

ANÁLISE FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CcDREB1D* DE DOIS GENÓTIPOS DE *Coffea canephora* POR MEIO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Nicotiana tabacum*¹

Sinara Oliveira de Aquino², Karoline Estefani Duarte³, Gabriel Sérgio Costa Alves⁴, Pierre Marraccini^{5,6}, Alan Carvalho Andrade⁶

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

² Bolsista CAPES, Mestranda, sinarinha2009@gmail.com

³ Bolsista CAPES, Mestranda, karollduarte31@gmail.com

⁴ Bolsista CAPES, Doutorando, gscalves2@posgrad.ufla.br

⁵ Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Montpellier – FR, marraccini@cirad.fr

⁶ Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, alan.andrade@embrapa.br

RESUMO: Apesar de alguns estudos em fisiologia vegetal resultarem em uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância à seca em cafeeiro, ainda é escasso o conhecimento acerca das alterações metabólicas e moleculares envolvidas na resposta às condições de déficit hídrico nesta espécie. Neste sentido, estudos recentes permitiram a identificação de vários genes candidatos que apresentaram expressão diferencial entre genótipos contrastantes para essa característica. Dentre esses, encontram-se genes integrantes da via de resposta ao estresse hídrico, previamente identificados em outras espécies vegetais, tais como os fatores de transcrição *DREB*. Resultados prévios obtidos, analisando a expressão relativa do gene *CcDREB1D* nos clones 14 (tolerante à seca) e 22 (sensível à seca) de *Coffea canephora* var. Conilon demonstraram expressão diferencial desse gene em folhas de plantas submetidas ou não a seca. Polimorfismos na região promotora do gene *CcDREB1D* foram também identificados e podem indicar a participação de diferentes haplótipos no controle genético da tolerância à seca. Várias deleções 5' da região promotora do gene *CcDREB1D* foram feitas e clonadas no vetor binário pBI101 como objetivo de analisar o papel dos polimorfismos identificados no promotor do gene *CcDREB1D* na expressão do gene repórter *uidA* codificando para a β -glucuronidase por meio da transformação genética de *Nicotiana tabacum*.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea canephora*, DREB, promotor, transformação gênica, tolerância à seca.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PROMOTER REGION OF THE GENE *CcDREB1D* OF TWO GENOTYPES OF *Coffea canephora* THROUGH GENETIC TRANSFORMATION OF *Nicotiana tabacum*

ABSTRACT: Although some studies in plant physiology resulted in a better understanding of the mechanisms involved in drought tolerance in coffee, is still scant knowledge about the metabolic and molecular changes involved in the response of the coffee plant water deficit conditions. In this sense, recent studies have allowed the identification of several candidate genes that showed differential expression between genotypes contrasting to this trait. Among these genes are members of via to respond to water stress, previously identified in other plant species, such as the *DREB* transcription factors. Previous results obtained by analyzing the relative expression of the gene *CcDREB1D* of 14 clones (drought tolerant) and 22 (sensitive to drought) of *Coffea canephora* var. Conilon showed differential expression of this gene in plant leaves under drought or not. Polymorphisms in the promoter region of the gene *CcDREB1D* were also identified and may indicate the participation of different haplotypes in the genetic control of drought tolerance. Several deletions 5' of the promoter region of the gene *CcDREB1D* were made and cloned in the binary vector pBI101 how to analyze the role of polymorphisms identified in the promoter gene *CcDREB1D* in *uidA* reporter gene expression coding for β -glucuronidase by means of genetic transformation of *Nicotiana tabacum*.

KEY WORDS: *Coffea canephora*, DREB, promoter, genetic transformation, drought tolerance.

INTRODUÇÃO

As condições climáticas desfavoráveis e a crescente expansão da cafeicultura para regiões marginais contribuem significativamente para a redução da produtividade, tornando à seca o principal estresse abiótico que afeta a produção dos países cafeicultores. Em regiões de cultivo de café sem irrigação, períodos de seca intensa podem representar uma redução de até 80% da área de plantio (DAMATTA e RAMALHO, 2006). No caso de seca severa, a floração pode ser afetada, levando ao aborto de frutos em desenvolvimento, ou até mesmo causar a morte da planta. Como consequência do aumento de temperatura, regiões cafeicultoras podem sofrer também deslocalização geográfica (ASSAD *et al.*, 2004), levando a importantes problemas ambientais, econômicos e sociais. A possibilidade de produção de plantas transgênicas abre novas perspectivas ao melhoramento convencional, permitindo a rápida incorporação de

características desejáveis às espécies perenes (RIBAS *et al.* 2006). Genes induzidos por estresse têm contribuído para a caracterização de promotores valiosos potencialmente úteis na engenharia genética para a expressão direcionada sob condições controladas (CRUCES, 2004), evitando os efeitos secundários indesejáveis na ausência do estresse e o silenciamento gênico às vezes resultante da utilização de promotores constitutivos. Além disso, a transgenia de plantas tem sido uma estratégia interessante para analisar a regulação dos elementos *cis* em regiões promotoras e à indução desses genes responsivos ao estresse hídrico. Genes candidatos (GCs) para tolerância à seca foram descritos em estudos anteriores em *C. arabica* (FREIRE 2010; FREIRE *et al.*, 2013; MARRACCINI *et al.*, 2009) e *C. canephora* (MARRACCINI *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2013). Esses esforços levaram à identificação de vários genes diferencialmente expressos como o gene *CcDREB1D* de *C. canephora* var. conilon que apresentou uma alta expressão em condições de seca no clone 14 (tolerante à seca) enquanto a sua expressão ficou baixa nas folhas do clone 22 (susceptível à seca) (MARRACCINI *et al.*, 2012). Esta expressão diferencial entre os clones pode ser relacionada com a presença de polimorfismos nucleicos encontrados na região promotora do gene *CcDREB1D* (Alves, 2011). O presente trabalho visa avaliar a funcionalidade da sequência promotora do gene *CcDREB1D* por meio da capacidade dessas sequências em controlar a expressão do gene repórter β -glucuronidase (*uidA*) em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Alves (2011) em seu trabalho, identificou polimorfismos nas regiões promotoras do gene *CcDREB1D* nos clones 14 (nos dois alelos) e 22 (em um alelo) assim, objetivando compreender a expressão diferencial do gene *CcDREB1D*, o mesmo realizou uma série de três deleções 5' do promotor (Figura 1) (-1466 / 1, -1113 / 1 e -762 / +1) de haplótipos 15 (HP15), 16 (HP16) e 17 (HP17) e estas foram amplificadas e clonadas no vetor binário pBI101, acima do gene repórter *uidA* codificando para a β -glucuronidase. Os vetores binários recombinantes foram nomeados da seguinte maneira: pD14-hp15 P, pD14-hp15 D, pD14-hp16 P, pD14-hp16 M, pD14-hp16 D, pD22-hp17 P e pD22-hp17 D, sendo P (-762/+1), M (-1113/+1), D (-1466/+1). Cada plasmídeo recombinante e os controles (pBI21: positivo e pBI101: negativo) foram introduzidos em *E. coli* XL10 GOLD para multiplicação do plasmídeo e em seguida introduzidos em *A. tumefaciens* EHA 105 para transformação genética em tabaco. Sementes de *Nicotiana tabacum* CVSRI foram esterilizadas com hipoclorito 1% e tween-20 e semeadas individualmente em frascos de vidro contendo o meio MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 2.5 g L⁻¹ de phytigel. As culturas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas à 27±1°C por 4 semanas. Os ensaios de transformação de tabaco foram feitos de acordo com Horsch *et al.* (1988).

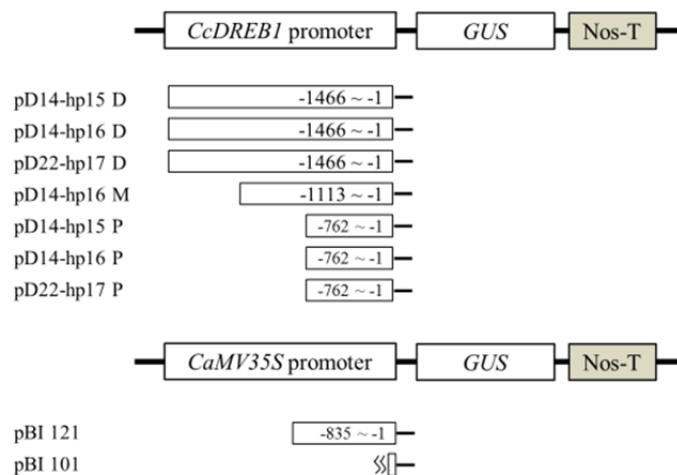


Figura 1. Mapa esquemático dos vetores binários recombinantes utilizados neste estudo. Fonte Alves, 2011

RESULTADOS

A transformação de *E. coli* XL10 utilizando os diferentes plasmídeos recombinantes ocorreu de forma eficiente podendo ser visualizada por meio do crescimento de colônias bacterianas submetidas à pressão de seleção em meio de cultura contendo canamicina. A integridade do DNA plasmidial obtido destas colônias via miniprep, foi verificada por PCR com o par de *primers* RevMax/pBIrev, gerando fragmentos com os tamanhos esperados (Figura 2).

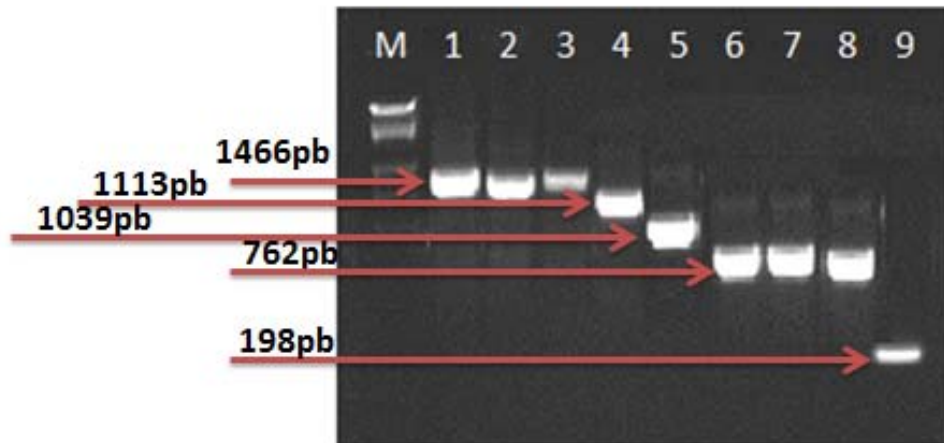


Figura 2. Produtos de PCR amplificados com o par de *primers* RevMax/pBIrev. M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker; pD14-hp15D (1); pD14-hp16D (2); pD22-hp17D (3); pD14-hp16M (4); pB121 (5); pD14-hp15P (6); pD14-hp16P (7); pD22-hp17P (8) e pB101 (9).

A integridade do DNA plasmidial recombinante das colônias de *A. tumefaciens* EHA 105 foi verificada por PCR com os pares de *primers* GUSfor/rev (Figura 3A), NPTfor/rev (Figura 3B) e RevMax/pBIrev (Figura 3C) que permitiram verificar e caracterizar a presença do gene *uidA*, do gene de tolerância a canamicina e dos promoters DREB inseridos nas diferentes construções, respectivamente. Essas reações de PCR permitiram também averiguar que não houve rearranjo dos plasmídeos, após a transferência deles de *E. coli* para *A. tumefaciens*.

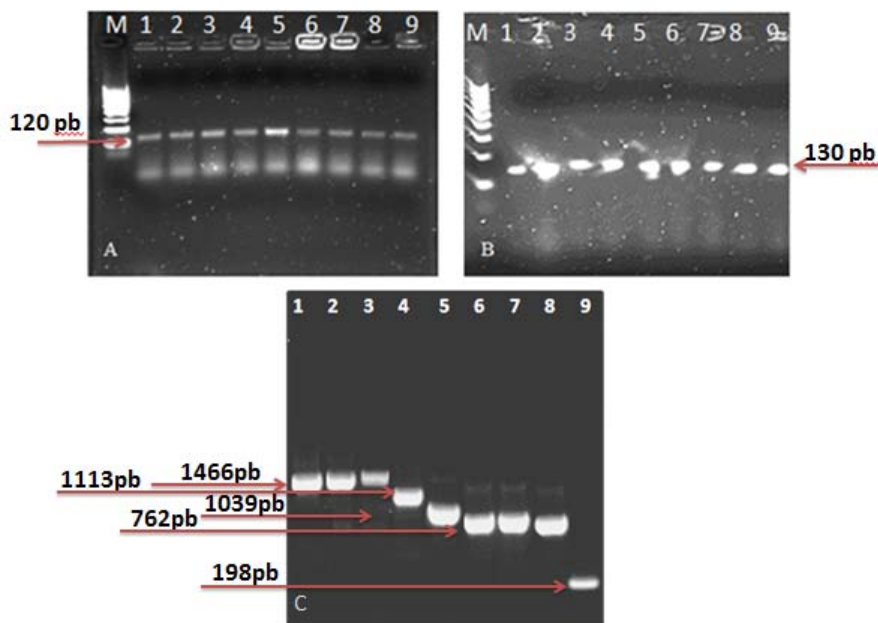


Figura 3 Produtos de PCR amplificados a partir de colônias de *A. tumefaciens* analisados com os pares de *primers* GUSfor/rev (A), NPTfor/rev (B) e RevMax/pBIrev (C) a partir de colônia transformadas com os vetores pD14-hp15D (1), pD14-hp16D (2), pD22-hp17D (3), pD14-hp16M (4), pD14-hp15P (6), pD14-hp16P (7) e pD22-hp17P (8). As colônias transformadas com os vetores pB121 (5: controle positivo) e pB101 (9: controle negativo) foram também analisadas. M: marcador de peso molecular de 100pb.

Tabela 1: Sequência dos *primers* usados nas PCRs

Nome	Sequência
pBIrev	5'GCTTTCCCACCAACGCTGATCAAT3'
RevMax	5'CACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTA3'
GUSfor	5'GCACTAGCGGGACTTTGCAA3'
GUSrev	5'CGCGAAGCGGGTAGATATCA3'
NPTfor	5'CCTGATGCACTCCGCATACA3'
NPTrev	5'GCACTTTGAACGGCATGATG3'

Para se iniciar o processo de transformação de *Nicotiana tabacum* CVSRI, foi necessário o estabelecimento de plantas advindas de sementes. Indivíduos com um mês de idade tiveram suas folhas coletadas para os ensaios de transformação (Figura 4A). Procedeu-se com o cultivo de segmentos foliares exercendo uma pressão de seleção com canamicina presente no meio de cultivo (Figura 4B), o que provocou a morte de aproximadamente 30% do material vegetal. O material que sobreviveu desdiferenciou-se em calos (Figura 4C) a partir dos quais se desenvolveram brotações a cerca de quatro semanas após o co-cultivo (Figura 4D). Essas brotações foram transferidas para meio de enraizamento (Figura 4E), o que permitiu, após aproximadamente três semanas, o desenvolvimento de raízes (Figura 4F).

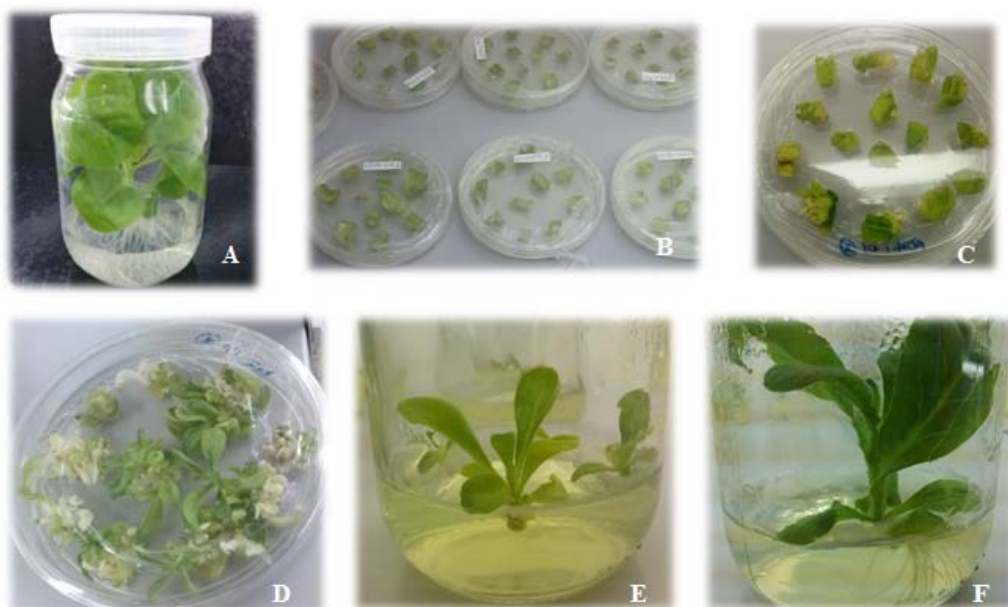


Figura 2. Estágios da cultura de tecidos envolvendo *Nicotiana tabacum*: (A) plântula estabelecida a partir de semente, (B) explantes excisados após a co-cultura (C-D), brotos regenerando a partir dos fragmentos foliares transformados e plântulas em meio de enraizamento (E-F).

CONCLUSÕES

As plântulas foram estabelecidas e regeneradas de maneira eficiente o que deverá permitir a obtenção de cerca de cinco a dez eventos por cada construção, possibilitando assim a realização de testes de atividade de GUS, com várias repetições biológicas. Essas plantas serão utilizadas para avaliar a funcionalidade das regiões promotoras do gene *CcDREB1D* através do monitoramento da atividade enzimática GUS resultando da expressão do gene repórter *uidA* por ensaios histoquímicos e fluorimétricos. Se a atividade não for detectada, experimentos visando a confirmar a presença do T-DNA nestas plantas serão realizados usando o DNA genômico que será testado por PCR com os pares de *primers* previamente descritos neste trabalho. Uma vez confirmada a integração genômica, essas plantas transformadas ou os explantes delas serão testados em várias condições (tais como a exposição à variações de temperaturas, à seca, salinidade, à adição de ABA exógeno ou análise destas plantas em cultivo hidropônico, na presença de polietilenoglicol, o que deverá favorecer o funcionamento das regiões promotoras do gene *CcDREB1D*, e conseqüentemente, permitirá detecção da atividade enzimática GUS. Caso for observada uma atividade enzimática GUS durante esses experimentos, será possível estudar a expressão do gene repórter *uidA* pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), por exemplo. O número de cópias do T-DNA nas plantas transgênicas T0 de *Nicotiana tabacum* poderá ser também avaliada pela análise da segregação da tolerância à canamicina das plantas T1. Por meio desses experimentos, pretende-se deduzir os efeitos dos polimorfismos detectados nos promotores do gene *CcDREB1D* dos clones 14 e 22 na regulação desses promotores de caféiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.S.C. Identificação e análise de polimorfismos na região promotora do gene *DREB* em vários genótipos do gênero *coffea*. **Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras**, 2011.
- ASSAD, E. D. *et al.* Climatic changes impact in agroclimatic zoning of coffee in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, 2004.
- DAMATTA, F.; RAMALHO, J. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 55-81, 2006.
- CRUCES, L. Invited review : Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. **In Vitro**: p. 1-22, 2004.
- FREIRE, L. P. Análise de polimorfismos nucleicos e estudo da expressão de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro. **Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras**, 2010.
- FREIRE, L. P. *et al.* Análise da expressão do gene manose 6 fosfato redutase em cafeeiros submetidos ao déficit hídrico. **Coffee Science**, v. 8, n. 1, p. 17-23, 2013
- HORSCH R.B. *et al.* Plant Molecular Biology Manual. **Kluwer Academic Publishers**, p. A5/1–A5/9, 1988.
- MARRACCINI, P. *et al.* Differentially expressed genes and proteins upon drought stress in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, 2012.
- MARRACCINI, P. *et al.* Identificação de genes com expressão diferencial em folhas de cafeeiro *Coffea canephora* e *Coffea arabica* submetidas à diferentes condições de estresse hídrico. **VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2009.
- RIBAS, A. F.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 83-94, 2006.
- VIEIRA, N. G. *et al.* Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**, DOI 10.1007/s12042-013-9126-0, 2013.