; SIDDIQUA, M. K.; CRAMER, G. R.; NASSUTH, A. (2008). CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant, cell & environment*, 31(1), 1–10.
- XIONG, Y.; FEI, S.-Z. (2006). Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Planta*, 224(4), 878–88.
- ZHANG, X.; FOWLER, S. G.; CHENG, H.; LOU, Y.; RHEE, S. Y.; STOCKINGER, E. J.; THOMASHOW, M. F. (2004). Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 39(6), 905–19.