



**KAROLINE ESTEFANI DUARTE**

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE ÓRFÃO  
*CcUNK8* DE *Coffea canephora* VIA  
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE  
*Setaria viridis***

**LAVRAS – MG**

**2014**

**KAROLINE ESTEFANI DUARTE**

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE ÓRFÃO *CcUNK8* DE *Coffea*  
*canephora* VIA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Setaria viridis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Pierre Marraccini

Coorientador

Dr. Alan Carvalho Andrade

**LAVRAS-MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Duarte, Karoline Stefani.

Análise funcional do gene órfão CcUNK8 de *Coffea canephora*  
via transformação genética de *Setaria viridis*/ Karoline Estefani

Duarte. – Lavras : UFLA, 2014.

86 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Pierre Roger Marraccini.

Bibliografia.

1. *Coffea*. 2. Expressão gênica. 3. Genes órfãos. 4. Resistência à  
seca. 5. *Setaria viridis*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.7323

**KAROLINE ESTEFANI DUARTE**

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE ÓRFÃO *CcUNK8* DE *Coffea*  
*canephora* VIA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Setaria viridis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de Julho de 2014.

Dr. Alan Carvalho Andrade	EMBRAPA Cenargen
Dr. Adilson Kenji Kobayashi	EMBRAPA Agroenergia
Dr. Hugo Bruno Correa Molinari	EMBRAPA Agroenergia

Dr. Pierre Marraccini  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2014**

**DEDICO**

Aos meus pais, Lauro e Berenice, que sonham comigo cada etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me conduzir pelo seu caminho e guardar a minha vida.

Aos meus pais, Lauro e Berenice, que me fortalecem a cada dia e me incentivam sempre buscar os meus sonhos, vocês são um dos motivos que me mantêm de pé mesmo quando tudo diz que não.

Às famílias Duarte e Silva por me ajudarem a traçar este caminho, apoiar-me e amparar-me. Vocês estão sempre na minha mente e fazem parte de todas as recordações que levarei comigo.

Às minhas amigas de uma vida toda, que me sustentam mesmo estando a distancia. Amanda, Andressa, Nathália, Pâmella e Lorena, sem as intermináveis conversas por telefone este trabalho não teria sido realizado. Vocês renovam as minhas energias e só me fazem bem!

Às novas amigas que foram construídas em Lavras. Aline e Joana, esta cidade se tornou inesquecível graças à companhia de vocês.

A todas do LGM que me acompanharam e estiveram ao meu lado durante todos os momentos.

A todos que me auxiliaram durante esta jornada, meus professores, Júlio e Ana Paula e todos do saudoso LBCM, que me ajudaram a iniciar a jornada acadêmica.

Aos pesquisadores da EMBRAPA/Agroenergia que dispuseram do seu tempo para me acompanhar e sempre agregar mais conhecimento ao trabalho realizado.

Ao Dr. Alan Andrade e ao Dr. Pierre Marraccini que me acolheram e se dispuseram a me ensinar, pela sua disponibilidade e pelo acompanhamento exercido durante a execução do trabalho.

À UFLA e ao programa de Biotecnologia Vegetal, por me dar a oportunidade de realizar um sonho.

*“Superar é preciso  
Seguir em frente é essencial  
Olhar pra trás é perda de tempo  
Passado se fosse bom era presente”*

***Clarice Lispector***

## RESUMO

O cafeeiro é um dos mais valiosos produtos primários no comércio mundial. Em razão dessa importância econômica, o cafeeiro vem sendo alvo de programas de melhoramento genético visando à introdução de novos caracteres para obtenção de plantas com características agrônomicas superiores, por exemplo, com uma maior tolerância à seca. Porém, como melhoramento convencional do cafeeiro é demorado, o uso das últimas técnicas de genômica está sendo desenvolvido para acelerar a criação de novas plantas. Assim, o sequenciamento do genoma e, também, o sequenciamento em larga escala de genes expressos (RNAseq) torna-se algo necessário para analisar o determinismo genético da tolerância à seca e identificar genes candidatos (GCs) atuantes neste determinismo. No cafeeiro, mas também em outras plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e microrganismos, pelas análises dos projetos de sequenciamento demonstra-se uma alta porcentagem (cerca de 20-30%) de genes considerados *no hits*, ou seja, genes para os quais nenhuma similaridade com as sequências depositadas nos bancos de dados é encontrada. Em *Coffea canephora* e *Coffea arabica* foram identificados e caracterizados alguns genes *no hits*. Alguns desses genes possuem um perfil de expressão onde se observa *in silico* uma distribuição heterogênea quanto a tecidos e tratamentos utilizados, como é o caso do *no hit* 33656. Infere-se que *no hits* possam ter se originado de processos de especiação, portanto poderiam estar interligados a vias de resposta únicas de organismos tolerantes ou susceptíveis a uma dada condição. Pelos dados de qPCR mostra-se que o *no hit* *CcUNK8* apresentou maior expressão em folhas estressadas quando comparado a folhas controle de *C. canephora* sendo um gene candidato à tolerância à seca e foi, então, selecionado para transformação genética utilizando *Setaria viridis* como planta modelo. O T-DNA contendo o gene *CcUNK8* foi inserido em plantas de *Setaria viridis* via *Agrobacterium tumefaciens* e a expressão deste gene foi quantificada por meio de qPCR nos eventos primários de transformação. Em alguns eventos foi observado um acúmulo de biomassa maior de parte aérea e radicular que indivíduos não transformados. Foram observadas, ainda, diferenças no acúmulo de biomassa entre o mesmo evento quando submetido ao tratamento irrigado e não-irrigado.

Palavras-chave: *Coffea*. Expressão gênica. Genes órfãos. Seca. *Setaria viridis*. Transformação genética.

## ABSTRACT

The coffee tree is one of the most valuable crops in the world economy, the reason why it has been the target of genetic improvement programmes performed aiming to insert new characters in the obtainment of plants containing superior agronomic characteristics such as greater drought tolerance. Because the conventional genetic improvement of coffee tree is time consuming, the use of the latest techniques in genomics is being developed to speed up the process of creating novel plants. Thus, the genome sequencing, and the large-scale sequencing of expressed genes becomes necessary for analyzing the genetic determinism of drought tolerance, and to identify candidate genes for this determinism. By analysing sequencing projects for crops such as *Coffea spp.*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* was found a percentage of about 20-30% of no-hit genes, for which there is no similarity with sequences deposited in the GenBank. For *Coffea canephora* e *Coffea arabica* were identified and characterized several *no-hit* genes, such as the *no-hit* 33656, some of them have a expression profile on which it finds, *in-silico*, a heterogeneous distribution in relation to tissues and treatments. These *no-hits* may have originated from the processes of speciation, which could be linked to single response pathways of tolerant or susceptible organisms for a given condition. The *no-hit* CcUNK8 showed greater expression for material obtained from water-stressed leaves than from leaves of *C. canephora*. This *no-hit* is, thus, a candidate gene to drought tolerance, and was selected for genetic transformation using *Setaria viridis* as the model plant, in which was inserted the T-DNA containing this gene via *Agrobacterium tumefaciens*, and its expression was quantified by qPCR in the primary transformation events. In some of these events was found greater biomass accumulation for leaves and roots than for non-transformed individuals. Yet, by comparing the irrigated with the non-irrigated treatment, was found differences in the biomass accumulation within the same transformation event.

Key-words: *Coffea*. Gene expression. Orphan genes. Drought tolerance. *Setaria viridis*. Genetic transformation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Origem geográfica na África dos principais grupos genéticos de *C. canephora* .....26
- Figura 2 História evolutiva do alotetraploide *C. arabica*. (A) Origem de *C. arabica*. Os genomas dos progenitores estão representados pelos diploides *C. eugenioides* e *C. canephora*. *C. arabica* surgiu entre 1 e 2 milhões de anos atrás com base no cruzamento de *C. canephora* (ou espécies relacionadas) e *C. eugenioides*. (B) Origem das principais cultivares de *C. arabica* .....28
- Figura 3 Distribuição de genes órfãos e não órfãos em diferentes tecidos de *Oryza sativa* .....31
- Figura 4 Mecanismos de formação de novos genes, que podem ocorrer por quatro processos distintos .....33
- Figura 5 Fatores pelos quais pode ocorrer surgimento de novidades evolutivas .....34
- Figura 6 Visão geral do algoritmo OrthoMCL.....36
- Figura 7 Expressão gênica *in silico* dos genes *No hits* nas bibliotecas de cDNA de *C. canephora* (CC) obtidas com base no tecido total (CC-TEC TOTAL), de callus (CC- CALLUS), de frutos (CC- FRUTO), de folhas (CC- FOLHA) e (parte direita da figura) de folhas de plantas irrigadas (CC-FOLHA CONTROLE) ou de plantas não irrigadas (CC- FOLHA ESTRESSA) (VIEIRA, 2013). A posição do gene *CcUNK8* nos Northern eletrônicos é indicada por uma seta ..39
- Figura 8 Quantificação relativa avaliada por PCR quantitativa (qPCR) da expressão dos genes *CcUNK8*, *CcUNK1* e *CcUNK10*, nas folhas dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (clone 22) de *C.*

	<i>canephora</i> Conilon cultivadas com (I) ou sem (NI) irrigação. O gene <i>CcUBQ10</i> foi utilizado como controle endógeno.....	41
Figura 9	Mapa do vetor pUBI: <i>CcUNK8</i> utilizado na transformação de plantas de <i>S. viridis</i> . O T-DNA delimitado pelas bordas direita (RB) e esquerda (LB), contém os promotores p2x35S e ZmUbi-1 que controlam a expressão do gene <i>hptII</i> e do cDNA <i>CcUNK8</i> , respectivamente. O plasmídeo utilizado para clonagem é o pVS1. O gene <i>aadA</i> (Sm/Sp), por conferir a resistência aos antibióticos espectinomomicina e streptomomicina é usado para a seleção das bactérias ( <i>E. coli</i> e <i>A. tumefaciens</i> ) recombinantes veiculando o vetor pUBI: <i>CcUNK8</i> .....	44
Figura 10	Medições realizadas nas plantas T <sub>1</sub> de <i>S. viridis</i> para análises de fenologia. Os parâmetros observados e representados na figura foram altura (1), comprimento da lâmina foliar (2) e largura da lâmina foliar (3), número de inflorescências (4).....	53
Figura 11	Caracterização molecular das plantas T <sub>0</sub> de <i>S. viridis</i> por PCR convencional .....	56
Figura 12	Caracterização molecular das plantas T <sub>2</sub> de <i>S. viridis</i> por PCR convencional .....	57
Figura 13	Expressão do cDNA <i>CcUNK8</i> analisado por RT-qPCR em folhas das plantas T <sub>0</sub> de <i>S. viridis</i> transformadas com o vetor pUBI: <i>CcUNK8</i> .....	59
Figura 14	Variação média de altura (cm) de plantas T <sub>1</sub> de <i>S. viridis</i> transformadas com o vetor pUBI: <i>CcUNK8</i> e as plantas não transformadas (WT). As medidas foram realizadas durante o período de 6 semanas, com um ponto de coleta de dados semanal.	63

- Figura 15 Número médio de perfilhos das plantas T<sub>1</sub> de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* e indivíduos não transformados (WT). Dados obtidos na 6<sup>a</sup> semana de análise dos eventos transformados e controle não transformado.....64
- Figura 16 Peso fresco médio (g) da parte aérea de plantas T<sub>1</sub> de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* e indivíduos não transformados (WT). Dados obtidos na 6<sup>a</sup> semana de coleta de dados dos indivíduos transformados e não transformados .....65
- Figura 17 Aspecto visual das plantas T<sub>2</sub> de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*. Após germinar *in vitro*, as plantas Higro<sup>T</sup> foram cultivadas em condições controladas (RH, fotoperíodo, T°C durante 32 dias com irrigação.....66
- Figura 18 Aspecto visual das plantas T<sub>2</sub> de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* aos 39 dias após a germinação. Grupos de plantas de cada genótipo foram submetidos à irrigação (I) ou à suspensão da irrigação (NI) considerando 32 dias após a germinação.....67
- Figura 19 Expressão do cDNA *CcUNK8* analisado por RT-qPCR em folhas das plantas T<sub>2</sub> de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*. A expressão foi obtida utilizando quatro eventos transformados (54, 56, 60, 62) e controle não transformado (WT) na condição de irrigação (I) e não irrigação (NI). Os transcritos foram standardizados utilizando a expressão do gene de referência *SiUBC F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub>* que codifica para a proteína ubiquitina. Os valores de expressão relativa (expressos em unidades arbitrárias) foram realizados em três repetições técnicas. Os resultados foram expressos utilizando o evento n° 54 I como calibrador interno (expressão relativa =1).....69

Figura 20	Índice de concentração de clorofila (ICC) em folhas das plantas T <sub>2</sub> de <i>S. viridis</i> não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI: <i>CcUNK8</i> .....	71
Figura 21	Média dos pesos frescos (PF em gr.) de raiz (A) e parte aérea (B) de plantas de <i>S. viridis</i> não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI: <i>CcUNK8</i> .....	73
Figura 22	Número médio de perfilhos das plantas T <sub>2</sub> de <i>S. Viridis</i> não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI: <i>CcUNK8</i> aos 39 dias após a germinação. Os eventos transformados (54, 56, 60 e 62) com <i>CcUNK8</i> e não transformado (WT), sob 7 dias dos tratamentos irrigado (I) [isobarras brancas] e não-irrigado (NI) [isobarras pretas].....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pares de primers utilizados para caracterização molecular e qPCR. O par de primer <i>SiDH</i> F <sub>1</sub> /R <sub>1</sub> foi utilizado para caracterização molecular. Os primers <i>SiSDH</i> F <sub>2</sub> /R <sub>2</sub> e <i>SiUBC18</i> F <sub>11</sub> /R <sub>11</sub> foram utilizados na análise de expressão por qPCR por apresentarem um <i>melting curve</i> com características melhores. O par de primer <i>CcUNK8</i> foi utilizado na caracterização molecular e qPCR. Os pares de primers são desenhados com base nas sequências de <i>Setaria italica</i> ( <i>Si</i> ).....50
Tabela 2	Análise de segregação do gene <i>hptII</i> na progênie T <sub>1</sub> das plantas transgênicas de <i>S. viridis</i> transformadas com pUBI: <i>CcUNK8</i> .....61
Tabela 3	Análise de segregação do gene <i>hptII</i> na progênie T <sub>2</sub> das plantas transgênicas de <i>S. viridis</i> transformadas com pUBI: <i>CcUNK8</i> .....62
Tabela 4	Potencial hídrico (MPa) em folhas de plantas T <sub>2</sub> de <i>S. viridis</i> não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI: <i>CcUNK8</i> .....68
Tabela 5	Variáveis componentes da arquitetura do sistema radicular de plantas de <i>S. viridis</i> não transformadas (WT) e transformadas com o cDNA <i>CcUNK8</i> , aos 39 dias após a germinação .....72

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>C.</i>	<i>Coffea</i>
<i>S.</i>	<i>Setaria</i>
<i>Tec.</i>	<i>Tecidos</i>
<i>UNK</i>	<i>Unknow</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Psi$	potencial hídrico
$^{\circ}\text{C}$	graus celsius
%	percentage
®	Registrado
x	vezes
$C_T$	Ciclo Threshold
pH	potencial hidrogeniônico
MPa	megapascal
mL	mililitro
mM	milimolar
mg	miligrama
g	grama
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{M}$	micromolar
$X^2$	Qui-quadrado
L	Litro
$n^{\circ}$	número
pb	Pares de bases
h	horas
min	minutos
$\beta$	beta

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
2	OBJETIVO GERAL .....	22
2.1	Objetivos específicos.....	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	23
3.1	Aspectos históricos, econômicos e sociais do cafeeiro.....	23
3.2	Taxonomia do cafeeiro .....	24
3.3	Projeto Genoma Café .....	28
3.4	Estresse Biótico e Abiótico .....	30
3.5	Origem de <i>No hits</i> .....	31
3.6	Ferramentas para identificação de <i>No hits</i> .....	34
3.7	<i>No Hits</i> em Café .....	37
4	<i>Setaria viridis</i> .....	42
5	MATERIAL E MÉTODOS .....	43
5.1	Vetor de transformação .....	43
5.2	Transformação genética de <i>Setaria viridis</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	44
5.2.1	Obtenção dos explantes .....	45
5.2.2	Transformação via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	45
5.2.3	Regeneração dos explantes .....	46
5.3	Aclimação das plantas.....	46
5.4	Extração de RNA .....	47
5.5	Tratamento com DNase.....	47
5.6	Transcriptase reversa (RT).....	48
5.7	Análises da expressão por PCR quantitativo em tempo real.....	49
5.8	Extração de DNA.....	51
5.9	Análise da integração do T-DNA .....	51
5.10	Avaliações fenológicas .....	52
5.11	Razão parte aérea/ raiz .....	53
5.12	Experimento de déficit hídrico .....	54
6	RESULTADOS .....	55
6.1	Caracterização molecular das plantas transgênicas de <i>S. viridis</i> ....	55
6.2	Expressão gênica de CcUNK8 .....	57
6.3	Análise da integração do T-DNA .....	60
6.4	Avaliações fenológicas .....	63
6.5	Condições das plantas previamente à suspensão de água .....	66
6.5.1	Condições das plantas posteriormente à suspensão de água .....	67
6.5.2	Potencial hídrico .....	67
6.5.3	Expressão relativa do cDNA CcUNK8 em <i>S. viridis</i> .....	68
6.5.4	Índice de concentração de clorofila (ICC).....	70

<b>6.5.5</b>	<b>Variáveis que definem a arquitetura radicular .....</b>	<b>71</b>
<b>6.5.6</b>	<b>Acúmulo de biomassa fresca.....</b>	<b>73</b>
<b>6.5.7</b>	<b>Discussão do experimento de déficit hídrico .....</b>	<b>74</b>
<b>6.5.8</b>	<b>Análise do número de perfilhos.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro teve o início do seu plantio na província etíope de Kaffa. A partir de então seu cultivo e o apreço pela bebida obtiveram altas projeções, fazendo dele um dos mais valiosos produtos primários no comércio mundial (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION- ICO, 2014). O cafeeiro é o principal meio de subsistência para mais de 125 milhões de pessoas, sendo produzido em mais de 60 países. Enquanto 126 espécies dos gêneros *Coffea L.* e *Psilanthus Hook. f* são conhecidas atualmente (DAVIS et al., 2011), a produção de café comercial baseia-se, principalmente, em duas espécies: *Coffea arabica L.* e *Coffea canephora Pierre*. Estas espécies representam, aproximadamente, 65% e 35% da produção mundial, respectivamente. O Brasil detém a liderança internacional em produção e exportação desse produto.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2014), o 1º levantamento da safra de café de 2014 mostra uma redução de até 5,4% de produção se comparado com a safra anterior. A diminuição pode ser um reflexo de uma menor área plantada, entretanto pode serem razão de adversidades climáticas como fortes estiagens e geadas ocorridas nas áreas produtoras.

O perfil da agricultura no Brasil tende a se modificar segundo Assad et al. (2004). Contudo, com o aquecimento global, espera-se um cenário de climas mais extremos com secas, inundações e ondas de calor mais frequentes. Caso se confirmem os cenários atuais preconizados pelos modelos do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas, IPCC, o cultivo do café arábica nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná, entre outros, será drasticamente reduzido nos próximos 100 anos. Os programas de melhoramento de cafeeiro têm como principais objetivos criar novos cultivares com maior produtividade e baixa susceptibilidade a pragas (LASHERMES et al., 2008). No entanto, o lançamento de uma nova cultivar, por meio do melhoramento

genético convencional, pode demorar entre 20 e 35 anos. Por isso, novas técnicas de engenharia genética, como a seleção assistida por marcadores, pode ser aplicada sem que haja um ciclo de seleção como na seleção fenotípica. A aplicação da técnica ocorre em indivíduos ainda jovens, já que as características são seguidas por meio de marcas presentes no DNA (MISHRA et al., 2012).

Um requisito primordial, para a aplicação destas novas técnicas, é a identificação e a caracterização funcional de genes com potencial utilização nestes processos (HORANet et al., 2008). Com o intuito de implantar ferramentas úteis para a descoberta de genes, promover a análise da genética funcional em café e espécies afins e para auxiliar no avanço do conhecimento sobre os genes expressos, foi realizado o Projeto Genoma Café Brasileiro (PGCB). Assim, foram gerados dados de sequenciamento de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) provenientes de várias bibliotecas de cDNA das espécies de *Coffea arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* (MONDEGO et al., 2011; VIEIRA et al., 2006).

O sequenciamento de ESTs é um método para a obtenção de dados de genômica que tem uma relação custo-benefício positiva. Em plantas modelo, tais como a *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, o sequenciamento de ESTs tem contribuído para a rápida identificação de genes responsáveis por características de interesse agrônômico, permitindo, assim, a manipulação destes genes por meio de ferramentas biotecnológicas (SILVA et al., 2013).

O sequenciamento realizado por meio da iniciativa do PGCB revela que 22% dos dados analisados, via Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), não possuem similaridades nos bancos de dados. Por essa razão, estas sequências são denominadas *No hits*. Em estudos realizados no nosso laboratório foram identificados 1.568 sequências *No hits* utilizando variadas bibliotecas de cafeeiro. Dados *in silico* de expressão destes genes inferem que eles são amplamente distribuídos pelos tecidos da planta, sob

condições de estresse abiótico e biótico possuem seus níveis de expressão alterados (VIEIRA, 2013).

A expressão de vários *No hits* foi testada em folhas de clones (tolerantes e sensível à seca) de *C. canephora* Conilon submetidos a diferentes condições de irrigação (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Esses estudos permitiram selecionar, por exemplo, o gene *CcUNK8* que apresentou uma maior expressão nas folhas dos clones tolerantes à seca, quando estes estavam sob o tratamento de déficit hídrico, se comparados com o nível de expressão obtido em folhas do clone sensível no mesmo tratamento. Em decorrência do perfil de expressão peculiar deste gene *CcUNK8*, foi decidido avaliar a função dele por meio da expressão constitutiva do seu cDNA correspondente, em plantas transformadas de *Setaria viridis*.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar via fisiologia, fenologia e análises moleculares a função do gene *No hit CcUNK8* em plantas transgênicas de *Setaria viridis*.

### **2.1 Objetivos específicos**

- a) Caracterização molecular (PCR e testes de segregação) das plantas de *Setaria viridis* transformadas com o T-DNA contendo o *CcUNK8*;
- b) Analisar os níveis de expressão (qPCR) de *CcUNK8* nas plantas transformadas de *Setaria viridis*;
- c) Analisar fenologicamente as plantas de *Setaria viridis* expressando *CcUNK8*;
- d) Analisar fisiologicamente as plantas de *Setaria viridis* expressando *CcUNK8*.

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Aspectos históricos, econômicos e sociais do cafeeiro**

A história da propagação do cultivo e uso do cafeeiro pelo mundo começa na Província de Kaffa - Etiópia onde o cafeeiro tem sua origem. Em 1616, o café chega à Europa por meio dos Holandeses (ICO, 2014).

Foram os holandeses que começaram a difundir o café pela América Central e do Sul, onde hoje seu cultivo comercial tem supremacia absoluta. O café chegou pela primeira vez à colônia holandesa do Suriname em 1718. Posteriormente, cafezais foram formados na Guiana Francesa e no Brasil (no Pará). Em 1730, os britânicos introduziram o café na Jamaica, onde hoje se cultiva o famoso café mais caro do mundo, o “Blue Mountain”. Em 1825, as Américas do Sul e Central estavam a caminho de realizar seu destino cafeeiro.

O café tem uma importância relevante na sociedade humana. Está, economicamente, entre os produtos agrícolas mais importantes no comércio internacional. Representa a principal fonte de renda para milhões de pessoas em todo o mundo (PENDERGRAST, 2009). O café enche, aproximadamente, 400 bilhões de xícaras por ano e é estimado para ser regularmente consumido por mais de 40% da população mundial. Seu consumo generalizado é em razão, principalmente, das características sensoriais obtidas, seguido por uma variedade de fatores tanto de natureza social e econômica. Investigações recentes sugerem cada vez mais que o consumo de café, cerca de 2-4 xícaras por dia, estão associados com risco mais baixo de mortalidade, de desenvolvimento do câncer colo retal, lesão hepática e cirrose, bem como doenças crônicas (incluindo a doença de Alzheimer e de Parkinson, diabetes tipo 2 e doença cardíaca coronária) (ALVES et al., 2009; HIGDON et al., 2007).

Hoje o Brasil, o Vietnã e a Colômbia são responsáveis por mais de 50% da produção mundial desta cultura, sendo o Brasil com 35%, o maior produtor (ICO, 2014).

O café no Brasil destaca-se econômica e socialmente desde a chegada das primeiras mudas vindas da Guiana Francesa, em meados do século XVIII. Diante de sua rápida adaptação ao solo e clima, o produto adquiriu importância no mercado, transformando-se em um dos principais itens de exportação, desde o Império até os dias atuais (BRASIL, 2014).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e segundo maior consumidor do produto. Apresenta, atualmente, um parque cafeeiro estimado em 2,3 milhões de hectares para as duas espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

A cadeia produtiva do café se preocupa em garantir que as questões sociais, econômicas e ambientais sejam preservadas, proporcionando, assim, renda a cerca de 287 mil produtores, que direta ou indiretamente geram 8 milhões de empregos no país, proporcionando renda, acesso à saúde e à educação para os trabalhadores e suas famílias. Os produtores brasileiros, ainda, preservam florestas e fauna nativa, controlando a erosão e protegendo as fontes de água. A busca do equilíbrio ambiental entre flora, fauna e o café é constante e assegura a preservação de uma das maiores biodiversidades do mundo (BRASIL, 2014).

### **3.2 Taxonomia do cafeeiro**

O cafeeiro é uma planta perene, pertencente à família *Rubiaceae*, subfamília *Ixoroideae*, tribo *Coffea*, que é composta por dois gêneros: *Coffea* L. e *Psilanthus* Hook f., estes juntos abrangem mais de 100 espécies. O gênero *Coffea* L., que teve seu centro de origem na África, contém as três espécies

utilizadas na produção do café: *C. arabica*, *C. canephora* e *C. liberica* (DAVIS et al., 2011). *Coffea L.* é caracterizado por plantas dicotiledôneas, de folhas persistentes e flores hermafroditas, porte arbustivo ou arbóreo e caule lenhoso (FAZUOLI et al., 2000). Evolutivamente, o início da diversificação deste gênero ocorreu entre 5 e 25 milhões de anos atrás (CUBRY et al., 2008).

As duas espécies de café que possuem maior importância econômica no mundo são *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre, conhecidas, comercialmente, como arábica e robusta, respectivamente. As duas espécies apresentam propriedades organolépticas diferenciadas, o que altera o seu valor de mercado, e as propriedades das bebidas geradas resultam em múltiplos aromas (ALONSO-ALCES et al., 2009; LEROY et al., 2006, 2011).

O *C. canephora* é uma espécie diploide  $2n = 22$ , alógama e a mais polimórfica das espécies de *Coffea*. Adaptado a climas quentes e úmidos, possui flores hermafroditas podendo florescer uma ou mais vezes ao ano. Esta espécie se adapta ao cultivo entre baixas e médias altitudes (CUBRY et al., 2012; MONTAGNON et al., 2012). *C. canephora* tem sido caracterizado como um café neutro, de fraco sabor e, ocasionalmente, com um amargor forte e pronunciado, possuindo um maior teor de cafeína quando comparado ao *C. arabica* (LEROY et al., 2006).

A diversidade genética de plantas de *C. canephora* foi analisada por meio de marcadores moleculares (mais recentemente de tipo microsatélites “SSR”) e mostraram a existências de dois grupos distintos (Figura 1), estabelecidos em função da sua origem geográfica denominados: Guineano e Congolês.

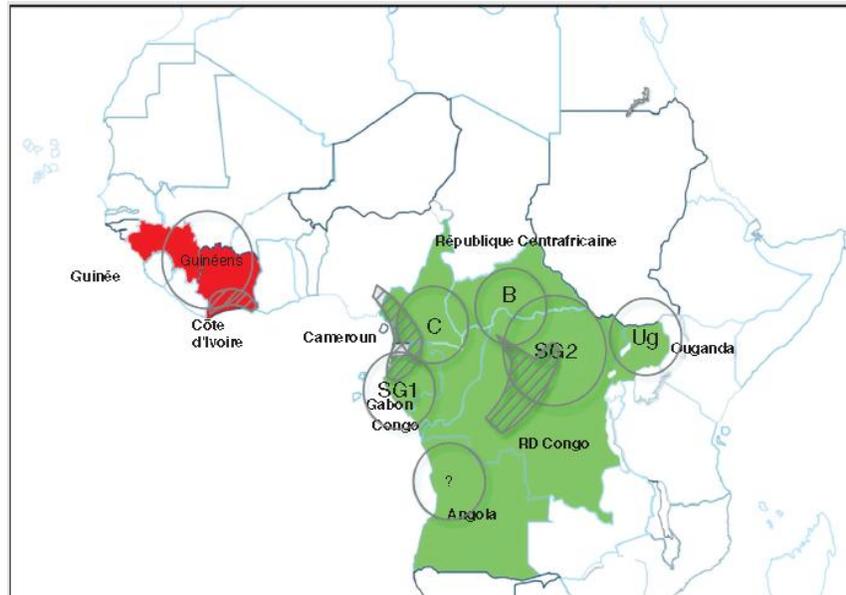


Figura 1 Origem geográfica na África dos principais grupos genéticos de *C. canephora*

Legenda: Vermelho: origem geográfica do grupo Guineano, verde: origem geográfica do grupo genético Congolês; círculos com o nome dos grupos e subgrupos (SG) genéticos: Origem geográfica de cada grupo; áreas hachuradas: refúgios do último máximo glacial (20.000 anos atrás).

Fonte: Montagnon et al. (2012).

Os representantes do grupo Congolês apresentam internódios longos, frutos grandes, maturação média a tardia dos frutos, sementes grandes, peso das sementes maiores do que as do grupo Guineano, peneira média alta, menores teores de cafeína (em torno de 2,5%), bebida superior ao Grupo Guineano e coloração das folhas novas bronze ou marrom (CUBRY et al., 2008; MONTAGNON et al., 2012).

O grupo Guineano é constituído por populações selvagens da Costa do Marfim na África ocidental, cujas principais características são: internódios, sementes e frutos pequenos com maturação precoce e altos teores de cafeína (em

torno de 2,7%), na maior parte das plantas, suscetibilidade à ferrugem, tolerância à seca, bebida inferior ao grupo Congolês e coloração dos brotos novos frequentemente bronze (CUBRY et al., 2008; MONTAGNON et al., 2012).

Já, o grupo Congolês apresenta dois subgrupos de maior importância: o subgrupo 1-(SG1) (tolerante à seca), formado pelos tipos de café Robusta ou Híbridos entre os dois grupos (Kouillou x Robusta) e o subgrupo 2-(SG2) sensível à seca que corresponde ao café Robusta propriamente dito (MONTAGNON et al., 2003).

*C. arabica* é uma espécie alotetraploide  $2n = 4x = 44$  cromossomos com sua origem, aproximadamente, 1 milhão de anos, procedente de uma hibridização natural entre as duas espécies diploides *C. canephora* e *C. eugenioides* (Figura 2). A diversidade estreita observada em *C. arabica* é a consequência de sua biologia reprodutiva, origem e evolução. Em contraste com os seus progenitores, *C. arabica* é uma espécie autógama. Além disso, a maioria *C. arabica* são cultivares comercial, incluindo Caturra, Mundo Novo e Catuaí, foram selecionados com base em apenas duas populações-base: Bourbon e Typica (VIDAL et al., 2010).

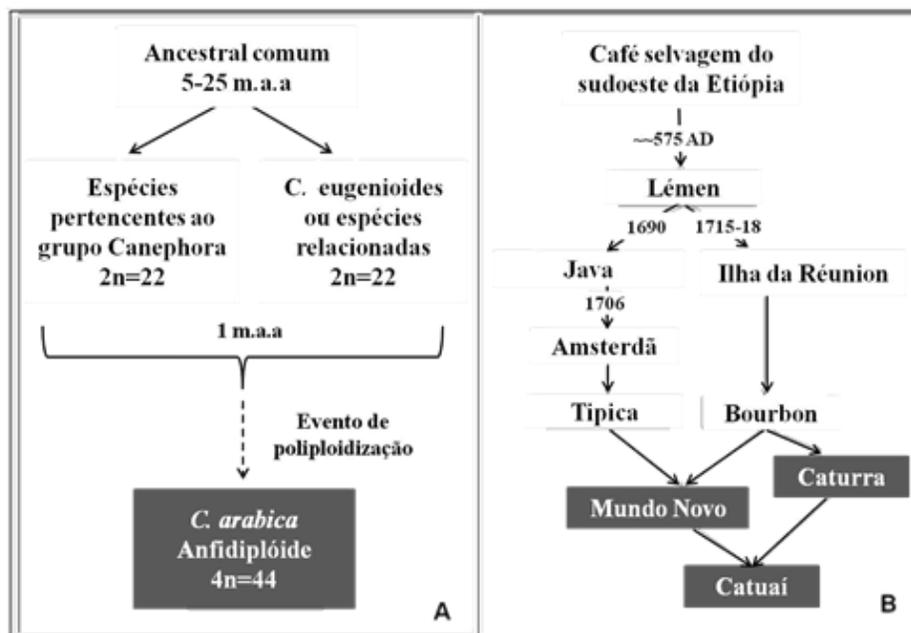


Figura 2 História evolutiva do allotetraploide *C. arabica*. (A) Origem de *C. arabica*. Os genomas dos progenitores estão representados pelos diploides *C. eugenioides* e *C. canephora*. *C. arabica* surgiu entre 1 e 2 milhões de anos atrás com base no cruzamento de *C. canephora* (ou espécies relacionadas) e *C. eugenioides*. (B) Origem das principais cultivares de *C. arabica*

Fonte: adaptado de Vidal et al. (2010).

### 3.3 Projeto Genoma Café

O Projeto Genoma Café Brasileiro - PGCB foi desenvolvido com o objetivo de disponibilizar os modernos recursos da genômica à comunidade científica e aos diferentes segmentos da cadeia produtiva do café. Para isso, foram sequenciados 214.964 clones escolhidos aleatoriamente de 37 bibliotecas de DNA complementar (cDNA) de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* representando estágios específicos do desenvolvimento de células e de tecidos do cafeeiro (VIEIRA et al., 2006).

A comparação destas sequências pelo programa Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) revelou que 22 % não tiveram similaridade significativa às sequências no banco de dados do National Center for Biotechnology Information - NCBI de função conhecida ou desconhecida, correspondendo à definição de *No hits*. A base de dados de ESTs do cafeeiro resultou na identificação de cerca de 33.000 unigenes diferentes (VIEIRA et al., 2006).

No entanto, outros bancos de dados de cafeeiro estão disponíveis, como no caso da iniciativa da Nestlé e da Universidade de Cornell, constituído por ESTs com base em sequências de, aproximadamente, 47.000 clones de cDNA e com um foco especial em sementes em desenvolvimento de *C. canephora* (LIN et al., 2005; MUELLER et al., 2005). Neste caso foram sequenciadas ESTs, provenientes de *C. canephora* crescidos no leste de Java -Indonésia, gerando um total de 13.175 unigenes. Este grupo de pesquisa comparou, também, os dados de ESTs de *C. canephora*, *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Arabidopsis thaliana*.

O grupo de pesquisa do National Center for Coffee Research-CENICAFE, por sua vez, produziu sequências de ESTs de três tecidos diferentes: folhas, frutos e flores de *C. arabica* (cv. Caturra) montadas em 10.799 unigenes (MONTROYA et al., 2006). O Institut de recherche pour le développement - IRD produziu 5.534 unigenes potenciais com base em bibliotecas de cDNA de frutos e folhas (PONCET et al., 2006). O total de 55.694 sequências tornou-se disponível formando uma das principais fontes de pesquisa para a comunidade científica.

O número de sequências de cafeeiro disponibilizado nas bases de dados auxilia nos estudos de rotas metabólicas, produtos de expressão gênica, agregando maior valor e conhecimento à pesquisa do melhoramento do cafeeiro.

### 3.4 Estresse Biótico e Abiótico

As plantas respondem e se adaptam às condições de estresses com uma série de alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares. Ao nível molecular, a expressão diferencial de genes, para tolerar as condições adversas, é um bom indicativo da resposta da planta ao meio ambiente. Encontrar a função destes genes facilitará o entendimento da relação planta-ambiente e planta-patógeno.

No início do século XX, o Brasil teve uma acentuada redução da área cafeeira em função de diversos fatores que têm determinado oscilações na sua produção total, dentre estes, fatores abióticos como seca, alto teor de sal e mudanças de temperatura e bióticos como pragas e doenças (GONÇALVES, 1999).

O estresse ambiental apresenta um grande desafio na busca de uma produção sustentável de alimentos, pois reduz os rendimentos potenciais em até 70% das plantas cultivadas (AGARWAL et al., 2006). O estresse hídrico, ocasionado pela seca e severidade de temperatura, é o estresse abiótico mais prevalente, que limita o crescimento das plantas e produtividade. O fechamento dos estômatos é uma das respostas à secagem do solo, conseqüentemente, limitando a perda de água e a assimilação do carbono pela fotossíntese (FLEXAS et al., 2002). Geralmente, além da seca, as plantas no campo enfrentam inúmeros estresses coletivamente, sejam eles bióticos ou abióticos. Alguns relatórios recentes puseram em evidência a ligação entre a resistência a doenças e tolerância à seca (AGARWAL et al., 2006).

Análises fisiológicas sugerem que a tolerância à seca pode ser uma consequência direta de um melhor desenvolvimento da raiz (PINHEIRO et al., 2005). Em outro estudo, Lima et al. (2002) sugeriram que a atividade aumentada de enzimas antioxidantes, também, pode estar envolvida no mecanismo de tolerância à seca.

### 3.5 Origem de *No hits*

A origem dos genes órfãos (ou *No hits*) foram, inicialmente, discutidas no projeto genoma de levedura, que sugeriu que, aproximadamente, um terço dos genes identificados se classificavam nessa categoria (DUJON, 1996).

Guo et al. (2007), utilizaram, *Oryza sativa* para determinar a porcentagem de genes conhecidos e genes órfãos que estão presentes no genoma, sendo possível observar vasta distribuição destes genes em diferentes tecidos (Figura 3).

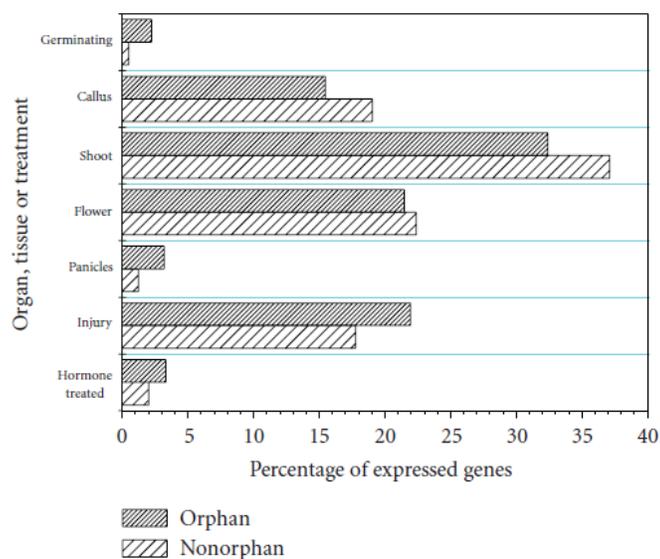


Figura 3 Distribuição de genes órfãos e não órfãos em diferentes tecidos de *Oryza sativa*

Fonte: (GUO et al., 2007).

Como os genes órfãos representam uma fração substancial de cada genoma existente, o número total de órfãos, em todas as linhagens evolutivas, excede em muito o número de famílias de genes conhecidos. Por isso, é importante o estudo de como tais genes foram originados (TAUTZ et al., 2011).

Os genes órfãos não possuem similaridade com sequência presentes nos genomas de outros organismos. De acordo com a definição mais estrita, estes são genes que não codificam para domínios de proteínas identificadas. Geralmente as proteínas que não mostram qualquer similaridade de sequência em BLASTP com valores de corte ( $E = e\text{-value}$ )  $E < 10^{-5}$  ou  $E < 10^{-10}$  são classificadas como "órfãs". Há evidências crescentes com base em dados genômicos, de sequenciamento e de transcriptoma, que os genes órfãos apresentam uma restrita distribuição filogenética (KHALTURIN et al., 2009).

A comparação de sequências de DNA de um novo gene com a sequência correspondente em outra espécie que não apresenta tal gene pode indicar o mecanismo que levou a sua divergência. O processo mais comum que dá origem para novos genes é a duplicação que pode ocorrer seja por DNA ou mecanismos baseados em RNA. O primeiro envolve tipicamente um *crossing-over* desigual, o que pode levar à expansão em número de cópias de genes em famílias de genes pré-existentes (Figura 4). Cruzamentos, também, podem ocorrer entre elementos repetitivos intercalados, tais como elementos transponíveis, levando à duplicação de genes de cópia única e inserção de genes nos cromossomos não-homólogos (RANZ et al., 2012).

O segundo caso é a duplicação baseada em RNA, ocorre quando o mRNA de um gene existente é transcrito de forma reversa (RT) e inserido em um novo local no genoma. O terceiro mecanismo ocorre quando um novo gene é criado por meio da fusão de dois genes distintos para formar um gene quimérico, ou pela adição ou rearranjo de exons que codificam proteína com base em um

gene pré-existente. O quarto mecanismo é a formação de uma nova proteína baseada em DNA não codificante (RANZ et al., 2012).

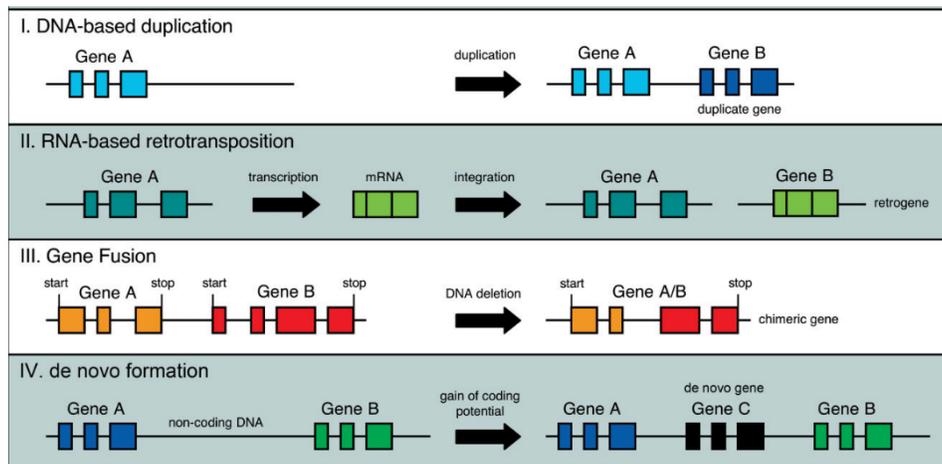


Figura 4 Mecanismos de formação de novos genes, que podem ocorrer por quatro processos distintos

Fonte: (RANZ et al., 2012).

A alta quantidade de dados de sequências de DNA e o desenvolvimento de ferramentas *in silico* para analisar e comparar os genomas permitiram a identificação de novos genes que são únicos para uma espécie ou uma linhagem filogenética.

O conceito de genes, taxonomicamente restritos (TRGs: *Taxonomically-restricted genes*), é discutido por Khalturin et al. (2009). Assim, quando ocorre especiação ou a mesma espécie é submetida a fatores ambientais diferentes, o seu genótipo ao longo da escala evolutiva pode sofrer alterações (Figura 5), que são os mecanismos moleculares, ainda, não descritos que criam TRG's que permanecem a espécie. Com base neste processo, pode ocorrer a formação de genes órfãos como mostrado na Figura 4, como também evidenciar o aparecimento de linhagens tolerantes à seca pela presença destes genes.

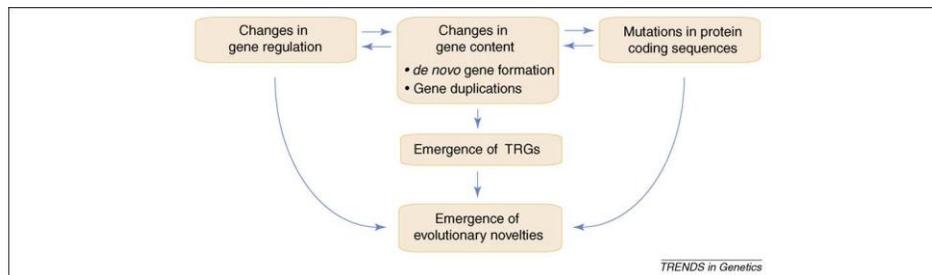


Figura 5 Fatores pelos quais pode ocorrer surgimento de novidades evolutivas  
Fonte: (KHALTURIN et al., 2009).

Até o momento, estudos de caso têm-se centrado, principalmente, sobre a estrutura, o padrão de evolução da sequência e a caracterização preliminar da função dos genes recém evoluídos. Os estudos estão apenas começando a explorar as aplicabilidades dos genes. Os estudos têm-se focado em avaliar as alterações da função gênica associados com fenótipos aberrantes, e estudos mais detalhados de como as proteínas codificadas são integradas às redes de interação proteína-proteína e quais funções irão desempenhar. O papel na determinação funcional de novos genes relacionando-os com a adaptação e divergência de espécies. Estes questionamentos deverão ser aprofundados em estudos envolvendo tais genes, podendo desta forma desvendar as suas reais contribuições no fenótipo dos organismos (RANZ et al., 2012).

### 3.6 Ferramentas para identificação de *No hits*

Entre as diferentes ferramentas de bioinformática, uma das mais relevantes na anotação de ESTs recém sequenciados é o programa BLAST (KOONIN, 2005). Essa ferramenta permite determinar a possível função de um gene ou da proteína que ele codifica pela busca de similaridade com sequências

nucleicas ou proteicas conhecidas e descritas em bancos de dados públicos (ex: NCBI)<sup>1</sup>.

Algumas vezes, mesmo fazendo todas essas análises, não é fácil encontrar alguma informação que permita associar a sequência EST em estudo com algum gene já descrito ou com alguma proteína. De fato, é comum encontrar nos bancos de dados proteínas de função desconhecida e chamadas, por exemplo, “*hypothetical protein*”, “*putative protein*”, “*predicted protein*” e “*protein with unknown function*”.

No entanto, apesar de não haver uma definição clara desses termos, assume-se “*hypothetical protein*” como a uma sequência de aminoácidos que não se tem certeza que origina uma proteína; “*putative*” e “*predicted protein*” correspondem a proteínas cuja função necessita de comprovação experimental, e “*protein with unknown function*” corresponderia a uma sequência de aminoácidos que, comprovadamente, constitui-se em uma proteína, no entanto, sua função é desconhecida (FIGUEIREDO et al., 2010).

A atribuição de uma provável função a uma sequência nucleica do tipo EST só é possível graças à existência de genes ortólogos correspondentes a genes descritos em diferentes espécies, que se originam de um gene ancestral comum por especiação. Dessa forma, pode-se atribuir uma possível função a uma sequência EST pelo grau de similaridade entre sequências provenientes de organismos distintos. Uma característica comum de genes ortólogos é de que eles realizam a mesma função (KOONIN, 2005).

Em complemento a utilização do BLAST, é possível o uso do Ortholog Groups Of Protein Sequences (OrthoMCL) (FISHER et al., 2011) que permite a comparação entre clusters de proteínas aonde são realizadas buscas incluindo métodos baseados na filogenia, métricas evolutivas, distância e similaridade de sequência.

---

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Apesar do OrthoMCL, a busca se torna mais refinada ao utilizar em sua base de dados o algoritmo BLAST, já que o algoritmo realiza busca clusterizando o grupo de genes ortólogos, co-ortólogos, parálogos e *No hits* (Figura 6).

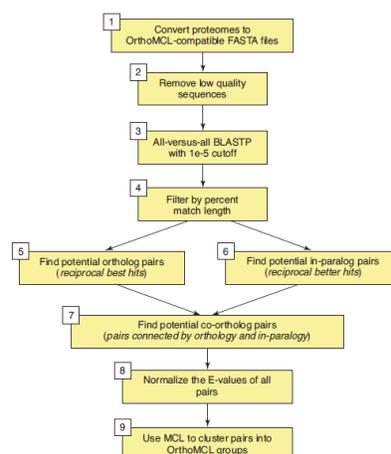


Figura 6 Visão geral do algoritmo OrthoMCL

Legenda: (1) os proteomas devem estar em formato FASTA. (2) Os arquivos de proteoma são filtrados para remover as sequências de baixa qualidade. (3) Os proteomas são todos comparados uns com os outros usando BLASTP. (4) Para cada par de sequências correspondentes, é contada a pontuação “porcentagem do comprimento”. (5) Para todos os pares de proteomas, devem-se encontrar todos os pares de proteínas, por meio dos quais possuem hits tão bons ou melhores do que quaisquer outros sucessos entre estas proteínas e proteínas de outras espécies. (6) Encontre todos os pares de proteínas dentro de uma espécie que ter e- value recíprocos que são melhores do que ou igual a todos os acessos dessas proteínas de proteínas em outras espécies. (7) Encontre todos os pares de proteínas por meio de duas espécies que estão conectados por meio de ortologia e em - paralogia. (8) Normalizar em parálogo (9) Conferir todos sobre ortólogo, parálogo e pares co- ortólogos, com seus e- value normalizados, ao programa MCL para clusterizar.

Fonte: (FISHER et al., 2011).

### 3.7 *No Hits* em Café

As análises de expressão de genes, previamente, realizadas no laboratório, para identificar genes candidatos para tolerância à seca, foram feitas em folhas dos clones 14, 73 e 120 (tolerantes à seca) e do clone 22 (sensível à seca) *C. canephora* Conilon cultivados em diferentes regimes hídricos (irrigado vs. não-irrigado) (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Vale ressaltar que plantas de *C. canephora* Conilon são aparentados ao grupo SG1 (LAMBOT et al., 2006) e, também, estudadas no nosso laboratório para um projeto de seleção genômica (CARNEIRO et al., 2013).

Utilizando os dados do Consórcio Internacional de Sequenciamento do Genoma de *C. canephora* juntamente com bibliotecas de *C. arabica* (folhas, calos, fruto, embriões, flores) disponíveis na literatura, as buscas por similaridade (fixando um E-value de  $1e^{-1}$ ). Identificou-se um número de 25.574 sequências proteicas que contra o banco de dados do GenBank geraram 24.006 sequências homólogas (*hits*) e 1.568 sequências que não possuíram nenhuma similaridade. Estes *No hits* estão distribuídos em todos os cromossomos do cafeeiro (VIEIRA, 2013).

A representatividade destes *No hits* percorre todos os tecidos sob condição de déficit hídrico e controle das plantas.

Os genes *No hits* foram identificados *in silico* de acordo com o tecido em que foram expressos nas espécies *C. arabica* e *C. canephora*. Assim, foi possível identificar e caracterizar *No hits* que se expressam de forma significativa em função das condições de estresse hídrico aplicadas às plantas, assim como *no hits* que têm a expressão altamente modificada nas plantas submetidas a estresses bióticos ou lesões. As análises *in silico* apontam, também, *No hits* que são expressos, diferencialmente, em função dos tecidos (regulação espacial), mas também, por exemplo, em função do estágio de

desenvolvimento do fruto de *C. canephora* (regulação temporal). Alguns *No hits* que foram específicos para as bibliotecas de CA-Plântulas, CA-Calos, CA-Frutos, CC-Calos e CC-Frutos, podendo indicar possíveis promotores para novos processos biotecnológicos com tecido-especificidade (Figura 7).

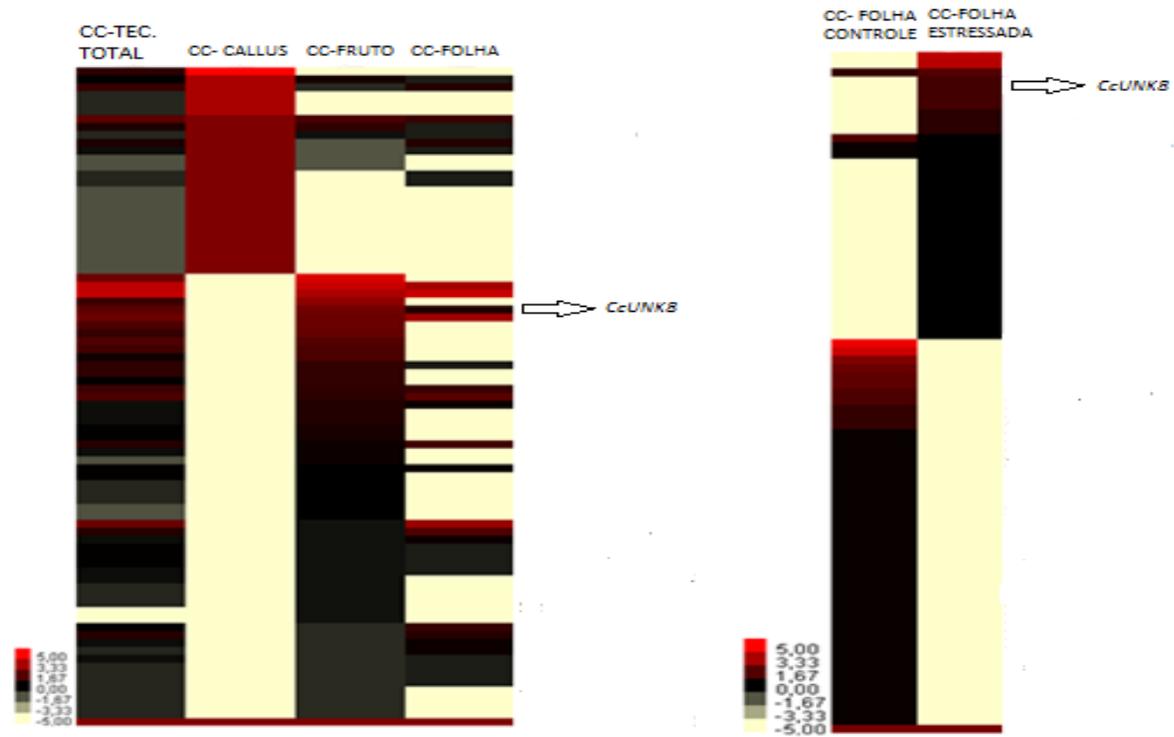


Figura 7 Expressão gênica *in silico* dos genes *No hits* nas bibliotecas de cDNA de *C. canephora* (CC) obtidas com base no tecido total (CC-TEC TOTAL), de callus (CC- CALLUS), de frutos (CC- FRUTO), de folhas (CC-FOLHA) e (parte direita da figura) de folhas de plantas irrigadas (CC-FOLHA CONTROLE) ou de plantas não irrigadas (CC- FOLHA ESTRESSA) (VIEIRA, 2013). A posição do gene *CcUNK8* nos Northern eletrônicos é indicada por uma seta

Alguns *No hits* foram identificados como em estudos recentes que relataram genes candidatos, potencialmente, envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em cafeeiro, por meio de análises da expressão gênica em folhas de clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de *C. canephora* Conillon (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Dentre eles, os *No hits* *CcUNK1*, *CcUNK8* e *CcUNK10* apresentaram perfis de expressão diferencial tal como o gene *CcUNK10* que apresenta um aumento de expressão sob a condição de déficit hídrico em todos os clones (Figura 8). Ao nível quantitativo, a expressão desse gene apareceu maior no clone sensível que nos clones tolerantes ao déficit hídrico. O perfil de expressão do gene *CcUNK1* é semelhante ao perfil de expressão do gene *CcUNK10* mas os níveis de expressão são, ainda, maiores na condição de déficit hídrico no clone sensível (22), quando comparado aos níveis dos clones tolerantes (14, 73 e 120). Ao contrário desses dois genes e, para todos os clones analisados, a expressão do gene *CcUNK8* sempre foi maior na condição de déficit hídrico que nas plantas irrigadas, particularmente, nos clones tolerantes (14 e 73) que no clone sensível 22. Sugerindo que o produto desse gene poderia julgar um papel importante na tolerância à seca do cafeeiro.

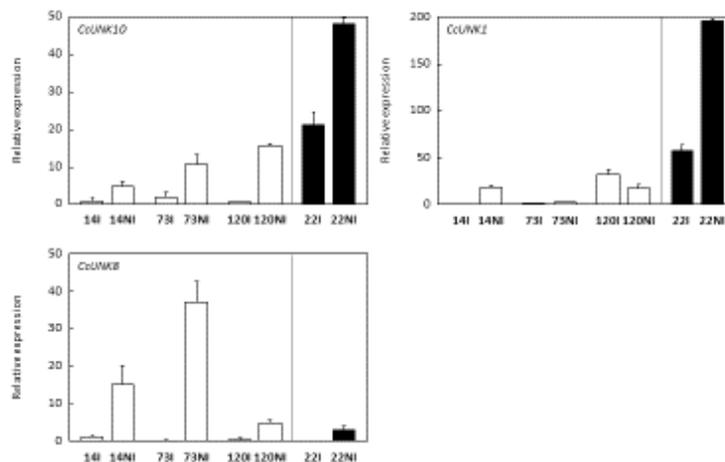


Figura 8 Quantificação relativa avaliada por PCR quantitativa (qPCR) da expressão dos genes *CcUNK8*, *CcUNK1* e *CcUNK10*, nas folhas dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (clone 22) de *C. canephora* Conilon cultivadas com (I) ou sem (NI) irrigação. O gene *CcUBQ10* foi utilizado como controle endógeno

Fonte: Dados adaptados de Marraccini et al. (2012) e Vieira et al. (2013).

A expressão diferencial destes genes *No Hits* do cafeeiro e a ausência de homologia dos mesmos nos bancos de dados justifica o início de uma análise detalhada da função deles, por exemplo, por meio de estudos fenológicos e fisiológicos utilizando plantas transformadas de *S. viridis* expressando de maneira constitutiva o gene *CcUNK8*.

#### **4 *Setaria viridis***

A planta *Setaria viridis* pertence à subfamília Panicoideae que inclui culturas de grande interesse para a agricultura mundial tais como o milho, o sorgo e a cana-de-açúcar que são utilizadas como fonte de energia renovável e alimento.

Dentro dessa família, as duas espécies *Setaria italica* e *Setaria viridis* próximas filogeneticamente, sendo a segunda espécie considerada ancestral. Recentemente, o genoma de *Setaria italica* foi totalmente sequenciado tendo-se um genoma de referência de ~400Mb, possibilitando aprofundar os estudos utilizando a comparação do seu genoma com outras espécies de interesse agrônômico (DEVOS et al., 2012).

*Setaria viridis* possui características como pequeno porte (10 – 15 cm), um curto ciclo de vida (6 – 9 semanas), alta produção de sementes (~13.000 por planta) e um sistema reprodutivo que ocorre por meio de autofecundação. Em diversos trabalhos foi relatada a necessidade de estudar melhora biológica dessa planta (DOUST et al., 2009). Com um protocolo eficiente de transformação genética de *S. viridis*, foi decidida a utilização dessa espécie para analisar em plantas transgênicas os efeitos da expressão constitutiva do gene de caféiro *CcUNK8*.

## 5 MATERIAL E METÓDOS

Os experimentos de geração dos eventos transgênicos e demais análises moleculares, fenológicas e fisiológicas foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF) e Laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia (Brasília-DF). Esses dois laboratórios são devidamente credenciados pela CTNBio para desenvolver trabalhos de pesquisa com organismos geneticamente modificados.

### 5.1 Vetor de transformação

As plantas foram transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* (Figura 9) usando a origem de replicação do vetor plasmídeo pVS1 (YOSHIFUMI et al., 1985). O T-DNA desse vetor é delimitado pela borda direita (right border - RB) e pela borda esquerda (left border - LB), contém:

- a) gene de resistência à higromicina (*hptII*) sob o controle do promotor 35S duplicado (2x35S) do vírus da mosaica do couve-flor (GUILLEY et al., 1982);
- b) cDNA com o comprimento total de *CcUNK8* proveniente de *C. canephora* sob o controle do promotor constitutivo do gene de milho codificando para a ubiquitina (CHRISTENSEN et al., 1992).

Fora da região do T-DNA, o vetor apresenta o gene *aadA* que confere à resistência aos antibióticos spectinomomicina e streptomomicina usados para seleção das bactérias transformadas com os vetores recombinantes.

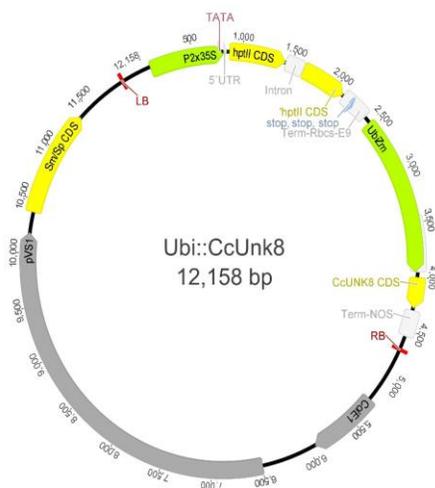


Figura 9 Mapa do vetor pUBI:*CcUNK8* utilizado na transformação de plantas de *S. viridis*. O T-DNA delimitado pelas bordas direita (RB) e esquerda (LB), contém os promotores p2x35S e ZmUbi-1 que controlam a expressão do gene *hptII* e do cDNA *CcUNK8*, respectivamente. O plasmídeo utilizado para clonagem é o pVS1. O gene *aadA* (Sm/Sp), por conferir a resistência aos antibióticos espectinomomicina e streptomomicina é usado para a seleção das bactérias (*E. coli* e *A.tumefaciens*) recombinantes veiculando o vetor pUBI:*CcUNK8*

## 5.2 Transformação genética de *Setaria viridis* via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação genética de *Setaria viridis* via *Agrobacterium tumefaciens* possui um protocolo estabelecido que se subdivide em obtenção dos explantes, inserção do T-DNA e cultura de tecidos, para a obtenção do indivíduos transformados.

### 5.2.1 Obtenção dos explantes

Sementes maduras de *S. viridis* foram descascadas e esterilizadas com uma solução de 10% (v/v) de hipoclorito de sódio, adicionado de 0,1% de Tween-20 por três minutos e lavadas três vezes com água estéril. As sementes foram colocadas em placas de petri, contendo 25 mL de meio CIM (4,4 g.L<sup>-1</sup> MS, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup>, 4 mg.L<sup>-1</sup> de phytigel) (BRUTNELL et al., 2010) e incubadas no escuro a 25°C por 4 semanas. Após este período, os calos embiogênicos já podem ser identificados, separados e propagados em placa contendo meio CIM nas mesmas condições.

### 5.2.2 Transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

#### a) Pré- inóculo

Uma colônia de *A. tumefaciens*, transformada com o vetor pUBI:CcUNK8, foi inoculada em 5 mL de meio YEB (5 g.L<sup>-1</sup> triptona, 1 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 5 g.L<sup>-1</sup> solução nutritiva, 5 g.L<sup>-1</sup> sacarose e 0.49 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), contendo 300 mg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 50 mg.mL<sup>-1</sup> de rifampicina e mantida a 28°C por 16 h.

#### b) Inóculo

Adicionou-se ao pré- inóculo, o meio YEB, contendo 300 mg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 50 mg.mL<sup>-1</sup> de rifampicina até que se atingisse um volume final de 20 mL e mantido a 28°C sob agitação de 150 rpm até atingir OD<sub>600</sub> de 0,6-0,7.

### **c) Transformação**

Centrifugou-se por 15 min o inóculo. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em meio CIM não contendo  $\text{CuSO}_4$  acrescido de  $200 \mu\text{M}$  de acetoseringona (Phyto Technology Laboratories). Os calos foram transferidos para um novo tubo e imersos em 10 mL de meio de infecção, foi adicionado Synperonic (Sigma) na proporção 1:1 ( $100 \mu\text{L}$ ). Os calos mantiveram em contato com o meio de infecção por 5 min sob agitação lenta. Após esse período os calos foram vertidos em papel filtro estéril e transferidos para CIM.

### **5.2.3 Regeneração dos explantes**

Após um período de 3 dias de co-cultura, os calos foram transferidos para meio CIM contendo  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  de timentin (Glaxo Smith Kline, Research Triangle Park) e mantidos no escuro. Após 7 dias, os calos foram transferidos para meio CIM seletivo, que continha  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de higromicina e  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  timentin, ambos adicionados após a autoclavagem e mantidos novamente no escuro. Depois de uma semana, os calos foram transferidos para um meio de regeneração seletivo, que continha meio MS (BRUTNELL et al., 2010) suplementado com  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de higromicina e  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de phytigel. O pH do meio foi ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas a  $25^\circ\text{C}$ , com 16 h luz e 8 h de escuro.

### **5.3 Aclimação das plantas**

Após o crescimento e enraizamento em Magenta, as plantas foram transferidas para recipientes plásticos contendo vermiculita, solo adubado-corrigido e substrato comercial Plantmax®, respectivamente, na proporção

1:2:3. A aclimação ocorreu mantendo o ambiente úmido durante três dias. Após este período, as plantas foram parcialmente expostas ao ambiente e irrigadas com água por mais três dias e logo após totalmente expostas ao ambiente mantendo a irrigação contínua.

As plantas aclimatadas foram mantidas na sala de crescimento sob temperatura de 27°C, 65% de umidade relativa e fotoperíodo de 16 horas de luz.

#### **5.4 Extração de RNA**

Todos os materiais utilizados para extração (cadinhos, pistilos de porcelana, microtubos, ponteiros e água destilada) foram autoclavados para limitar a ausência de atividade da RNase e garantir a qualidade dos RNAs extraídos. Para a extração, utilizou-se o protocolo de Trizol, onde 1 mL de trizol foi adicionado a 100 mg de tecido pulverizado e ambos foram agitados em vórtex mantidos 5 min à temperatura ambiente. Após este tempo, 200 µL de clorofórmio foram adicionados. Agitou-se e foram mantidos em repouso por 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, 750 µL de isopropanol foram adicionados e a mistura foi mantida 10 min à temperatura ambiente, posterior este período foi centrifugado a 8000 g por 8 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionados 500 µL de etanol 75%, agitados em vórtex e centrifugado a 8000 g por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado, a amostra foi levada a 37°C até secar e ressuspensa em água.

#### **5.5 Tratamento com DNase**

O RNA total extraído das amostras de *S. viridis* foram tratadas com o Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega), de acordo com o protocolo do

fabricante, para retirada de possíveis fragmentos de DNA genômico que poderiam ser extraídos junto com as amostras de RNA. As reações foram realizadas utilizando o termociclador modelo T-100 (BioRad). Ao microtubo, contendo 8 µg de RNA total, foram adicionados 1 µL de tampão Reaction buffer 10x e 1 µL da enzima RQ1 RNase Free. Essa reação foi incubada a 37°C por 30 min. Para inativar a enzima, 1 µL de RQ1 RNase Stop Solution (EGTA 20 mM pH 8) foi adicionado e a reação foi incubada a 65°C por 10 min. Para a avaliação da integridade e da qualidade das amostras, os RNAs assim tratados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e as amostras foram quantificadas em Nanovue plus (GE Healthcare Life Sciences).

## 5.6 Transcriptase reversa (RT)

Depois de verificar a ausência de DNAg nas amostras, foi realizada a síntese reversa da primeira fita do DNA complementar (cDNA) com base nos RNAm, utilizando o *primer* oligo dT<sub>15</sub>, o kit ImProm™ Reverse Transcriptase (Promega) e o termociclador modelo T-100 (BioRad). Em microtubos, adicionaram-se 1 µg de RNA total, 1 µL de oligo- dT<sub>15</sub> concentração final de 10 µM. A reação foi incubada a 70°C por 5 min para desnaturação das estruturas secundárias e, rapidamente, levada a 4°C por 5 min, para o anelamento dos *primers* aos RNAm. Após essa incubação, acrescentaram-se ao mesmo tubo 4 µL do tampão ImProm™ 5x Reaction Buffer, 1 µL de RNase Out (40U. µL<sup>-1</sup>), 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> na concentração de 25 µM, 1 µL do mix de dNTP na concentração final de 0,5 mM cada dNTP e 1 µL da enzima ImProm™ Reverse Transcriptase e água Milli-Q para se completar o volume final de 20 µL. Os tubos foram incubados no termociclador, a 25°C, durante 5 min para a fase de anelamento. A reação foi incubada (42°C, 60 min) para sintetizar a primeira fita

dos cDNase, posteriormente, a 70°C durante 15 min para inativar a enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

### 5.7 Análises da expressão por PCR quantitativo em tempo real

Para cada reação, foi utilizado 1 µL das diluições adequadas de cDNA, 0,2 µL do *primer forward*, 0,2 µL do *primer reverse* a 10 µM cada e 5 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen), este fluoróforo tem a capacidade de intercalar nas fitas duplas de cDNA. A reação foi completada com 3,6 µL de água Milli-Q para um volume final de 10 µL por reação. Para cada condição foi feita a mesma reação três vezes para sobrepor e confirmar os resultados no aparelho. Os dados foram analisados no programa 7500 Fast Software (software v 2.0.1). As amostras foram processadas em triplicatas, sempre acompanhadas dos controles negativo (NTC: “*no template control*”) que não contém cDNA. O controle negativo nas reações é usado para verificar a ausência de contaminação de cDNA exógeno nos mixes contendo SYBR, *primers* e água. Com o objetivo de verificar a especificidade de anelamento dos *primers* aos fragmentos alvos de interesse, foi realizada a análise das curvas de dissociação dos fragmentos amplificados ao final dos ensaios de qPCR, para cada par de *primers* utilizado. A expressão dos genes alvo foi normalizada com a expressão do gene *SiUBC* (Tabela 1) que codifica a ubiquitina e considerado como um controle endógeno eficiente para *Setaria viridis* (MOLINARI et al., 2013). A normalização foi realizada, utilizando-se a equação  $\Delta C_T = C_T$  (gene alvo) -  $C_T$  (controle endógeno). A calibração foi determinada pela fórmula  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  (amostra) -  $\Delta C_T$  (calibrador). O calibrador é uma amostra usada como base para resultados de expressão comparativa. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Os resultados foram normalizados usando  $C_T$ s (Ciclo *Threshold*) obtidos para controles endógenos

presentes na mesma reação. O  $C_T$  foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza o limiar (“*Threshold*”). O método usado foi o  $C_T$  comparativo (quantificação relativa).

Tabela 1 Pares de primers utilizados para caracterização molecular e qPCR. O par de primer *SiDH* F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> foi utilizado para caracterização molecular. Os primers *SiSDH* F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub> e *SiUBC18* F<sub>11</sub>/R<sub>11</sub> foram utilizados na análise de expressão por qPCR por apresentarem um *melting curve* com características melhores. O par de primer *CcUNK8* foi utilizado na caracterização molecular e qPCR. Os pares de primers são desenhados com base nas sequências de *Setaria italica* (*Si*)

Primer	Sequência		Amplicon
<b>Succinato desidrogenase</b> ( <i>SiSDH</i> )	TGTCGGCTCCTGTTGCAAAACAT	F <sub>1</sub>	95pb
	TCTCGATCTCCCACCG	R <sub>1</sub>	
<b>Succinato desidrogenase</b> ( <i>SiSDH</i> )	ACAGTTCAGCGCTACGTTCT	F <sub>2</sub>	112pb
	GGTGGCTAGAGGGACGGAT	R <sub>2</sub>	
<b>Ubiquitina</b> ( <i>SiUBC18</i> )	CCGGCGAAACCTACCAGTT	F <sub>11</sub>	57pb
	GAGCCTCCATGGGATAATGC	R <sub>11</sub>	
<b><i>CcUNK8</i></b>	GGCTGAAGCCAAATCTGCTA	F	170pb
	TCACATTTCCACGTGAATCC	R	

## 5.8 Extração de DNA

A 200 mg de tecido foliar vegetal pulverizado, adicionaram-se 750  $\mu\text{L}$  de cetyltrimethylammonium bromide CTAB (SAGHAI-MAROOF et al., 1984) mais 3  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, agitou-se e incubou-se por uma hora agitando por inversão a cada 10 minutos.

Adicionou-se ao tubo 1 volume de clorofórmio:álcoolisoamílico (2 4:1), agitou e centrifugou-se a 8600 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionaram-se 3  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg.mL<sup>-1</sup>), agitou por inversão e o tubo foi incubado em 37°C por 30 min.

Adicionou-se 0,6 Volume de isopropanol e agitou-se por inversão, o tubo foi levado para precipitar a -20°C por 1 h, posterior a este tempo o tubo foi centrifugado a 15000 g por 20 min a 4°C e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e centrifugado a 15000 g por 3 min a 4°C, os tubos foram levados para termobloco a 37°C para secar o excesso de etanol e ressuspendidos em água.

## 5.9 Análise da integração do T-DNA

Plantas T<sub>0</sub> de *S. viridis* transformadas com a construção contendo o cDNA *CcUNK8* geraram, no final do seu ciclo biológico, inflorescências contendo sementes que foram, então, utilizadas para o teste de segregação mendeliana.

As sementes foram colhidas, descascadas e esterilizadas em solução contendo 10 % (v/v) de hipoclorito de sódio e 0,1 % de Tween-20, durante 3 min e lavadas 3 vezes com água estéril. Após o processo de desinfestação, as sementes foram colocadas em placa de petri, contendo meio MS (MURASHIGE et al., 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 30 mg.L<sup>-1</sup> de higromicina e

solidificado com  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de phytigel e mantidos em sala de crescimento sob as condições descritas em 5.2.

Os dados obtidos, após o período de 10 dias de crescimento, foram analisados utilizando teste  $\chi^2$ , para verificação da hipótese de que houve a inserção de um gene dominante. O teste foi padronizado com 95 % de confiabilidade e 1 grau de liberdade.

### 5.10 Avaliações fenológicas

Uma triplicata biológica de plantas  $T_1$  foi aclimatada baseada em plantas geradas pelo processo de segregação mendeliana para, após o encerramento do seu ciclo biológico, as sementes pudessem ser novamente submetidas ao processo de avaliação de inserção gênica por meio da segregação mendeliana.

Um segundo bloco de 10 plantas de cada evento foi transferido para tubo de ensaio contendo meio MS suplementado com  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de higromicina para que esta geração de plantas  $T_1$  fosse analisada por meio de avaliações fenológicas. Deste bloco, 5 plantas foram selecionadas aleatoriamente e mantidas *in vitro* como matrizes. Com base nelas, foram retirados perfilhos que, subsequentemente, foram aclimatados para as medições fenológicas.

As avaliações fenológicas as quais as plantas foram submetidas são:

- a) altura da parte aérea, considerando a base da planta para a inserção da última folha (em cm);
- b) comprimento da lâmina foliar, considerando a inserção da bainha para o ápice (em cm);
- c) a largura da lâmina de folha na sua média secção (em cm);
- d) número de perfilhos e número de inflorescências.

Estas medidas foram realizadas uma vez por semana durante 6 semanas consecutivas desde a germinação até o desenvolvimento das inflorescências (Figura 10).

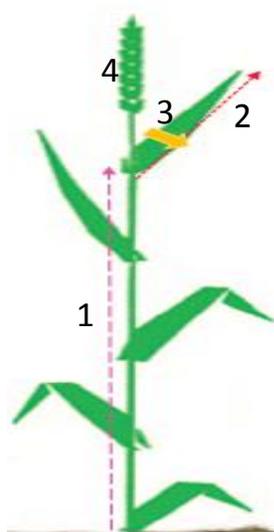


Figura 10 Medições realizadas nas plantas  $T_1$  de *S. viridis* para análises de fenologia. Os parâmetros observados e representados na figura foram altura (1), comprimento da lâmina foliar (2) e largura da lâmina foliar (3), número de inflorescências (4)

### 5.11 Razão parte aérea/ raiz

Plantas  $T_1$  avaliadas fenologicamente passaram por análise de razão massa fresca e seca de parte aérea/raiz. Na 6ª semana de avaliação, os pesos frescos (medidos com uma balança de precisão) da parte aérea e do sistema radicular foram avaliados para as plantas  $T_1$ . Os pesos secos das amostras foram medidos após secagem em estufa a 65°C por 24 h das amostras usadas para medir os pesos frescos.

### 5.12 Experimento de déficit hídrico

Da placa de segregação mendeliana de cada evento mencionada na Tabela 2, foram selecionados 10 indivíduos da geração T<sub>2</sub>. O experimento não foi realizado com clones, mas, sim, com indivíduos que poderiam possuir genótipos diferentes podendo ser homocigotos ou heterocigotos para a inserção do cDNA *CcUNK8*. Os indivíduos selecionados foram aclimatados, conforme o item 6.3 com 200 g de substrato em cada vaso e mantidas em uma bancada com as seguintes condições: Luz  $357 \pm 93$ , umidade relativa  $48 \pm 10$  %, temperatura  $23 \pm 3$  °C

As condições de crescimento foram as mais uniformes possíveis para minimizar os seus efeitos sobre o resultado final do experimento.

Para o teste de déficit hídrico, as plantas (transformadas e controle não transformado) com 32 dias de idade, que cresceram durante este período sem falta de irrigação, foram submetidas (NI, 5 plantas) ou não (I, 5 plantas) um período adicional de 7 dias de déficit hídrico.

Durante o período de sete dias de déficit hídrico, os dois tratamentos foram analisados diariamente. O índice de concentração de clorofila foi medido, utilizando o aparelho CCM-PLUS (Opti-Sciences) e os parâmetros de fluorescência de clorofila, por meio da abordagem de Curva de luz, utilizando um fluorômetro tipo Mini-PAM (Walz).

No último dia do experimento, as plantas foram submetidas ao teste destrutivo, durante o qual pesos frescos de raiz e de parte aérea foram realizados enquanto os pesos secos das mesmas amostras foram obtidos após secagem em estufa (72 h, 65°C). As raízes frescas foram, também, scaneadas (scanner EPSON Expression 10000XL 1.8 V1.0 2.00) e analisadas pelo software XLRhizo V2007a.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização molecular das plantas transgênicas de *S. viridis*

O DNAG das plantas T<sub>0</sub> de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* foi extraído e testado por PCR. Foi utilizado o par de primer específico do gene endógeno de *S. italica* *SiSDH* codificando para a succinato desidrogenase F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> e o par de primer para o *CcUNK8*. Para os 13 eventos T<sub>0</sub> de *S. viridis* e controle não transformado (WT), a reação visando caracterizar a presença do gene *SiSDH*, permitiu a amplificação de um fragmento de PCR de 95pb correspondendo ao tamanho do fragmento esperado para esse gene (Figura 11A). O DNAG das mesmas plantas foi, também, testado com o par de primers específico do cDNA *CcUNK8* presente no T-DNA do vetor pUBI:*CcUNK8* (Figura 11B). Com exceção do DNAG WT (planta não transformada), foi possível identificar a presença do cDNA *CcUNK8* de cafeeiro nos 13 eventos primários e independentes de transformação de *S. viridis*, o que sugere que o T-DNA do vetor pUBI:*CcUNK8* foi corretamente inserido nas plantas T<sub>0</sub>.

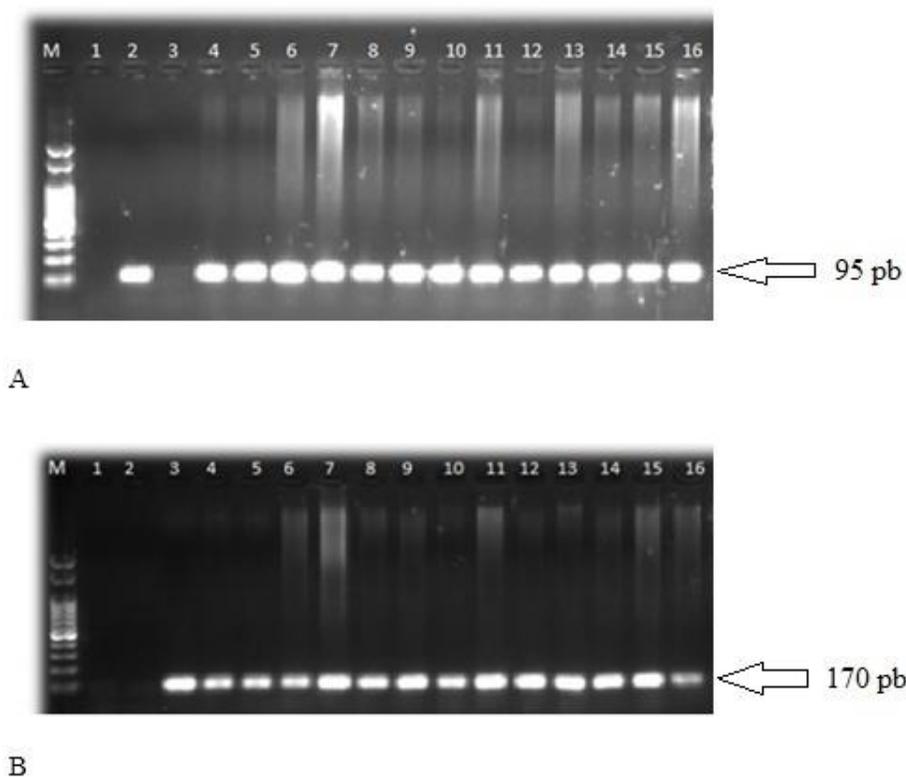


Figura 11 Caracterização molecular das plantas  $T_0$  de *S. viridis* por PCR convencional

Legenda: Os DNAs de folhas de plantas  $T_0$  de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* e do controle não transformado (WT) foram testados por PCR com (A) o par de *primer* do gene endógeno de *S. italica* *SiSDH*  $F_1/R_1$  codificando para a succinato desidrogenase e (B) o par de *primer* específico do cDNA *CcUNK8*. As amostras são definidas como: 1: água (controle negativo de PCR); 2: DNA extraído de planta não transformada; 3: plasmídeo pUBI:*CcUNK8* (controle positivo); 4: evento 53; 5: evento 54; 6: evento 56; 7: evento 58; 8: evento 59; 10: evento 60; 11: evento 62; 12: evento 64; 13: evento 65; 14: evento 66; 15: evento 67; 16: evento 70. Os amplicons foram separados com um gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. M: marcador molecular.

A mesma verificação foi realizada para as plantas  $T_1$  analisando para cada evento primário ( $T_0$ ) de transformação 3 plantas  $T_1$ . Isso permitiu confirmar de novo a presença do gene *SiSDH* em todas as plantas de *S. viridis* (Figura

12A) e a presença do cDNA *CcUNK8* somente nas plantas de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* (Figura 12B).

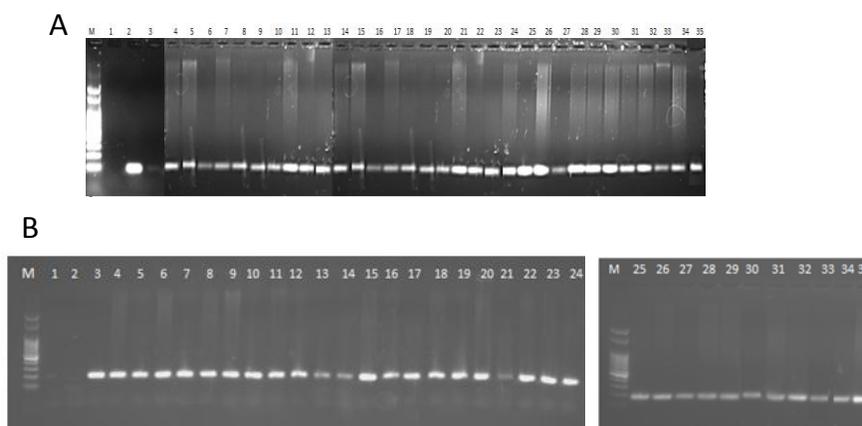


Figura 12 Caracterização molecular das plantas T<sub>2</sub> de *S. viridis* por PCR convencional

Legenda: Os DNAs de folhas de plantas T<sub>0</sub> de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* e do controle não transformado (WT) foram testados por PCR com (A) o par de *primer* do gene endógeno de *S. itálica* *SiSDH* F<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> codificando para a succinato desidrogenase e (B) o par de *primer* específico do cDNA *CcUNK8*. M: marcador molecular; canaletas e suas respectivas amostras 1: água; 2: controle não transformado; 3: controle positivo (plasmídeo); evento 53 (4-6); evento 54 (7-9); evento 56 (10); evento 58 (11-12); evento 59 (13-14); evento 60 (15-16); evento 62 (17-19); evento 63 (20-21); evento 64 (22-23); evento 65 (24-26); evento 66 (27-29); evento 67 (30-32). Evento 70 (33-35). Os amplicons foram separados com um gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

## 6.2 Expressão gênica de *CcUNK8*

A expressão do cDNA *CcUNK8* foi testada, por meio da técnica de PCR quantitativa (qPCR), nas folhas das 13 plantas (eventos primários) T<sub>0</sub> de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* (Figura 13A e 13B).

A ausência na literatura de genes de referência para qPCR em *S. viridis* levou a usar dois genes endógenos diferentes (*SiSDH* e *SiUBC18*), do genoma de referência de *S. italica*.

Independentemente do gene endógeno utilizado, e como esperado, nenhuma expressão do cDNA *CcUNK8* foi observada nas folhas da planta não transformada (WT) que foi usada como controle negativo nesse teste. Ao contrário, foi possível detectar a expressão do cDNA *CcUNK8* em todas as plantas transformadas T<sub>0</sub> de *S. viridis*, mas com níveis de expressão variáveis entre os eventos. Assim, a expressão mais baixa foi observada nas folhas do evento n°59, para os dois genes endógenos testados. Em razão dessa resposta, essa amostra foi usada nesse experimento como calibre interno do experimento (Quantificação Relativa [RQ] = 1). Do outro lado, a expressão mais elevada variou nas plantas T<sub>0</sub> em função do gene endógeno usado para padronizar os resultados. Assim, a expressão maior foi detectada no evento n° 62, ao usar o gene endógeno *SiUBC18* (Figura 13A). Enquanto a expressão maior foi detectada no evento n° 60 usando o gene endógeno *SiSDH* como mais expresso (Figura 13B). Para os outros eventos, observa-se, também, um gradiente de expressão do gene *CcUNK8*.

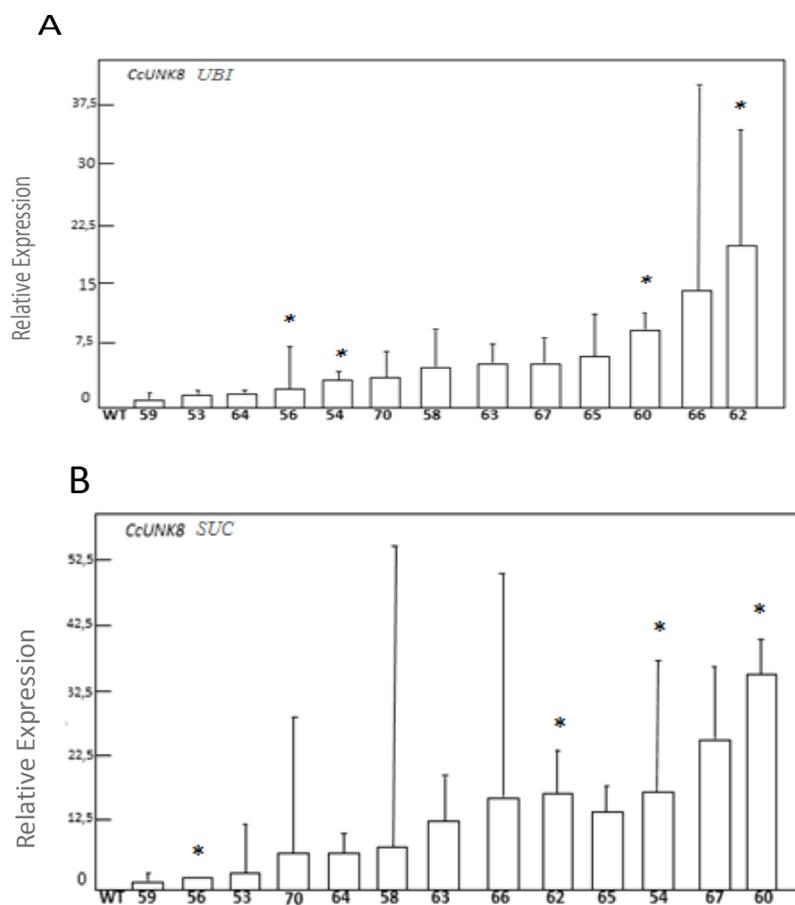


Figura 13 Expressão do cDNA *CcUNK8* analisado por RT-qPCR em folhas das plantas  $T_0$  de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*

Legenda: A expressão (medida em unidades arbitrárias) foi obtida utilizando os treze eventos primários  $T_0$  transformados (53, 54, 56, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 70) e na planta não transformada (WT, controle negativo). Os transcritos foram estandardizados utilizando a expressão do gene de referência *SiUBC18*  $F_{11}/R_{11}$  (Figura 13A). Na figura 13 B apresentam-se os resultados de expressão estandardizados com o gene *SiSDH*  $F_2/R_2$  para os mesmos eventos. Os valores de expressão relativa (foram realizados em três repetições técnicas). Os resultados foram expressos utilizando o evento n° 59 como calibrador interno (expressão relativa =1). WT: indivíduos não transformados. \* indivíduos selecionados para o experimento de déficit hídrico.

Em função da ampla presença na literatura e de estudos utilizando o gene da ubiquitina em *S. italica* como gene endógeno, para os ensaios de PCR quantitativas, as análises posteriores se basearam nos resultados gerados utilizando o gene *SiUBC18* como controle endógeno. A utilização da ubiquitina proporciona uma maior reprodutibilidade dos resultados gerados quando comparados aos resultados utilizando o gene *SiSDH*, possuindo, ainda, menores desvios padrão.

Esses resultados de expressão permitiram pré-selecionar quatro eventos de transformação (n° 54, 56, 60 e 62) que serão analisados por meio de déficit hídrico. Esses eventos foram escolhidos porque eles representam plantas com diferentes níveis de expressão do cDNA *CcUNK8*, os eventos [54/56] e [60/62] caracterizando baixa e alta expressão desse gene, respectivamente.

Para determinar se a expressão de cada evento é mantida na próxima geração sem ser alterada, a expressão *CcUNK8* foi, também, verificada nas folhas de plantas T<sub>2</sub> para cada um dos eventos pré -selecionados. Neste caso, a expressão desse gene foi analisada nas folhas das plantas n° 54, 56, 60 e 62 cultivadas com (I) ou sem (NI) irrigação (Figura 14).

### 6.3 Análise da integração do T-DNA

As sementes provenientes de autofecundação das plantas transformadas T<sub>0</sub> de *S. viridis* foram analisadas para a capacidade de germinar e crescer *in vitro* em meio MS adicionado de higromicina. Assim, em caso de inserção do T-DNA do vetor pUBI:*CcUNK8* em um locus único no DNAg das plantas transformadas T<sub>0</sub> de *S. viridis*, espera-se uma segregação de resistência à higromicina das plantas T<sub>1</sub> que seguisse a Lei de Mendel para um gene dominante com 75% das plantas Higr<sup>T</sup> e 25% das plantas Higr<sup>S</sup> na geração T<sub>1</sub>. Neste caso, as frequências de plantas Higr<sup>T</sup> e Higr<sup>S</sup> podem ser validadas pelo teste estatístico

$\chi^2$  permitindo de selecionar para os experimentos futuros as plantas transformadas T<sub>1</sub> contendo o T-DNA inserido em um locus único.

Nesta avaliação, os 13 eventos T<sub>0</sub> previamente testados por PCR contendo o cDNA *CcUNK8*, foram analisados.

As análises de  $\chi^2$  mostram que as plantas T<sub>1</sub> oriundas dos eventos T<sub>0</sub> n°53 e 65 apresentaram uma proporção de plantas Higo<sup>S</sup> maior do que esperada. Possivelmente na análise das plantas, oriundas dos eventos n° 53 e 65, houve uma superestimação na quantidade de plantas Higo<sup>S</sup>, ocorrendo por causa de sementes que não iriam germinar por causa da sua viabilidade e, mesmo assim, foram incluídas no grupo de Higo<sup>S</sup>. Entretanto, para os 11 outros eventos, os valores de  $\chi^2$  menores que 3,84 comprovam a inserção do T-DNA em um *locus* (Tabela 2).

Tabela 2 Análise de segregação do gene *hptII* na progênie T<sub>1</sub> das plantas transgênicas de *S. viridis* transformadas com pUBI:*CcUNK8*

Eventos	Sementes germinadas	Higo <sup>R</sup>	Higo <sup>S</sup>	$\chi^2$
<b>53</b>	<b>96</b>	<b>52</b>	<b>44</b>	<b>22,21</b>
<b>54*</b>	115	82	33	0,84
<b>56*</b>	82	62	20	0,016
<b>58</b>	133	93	40	1,82
<b>59</b>	46	31	15	1,41
<b>60*</b>	45	36	9	0,6
<b>62*</b>	146	118	28	2,64
<b>63</b>	121	96	25	1,21
<b>64</b>	147	112	35	0,1
<b>65</b>	<b>120</b>	<b>75</b>	<b>45</b>	<b>10</b>
<b>66</b>	111	77	34	1,87
<b>67</b>	136	99	37	0,34
<b>70</b>	94	73	21	0,34

Nota: Os valores de  $\chi^2$  menores que 3,84 foram utilizados para a avaliação estatística com o grau de liberdade de 1 considerando uma probabilidade de 0.05. Os eventos destacados em vermelho apresentaram valores de  $\chi^2$  superiores às taxas teóricas. (\*) eventos T<sub>1</sub> selecionados para o experimento de déficit hídrico.

Com esse teste mostrou-se os quatro eventos (nº 54, 56, 62 e 60) previamente escolhidos com base nos níveis variáveis de expressão do cDNA *CcUNK8*. Apresentam uma inserção do T-DNA em um locus, estes eventos foram cultivados por mais uma geração afim de identificar indivíduos homozigotos ( $\text{Higro}^T/\text{Higro}^T$ ) na geração  $T_1$  por meio da análise da progênie  $T_2$  (Tabela 3).

Tabela 3 Análise de segregação do gene *hptIII* na progênie  $T_2$  das plantas transgênicas de *S. viridis* transformadas com pUBI:*CcUNK8*

Evento	Sementes germinadas	Higro <sup>R</sup>	Higro <sup>S</sup>	$\chi^2$
<b>54 P1</b>	57	33	24	8,89
<b>54 P2 *</b>	72	57	15	0,66
<b>54 P3</b>	84	73	11	6,34
<b>56 P2*</b>	23	18	5	0,12
<b>60 P1 *</b>	20	16	4	0,266
<b>60 P3</b>	46	38	8	1,41
<b>62 P1</b>	61	52	9	3,41
<b>62 P2*</b>	27	18	9	1

Nota: Os valores de  $\chi^2$  menores que 3,84 foram utilizados para a avaliação estatística com o grau de liberdade de 1 considerando uma probabilidade de 0.05. Os eventos destacados em vermelho apresentaram valores de  $\chi^2$  superiores às taxas teóricas. (\*) eventos  $T_2$  selecionados para o experimento de déficit hídrico.

Na análise quanto à tolerância, a higromicina ocorreu no evento 54 uma subestimação de plantas Higro<sup>S</sup>, fazendo com que os valores teóricos fossem acima do aceito.

Como plantas Higro<sup>S</sup> foram observadas na geração  $T_2$ , essa nova análise de segregação mostrou que nenhum dos 4 eventos pré-selecionados estavam em homozigose na geração  $T_1$ . Mesmo assim, foi decidido realizar um ensaio preliminar de déficit hídrico com os 4 eventos selecionados, com plantas  $T_2$  assinalados na tabela 3.

## 6.4 Avaliações fenológicas

Baseado nos resultados do teste de  $X^2$  realizado na progênie  $T_1$ , análises de fenologia foram realizadas utilizando as plantas  $T_1$  selecionadas com base no teste da análise de integração do T-DNA (Tabela 2). Como o evento nº 59 apresentou problemas de enraizamento o que dificultou o seu cultivo, essas análises de fenologia foram realizadas com 10 eventos. Para as plantas não transformadas (WT) e cada evento, triplicatas biológicas foram utilizadas.

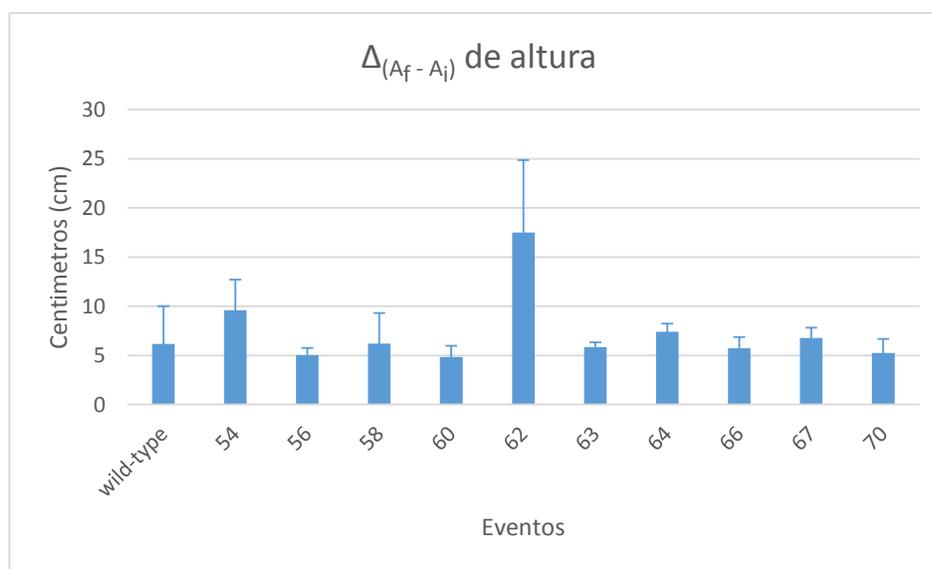


Figura 14 Variação média de altura (cm) de plantas  $T_1$  de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:CcUNK8 e as plantas não transformadas (WT). As medidas foram realizadas durante o período de 6 semanas, com um ponto de coleta de dados semanal

O primeiro parâmetro avaliado foi o crescimento das plantas, medido durante 6 semanas, com ponto semanal de coleta. Como na retirada de perfilhos, eles nem sempre apresentavam a mesma altura, a análise foi feita pela variação

de altura  $\Delta(A_f - A_i)$  entre o ponto final ( $A_f$ ) e ponto inicial ( $A_i$ ) (Figura 14). Por esta avaliação, foi possível identificar 4 eventos (nº 54, 62, 64 e 67) para os quais a variação de altura foi maior que nas plantas não-transformadas (WT). O evento nº 62 destaca-se por possuir uma altura média, aproximadamente, 2,5X maior que as plantas WT.

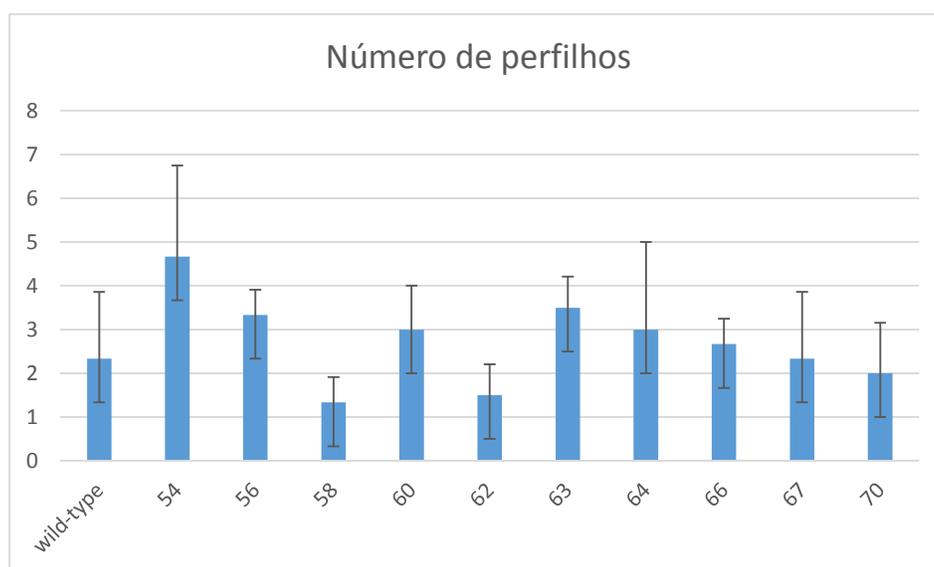


Figura 15 Número médio de perfilhos das plantas  $T_1$  de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* e indivíduos não transformados (WT). Dados obtidos na 6ª semana de análise dos eventos transformados e controle não transformado

A análise do número de perfilhos foi baseada somente nos dados coletados da última semana por possuírem na primeira semana de dados somente um perfilho por planta. Esses resultados mostram que os eventos nº 58, 62 e 70 possuem número médio de perfilhos inferior ao controle (Figura 15). Ao contrário, os eventos nº 54, 56, 60, 63, 64 e 66, possuem um número superior de perfilhos do controle.

Como a diferença entre crescimento em altura e no número de perfilhos não revela diretamente a biomassa acumulada em cada evento, um teste destrutivo foi realizado na 6ª semana para quantificação de biomassa da porção aérea e radicular dessas plantas.

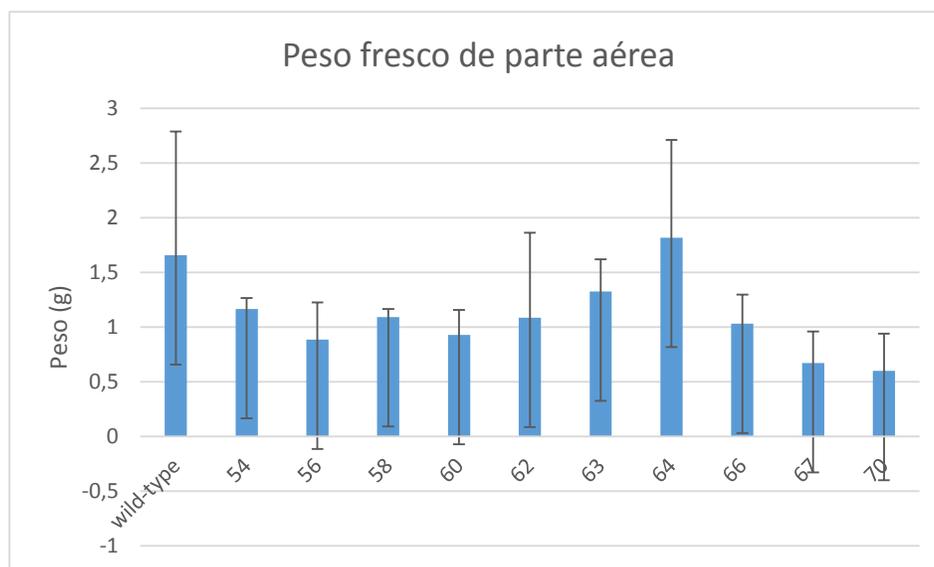


Figura 16 Peso fresco médio (g) da parte aérea de plantas  $T_1$  de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* e indivíduos não transformados (WT). Dados obtidos na 6ª semana de coleta de dados dos indivíduos transformados e não transformados

O acúmulo de biomassa revela que somente o evento nº 64 possui biomassa superior as plantas não-transformadas (WT) (Figura 16). Não existe uma correlação clara se o acúmulo de biomassa está relacionado com altura e/ou número de perfilhos.

### 6.5 Condições das plantas previamente à suspensão de água

O experimento de déficit hídrico de água foi realizado para avaliar as respostas das plantas expressando o cDNA *CcUNK8*. Neste caso, os indivíduos Higr<sup>T</sup> T<sub>2</sub> utilizados para este teste foram selecionados durante a análise de integração (Tabela 3). As plantas, que iniciaram o experimento, apesar de possuírem o mesmo tempo inicial, portanto, tinham a mesma idade 32 dias, encontravam-se em estádios de desenvolvimento completamente diferentes (Figura 17).

No geral, as plantas T<sub>2</sub> possuíam aspectos morfológicos visuais diferenciados (maior nº de perfilhos e altura) quando comparados aos indivíduos não transformados. Mesmo sido cultivadas nas mesmas condições de substrato, recipiente e local, constatou-se uma forte heterogeneidade entre as plantas de mesmo evento.

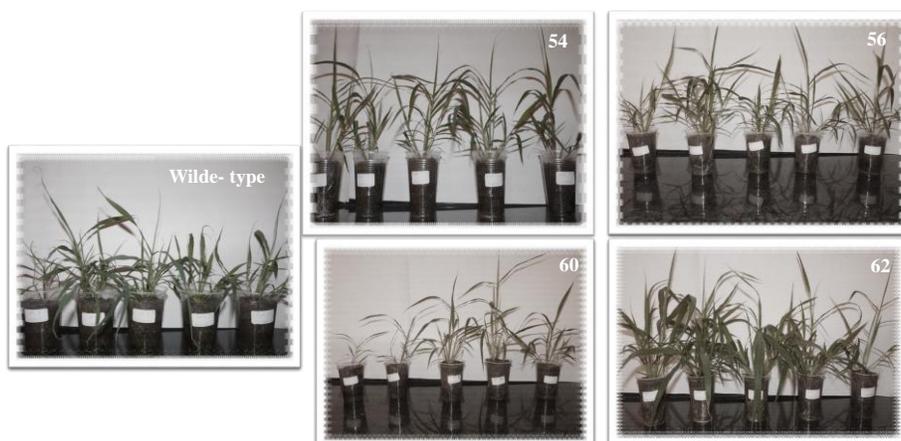


Figura 17 Aspecto visual das plantas T<sub>2</sub> de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*. Após germinar *in vitro*, as plantas Higr<sup>T</sup> foram cultivadas em condições controladas (RH, fotoperíodo, T°C durante 32 dias com irrigação

### 6.5.1 Condições das plantas posteriormente à suspensão de água

Durante os 3 dias após a suspensão de água, o aspecto visual das plantas de *S. viridis* foi semelhante aos respectivos controles. Os sintomas clássicos de estresse por déficit hídrico (murcha e enrolamento foliar, crescimento reduzido) tornaram-se evidentes por volta do 5<sup>o</sup> dia após a suspensão da irrigação, sendo mais pronunciados para os eventos T<sub>2</sub> n° 54, 62 e 56 (Figura 18).

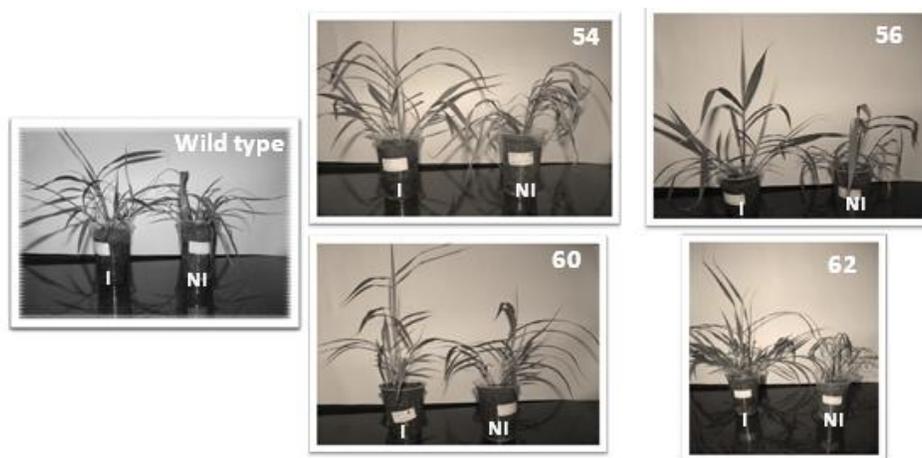


Figura 18 Aspecto visual das plantas T<sub>2</sub> de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:CcUNK8 aos 39 dias após a germinação. Grupos de plantas de cada genótipo foram submetidos à irrigação (I) ou à suspensão da irrigação (NI) considerando 32 dias após a germinação

### 6.5.2 Potencial hídrico

Para avaliar o potencial hídrico foliar das plantas sem que houvesse comprometimento das análises de biomassa, os potenciais foram medidos somente com uma folha de cada indivíduo, selecionado aleatoriamente entre as 5 plantas de cada evento submetidas aos dois tratamentos (I e NI). Para a análise

foram utilizadas duas porções de uma mesma folha selecionada aleatoriamente em cada indivíduo.

Os valores dos potenciais hídricos medidos nas folhas das plantas de *S. viridis* irrigadas encontram-se entre -0,15 e -0,77 Mpa. Foram compatíveis com plantas não estressadas (Tabela 4). Com exceção do evento nº 60, houve uma queda dos potenciais hídricos após a suspensão da irrigação para todos os eventos. No entanto, essa queda de potencial hídrico foi variável entre os eventos, com uma forte queda para o evento nº 62 e quedas menores para os eventos nº 54 e 56.

Tabela 4 Potencial hídrico (MPa) em folhas de plantas T<sub>2</sub> de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*

Tratamento	Genótipo				
	WT	54P2	62P2	60P1	56P2
Irigado	-0,77	-0,56	-0,15	-0,73	-0,53
Não irrigado	-0,91	-1,61	-2,72	-0,50	-1,50

Nota: Os potenciais foram medidos aos 39 dias após a germinação. Grupos de plantas de cada genótipo foram submetidos (I) ou não (NI) à irrigação considerando 32 dias após a germinação.

### 6.5.3 Expressão relativa do cDNA *CcUNK8* em *S. viridis*

Os níveis de expressão relativa variam entre 0,5 - 5,0 na condição I. Se comparados os níveis de expressão obtidos anteriormente em plantas T<sub>0</sub>, observa-se uma redução em todos os eventos transformados. Na condição NI os níveis de expressão variam entre 0,5 - 3,0 (Figura 19).

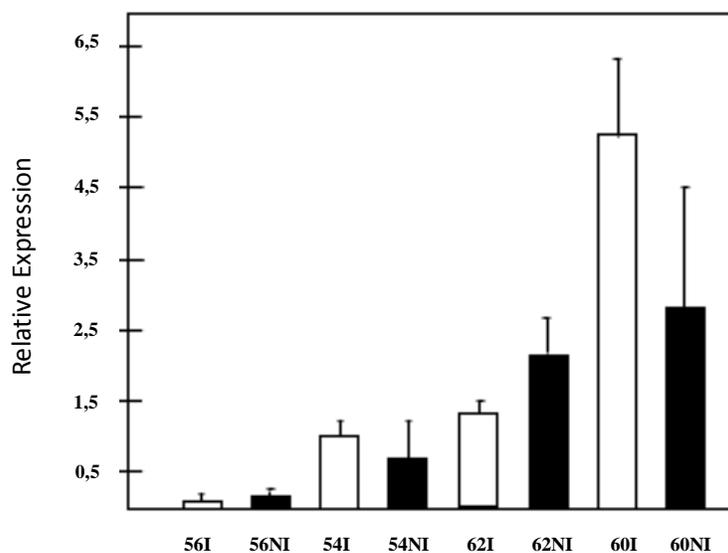


Figura 19 Expressão do cDNA *CcUNK8* analisado por RT-qPCR em folhas das plantas  $T_2$  de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*. A expressão foi obtida utilizando quatro eventos transformados (54, 56, 60, 62) e controle não transformado (WT) na condição de irrigação (I) e não irrigação (NI). Os transcritos foram standardizados utilizando a expressão do gene de referência *SiUBC F<sub>2</sub>/R<sub>2</sub>* que codifica para a proteína ubiquitina. Os valores de expressão relativa (expressos em unidades arbitrárias) foram realizados em três repetições técnicas. Os resultados foram expressos utilizando o evento n° 54 I como calibrador interno (expressão relativa =1)

O cDNA de *CcUNK8* encontra-se sob o controle de um promotor constitutivo *ZmUBI* entre os diferentes regimes hídricos, constata-se de fato que não há diferenças dos níveis de expressão do tratamento irrigado (I) e não irrigado (NI) entre o mesmo evento de transformação.

Houve, no entanto, uma inversão do evento que possui maior expressão. Em  $T_0$  era o de n° 62 e em  $T_2$  é o de n° 60 utilizando o par de *primer SiUBC18*. Entretanto, os eventos que possuíam menor nível de expressão (n° 56 e 54),

mantiveram-se com nível de expressão baixo. Os nº 62 e 60 que possuíam maior nível de expressão permanecem com o nível alto.

#### **6.5.4 Índice de concentração de clorofila (ICC)**

O ICC foi determinado nas folhas das plantas dos diferentes genótipos de *S. viridis*, durante sete dias, com base na suspensão da irrigação, comparando-se plantas irrigadas (I) e não-irrigadas (NI) (Figura 20).

Para cada evento e, até o terceiro dia após a suspensão da irrigação, os valores de ICC, não apresentaram diferenças significativas em função do regime hídrico (I e NI). A partir do 4º dia, o ICC das plantas NI dos eventos nº 60, 54 e WT, aumentaram em relação às plantas irrigadas dos mesmos eventos. Ao contrário, o ICC das plantas NI dos eventos nº 62 e 56 diminuíram nesse mesmo período. Para todas as plantas I e NI, houve uma leve queda dos valores de ICC nos 2 últimos dias. No final do período de avaliação, o ICC das plantas NI ou foram inferiores (como no caso dos eventos nº 54, 62, 56) ou não diferiram em comparação às plantas I (como foi o caso do evento nº 60 e nas plantas WT).

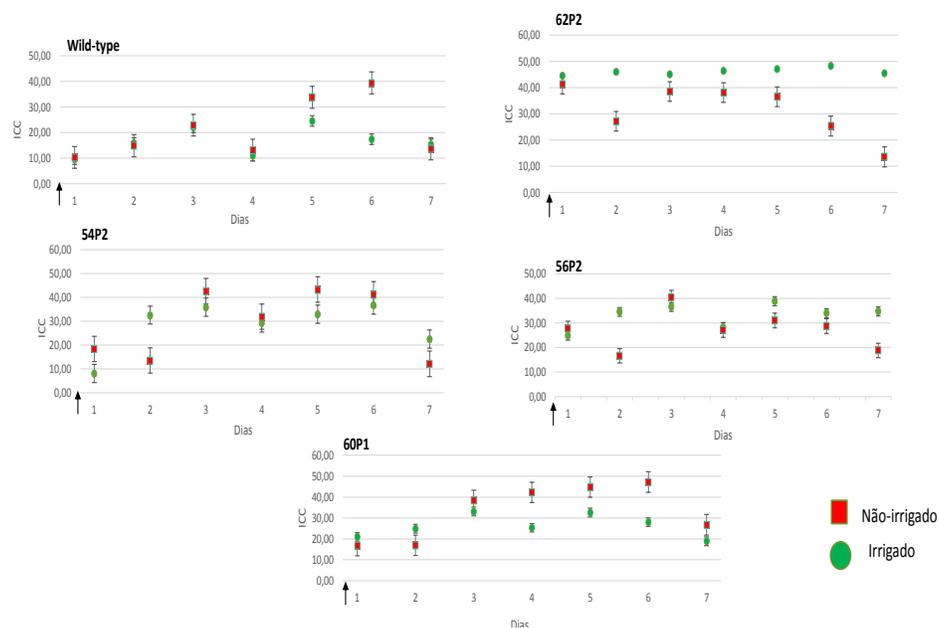


Figura 20 Índice de concentração de clorofila (ICC) em folhas das plantas T<sub>2</sub> de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*

Legenda: Grupos de plantas de cada evento foram submetidos à irrigação (símbolo verde) ou à suspensão da irrigação (símbolo vermelho) considerando 32 dias após a germinação. A seta indica o último dia em que as plantas foram irrigadas.

### 6.5.5 Variáveis que definem a arquitetura radicular

No 6º dia após a suspensão da irrigação, as plantas T<sub>2</sub> dos eventos de *S. viridis*, submetidas ou não à suspensão de água, foram colhidas para recolher o sistema radicular que foi escaneado para a determinação de variáveis que definem a arquitetura radicular (Tabela 5).

Tabela 5 Variáveis componentes da arquitetura do sistema radicular de plantas de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o cDNA *CcUNK8*, aos 39 dias após a germinação

Genótipo	Variável componente da arquitetura do sistema radicular							
	Comprimento		Área		Volume		Diâmetro	
	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI
Wild-type	192,5Ab (33,7)	261,1 Aa (62,8)	10,9 Ab (0,8)	16,1 Ab (3,9)	2,4 Ab (0,9)	3,5 Ab (0,6)	0,8 A (0,05)	0,9 A (0,08)
56	405,5Ab (51,9)	272,3 Aa (28,7)	22,5 Ab (2,1)	15,3 Ab (3,3)	5,1Bb (2)	6 Aab (2)	0,8 A (0,05)	1 A (0,1)
54	167,1 Aa (64,4)	250,9 Ba (41,7)	64,4 Aa (9,4)	15,4 Aa (3,4)	2,3Aa (3,3)	5,7 Ba (1,5)	1,7 A (1)	1 A (0,1)
62	435,9 Aa (62,4)	332,7 Aa (48)	24,7 Aa (1,4)	19,6 Bb (2,2)	10,7 Ab (4,8)	8 Ab (1,1)	1 B (0,2)	1,1 A (0,1)
60	362,2 Aa (163,9)	254,4 Ba (69,9)	21,1 Aa (6,1)	15,6 Bb (4,7)	4 Ab (3,7)	3,9Aab (0,9)	0,7 B (0,1)	1,1 A (0,9)

Nota: Grupos de plantas de cada evento foram submetidos a (I) ou não (NI) irrigação considerando 32 dias após a germinação. Análises estatísticas realizadas, médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com exceção do evento 54, os valores de comprimento, da área e do volume do sistema radicular dos eventos transgênicos T<sub>2</sub> irrigados sempre foram maiores do que o das plantas WT. Para os outros eventos vale ressaltar que o evento n° 62 sempre apresentou raízes mais compridas, com maior área e volume que o evento n° 56, enquanto o evento n° 60 sempre apresentou valores mais baixos para esses parâmetros. O diâmetro das raízes não apresentou diferenças nem entre os eventos e nem entre estes e as plantas não transformadas/WT.

Para as plantas submetidas à suspensão da irrigação (NI), houve aumento no comprimento e na área do sistema radicular das plantas WT e para o evento n° 54. O contrário aconteceu para os demais eventos, ou seja, as plantas apresentaram uma redução nos valores dessas variáveis, comparando-se com as plantas irrigadas. O volume radicular, por sua vez, apresentou aumento nas

plantas selvagens e nos eventos n° 56 e 54, diminuiu no evento n° 62 e manteve-se no mesmo patamar no evento n° 60.

Apesar de terem mostrado maiores reduções percentuais nas variáveis que definem a arquitetura do sistema radicular em razão da suspensão da irrigação, os eventos n° 56 e 62, ainda, apresentaram sistema radicular maior do que o WT e dos demais eventos.

### 6.5.6 Acúmulo de biomassa fresca

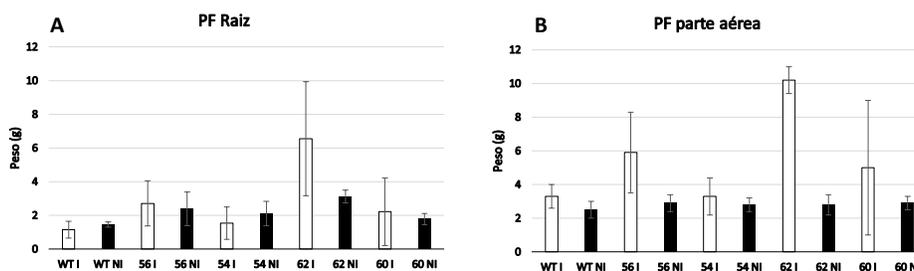


Figura 21 Média dos pesos frescos (PF em gr.) de raiz (A) e parte aérea (B) de plantas de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*

Nota: As análises foram feitas com 39 dias de idade. Plantas irrigadas (isobarras brancas) e plantas não-irrigadas (isobarras pretas) durante os 7 dias de tratamento. Os nomes dos eventos são indicados abaixo de cada isobarra.

O acúmulo de biomassa fresca nas raízes (Figura 21A) e parte aérea (Figura 21B) das plantas irrigadas T<sub>2</sub> de *S. viridis* foi maior em todos os eventos em relação ao WT. Para as plantas NI, a quantidade de biomassa fresca aérea e radicular apresentou variações em função do evento analisado. Assim, houve um aumento da biomassa radicular nas plantas WT e no evento n° 54, enquanto os demais genótipos apresentaram uma leve redução dessa biomassa, a qual foi mais acentuada para o evento n° 62. Na parte aérea, houve redução da biomassa acumulada em todos os eventos. A redução na biomassa acumulada (tanto nas

raízes quanto na parte aérea) observada com a suspensão da irrigação foi mais acentuada no evento nº 62.

#### **6.5.7 Discussão do experimento de déficit hídrico**

Uma vez que o ICC está relacionado à molécula de clorofila, cuja síntese/degradação é regulada por fatores intrínsecos e extrínsecos, é natural que os seus valores mostrassem variação ao longo da vida da folha e do ciclo da planta. Consequentemente, uma análise mais criteriosa dessa variável deve levar em consideração as tendências, durante o período de avaliação, em vez de se considerar apenas os valores diários de forma isolada. Além disso, para o estudo em questão, é preciso relacionar o ICC à taxa de crescimento, bem como ao potencial hídrico das plantas, uma vez que o único fator extrínseco que houve variação foi a disponibilidade de água no substrato.

As mudanças nos valores de ICC, bem como na taxa de crescimento nas plantas dos diferentes eventos T<sub>2</sub> de *S. viridis* em estudo, que tiveram a irrigação suspensa, são uma consequência da disponibilidade de água no substrato, que se refletiu no potencial hídrico foliar. Observa-se que, normalmente, ocorre numa situação de déficit hídrico em plantas em razão dos seguintes eventos: fechamento estomático, aumento da temperatura foliar, diminuição do conteúdo relativo de água e, concomitantemente, do potencial hídrico, redução da taxa de crescimento, diminuição da concentração de clorofila e, por último, mudanças em variáveis relacionadas ao aparato fotoquímico.

Os eventos T<sub>2</sub> nº 62, 56 e 54 de *S. viridis* são os quais apresentaram maior taxa de crescimento e, consequentemente, maior taxa de transpiração, tanto em condições I e NI. Isso explica porque eles exauriram a água disponível no substrato neste último caso. Como consequência, esses mesmos eventos tiveram maior redução no potencial hídrico foliar e de taxa de crescimento, além

de aumento na degradação de clorofila, que culminou com baixo ICC, em relação às plantas irrigadas. Diferentemente, as plantas WT e do evento n° 60, cujas taxas de crescimento foram menores, não exauriram a água retida no substrato e, portanto, o potencial hídrico foliar não diminuiu consideravelmente no período em estudo. Consequentemente, essas plantas apresentaram menor redução na taxa de crescimento em virtude da seca em relação aos demais genótipos. O ICC dessas plantas NI apresentou um aumento inicial, provavelmente, em decorrência da combinação da redução na taxa de crescimento, sem alteração na taxa de síntese/degradação de clorofila, o que culminou com um aumento na quantidade de clorofila por área. À medida que o déficit hídrico se intensificou, a taxa de degradação de clorofila finalmente tornou-se maior do que a síntese, o que pode ser inferido pela queda abrupta no ICC entre o 5° e o 6° dia nas plantas não irrigadas. Provavelmente, se essas plantas tivessem sido mantidas por mais algum tempo em condições não irrigadas, o ICC delas teria caído abaixo do ICC das plantas irrigadas, da mesma forma que ocorreu com os demais genótipos.

#### **6.5.8 Análise do número de perfilhos**

Outra análise realizada anteriormente ao teste destrutivo foi o número de perfilhos que os indivíduos apresentavam (Figura 22). Um número médio superior de perfilhos é observado nas plantas irrigadas. Como a água é um fator determinante para a taxa de crescimento, neste caso não só em altura quanto na expansão lateral de perfilhos que futuramente serão responsáveis pelo lançamento de inflorescências. O processo de expansão de biomassa nos indivíduos NI é afetado e a água disponível é utilizada para manutenção da homeostase e não para expansão celular.

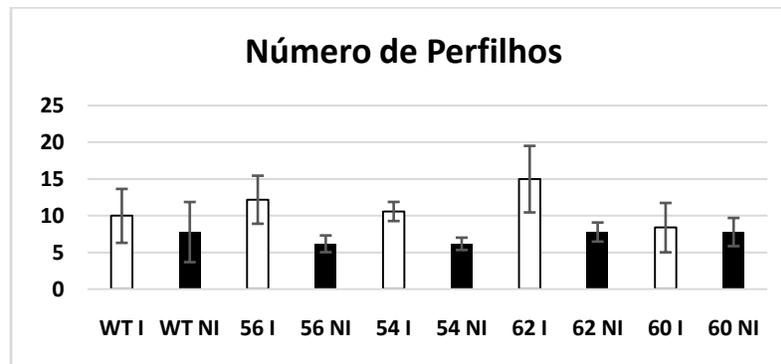


Figura 22 Número médio de perfilhos das plantas  $T_2$  de *S. Viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8* aos 39 dias após a germinação. Os eventos transformados (54, 56, 60 e 62) com *CcUNK8* e não transformado (WT), sob 7 dias dos tratamentos irrigado (I) [isobarras brancas] e não-irrigado (NI) [isobarras pretas].

## 7 CONCLUSÕES

- a) O protocolo de transformação realizado (BRUTNELL et al., 2010) utilizando *S. viridis* mostrou-se eficiente, pois permitiu o isolamento de 13 eventos primários (T<sub>0</sub>) de plantas que apresentaram a inserção do T-DNA do vetor pUBI:*CcUNK8* do DNAg delas.
- b) A inserção do T-DNA vinculado ao cDNA *CcUNK8* de *C. canephora* sobre o controle do promotor pUBI foi verificada por PCR em todos os indivíduos transformados.
- c) Com os testes de segregação, foi possível confirmar a inserção do T-DNA em um *locus* na maior parte das plantas transformadas de *S. viridis*.
- d) A expressão do cDNA *CcUNK8* ocorreu em níveis variados nos indivíduos T<sub>0</sub>. Essa variação pode ser explicada em razão do efeito de posicionamento do T-DNA inserido no DNAg de cada um dos eventos.
- e) As análises de fenologia realizadas com indivíduos T<sub>1</sub> permitiram de adquirir mais conhecimentos sobre o ciclo de vida da *S. viridis* e as modificações ocorridas em cada fase do ciclo.
- f) Nas condições em que ocorreram as análises de fenologia, foi possível observar um acúmulo de biomassa maior nos eventos T<sub>1</sub> que nas plantas WT (não transformadas). Não foi possível correlacionar as alterações fenológicas observadas com os níveis de expressão do cDNA *CcUNK8*.
- g) Os indivíduos T<sub>2</sub> selecionados para o experimento de seca, apresentavam uma alta heterogeneidade. Por causa deste fato, não foi possível determinar a expressão do cDNA *CcUNK8* como único fator para as variações fenológicas observadas.

- h) Os indivíduos T<sub>2</sub> que foram utilizados para amostragem do potencial hídrico no último dia de seca, mostraram que nem todos se encontravam estressados. O déficit hídrico severo foi observado em indivíduos que possuíam maior biomassa, portanto, possuíam uma demanda hídrica maior para manter o seu metabolismo. As plantas T<sub>2</sub> do evento nº60 não se encontravam em déficit hídrico o que poderia estar relacionado à sua menor biomassa.
- i) Demonstrou-se que o índice de concentração de clorofila (ICC) possui níveis diferentes em plantas irrigadas e não-irrigadas. A queda dos níveis no último dia de seca mostra uma concentração de clorofila nas folhas para a maioria dos eventos, possivelmente, em função da ausência de água.
- j) Observou-se uma redução do ICC em plantas submetidas ao estresse hídrico, quando comparadas a plantas irrigadas. O déficit hídrico afeta a concentração de pigmentos, reduzindo a capacidade fotossintética. A deficiência de água no solo, provavelmente, afetou o desenvolvimento da cultura, promovendo diminuição da área foliar e do ICC.
- k) Aumento de biomassa radicular e aérea foram obtidos na maior parte dos eventos quando comparados às plantas não-transformadas. O aumento de biomassa pode ser reflexo (1) da própria expressão do cDNA *CcUNK8* ou (2) a uma mutação do genoma de *S. viridis* provocada pela própria inserção do T-DNA do vetor pUBI:*CcUNK8*.
- l) O acúmulo de biomassa dos indivíduos T<sub>2</sub> não se correlaciona diretamente com os níveis de expressão do cDNA *CcUNK8*. Apesar do evento nº 62 apresentar maior expressão desse gene e maior biomassa, a correlação não pode ser estabelecida para os demais eventos T<sub>2</sub> de *S. viridis*.

## 8 PERSPECTIVAS

- a) A expressão do cDNA *CcUNK8* deve ser verificada nos indivíduos  $T_1$  para confirmar se os níveis de expressão se alteram com as gerações. Mesmo controlado por um promotor constitutivo.
- b) A busca de indivíduos homozigotos ( $Higro^T/Higro^T$ ) necessários para avaliar corretamente os efeitos do transgene pUBI:*CcUNK8* será refeita com base em nova análise de segregação de  $T_2/T_3$  para todos os eventos. As plantas selecionadas, durante este teste, serão utilizadas para lançar um novo ensaio de estresse hídrico, padronizando as condições de crescimento das plantas o que permitirá reduzir a heterogeneidade das plantas que deverão ser analisadas.
- c) Como não se pode descartar a possibilidade que o T-DNA do vetor pUBI:*CcUNK8* se inseriu em tandem no DNA dos eventos de *S. viridis*, experimentos de qPCR serão realizados para determinar o número de T-DNA inseridos.
- d) Mesmo se foi mostrado que o cDNA *CcUNK8* foi transcrito em folhas dos eventos  $T_0$  e  $T_2$  de *S. viridis*, não se verifica se a síntese da proteína *CcUNK8* ocorreu. Assim, as análises SDS-PAGE serão realizadas para observar a presença da proteína *CcUNK8*. Essas análises poderão ser completadas pelo uso da espectrometria de massa para caracterizar a presença desta proteína.
- e) A expressão do cDNA *CcUNK8* poderá ser, também, testada nas raízes das plantas transformadas de *S. viridis* e comparada aos níveis de expressão observados nas folhas e, também, aos dados dos sistemas radiculares observados entre os eventos

- f) Visando diminuir os fatores que podem influenciar os resultados durante o novo experimento de suspensão de água que deverá ser realizado com as plantas T<sub>3</sub>, é necessário seguiras seguintes alterações:
- utilizar plantas homozigotas para estudar o efeito da expressão do transgene *CcUNK8* no contexto de um material mais homogêneo;
  - germinaras plantas T<sub>3</sub> em substrato para não alterar o desenvolvimento do sistema radicular das plantas;
  - amostrar um número maior de plantas para realizar várias medidas de potencial hídrico que permitam avaliar este parâmetro com confiabilidade.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, Dec. 2006.
- ALONSO-SALCES, R. M. et al. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 10, p. 4224-4235, May 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, May 1990.
- ALVES, R. C. et al. Health benefits of coffee: myth or reality. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, abr. 2009.
- ASSAD, E. D. et al. Climatic changes impact in agroclimatic zoning of coffee in Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, nov. 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Saiba mais**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 10 maio 2014.
- BRUTNEL, T. P. et al. *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 2537-2544, Aug. 2010.
- CARNEIRO, F. A. et al. Avaliação fenotípica de uma população de *Coffea canephora* var. Conillon cultivada em altitude elevada, visando um programa de seleção genômica ampla (SGA) em cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 8., 2013, Salvador. **Anais...** Salvador: Consórcio Pesquisa Café, 2013. 1 CD-ROM.

CHRISTENSEN, A. H. et al. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 675-689, Feb. 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamento de safra**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 10 maio 2014.

CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, Ottawa, v. 51, n. 1, p. 50-63, Jan. 2008.

CUBRY, P. et al. Global analysis of *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Rubiaceae) from the Guineo-Congolese region reveals impacts from climatic refuges and migration effects. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 483-501, May 2012.

DAVIS, A. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data: implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 167, p. 357-377, Dec. 2011.

DEVOS, K. M. et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 555-561, Mar. 2012.

DOUST, A. N. et al. Foxtail millet: a sequence-driven grass model system. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, p. 137-141, Jan. 2009.

DUJON, B. The yeast genome project: what did we learn? **Trends in Genetics**, London, v. 12, p. 263-270, July 1996.

FAZUOLI, L. C. et al. Seleção antecipada e sua eficiência no café Icatu. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: SBC, 2000. p. 576-582.

FIGUEIREDO, M. do V. B. et al. Bioinformática aplicada ao estudo de genomas expressos (EST) em plantas. In: HOULLOU-KIDO, L. M. et al. (Ed.).

**Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais.** Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2010. p. 257-332.

FISHER, S. Using OrthoMCL to assign proteins to OrthoMCL-DB groups or to cluster proteomes into new ortholog groups. In: \_\_\_\_\_. **Current protocols in bioinformatics.** Somerset: University of Bath, 2011. p. 1-19.

FLEXAS, J. et al. Drought-inhibition of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants: stomatal and Non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, n. 2, p. 183-189, Feb. 2002.

GONÇALVES, W. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a nematóide. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1999. 1 CD-ROM.

GUILLEY, H. et al. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. **Cell**, Cambridge, v. 30, p. 763-773, Oct. 1982.

GUO, W. J. et al. Significant comparative characteristics between orphan and nonorphan genes in the rice (*Oryza sativa L.*) genome. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 2007, p. 1-7, Sept. 2007.

HIGDON, J. V. et al. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 46, n. 2, p. 101-123, Jan. 2007.

HORAN, K. et al. Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 147, n. 1, p. 47-51, May 2008.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Historical data.** Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em: 10 maio 2014.

KHALTURIN, K. et al. More than just orphans: are taxonomically-restricted genes important in evolution? **Trends in Genetics**, London, v. 25, n. 9, p. 404-413, Sept. 2009.

KOONIN, E. V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 39, p. 309-338, Dec. 2005.

LAMBOT, C. et al. Evaluation of conilons for genetic diversity, cup quality and biochemical composition. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 22., 2008, Campinas. **Proceedings...**Campinas: ASIC, 2008.1 CD-ROM.

LASHERMES, P. et al. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. **Genomics of Tropical Crop Plants**, London, v. 1, n. 9, p. 203-225, 2008.

LEROY, T. et al. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 229-242, Jan. 2006.

LEROY, T. et al. Improving the quality of African robustas: QTLs for yield- and quality-related traits in *Coffea canephora*. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 7, p. 781-798, Mar. 2011.

LIMA, A. L. S. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 47, n. 3, p. 239-247, May 2002.

LIN, C. W. et al. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 114-130, Dec. 2005.

MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought stress in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, Elmsford, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, June 2012.

MISHRA, M. K. et al. Recent advances in the genetic transformation of *Coffea*. **Biotechnology Research International**, Cairo, v. 2012, p. 1-17, June 2012.

MOLINARI, H. B. C. et al. Grass cell wall feruloylation: distribution of bound ferulate and candidate gene expression in *Brachypodium distachyon*. **Frontiers in Plant Science**, New York, v. 4, p. 1-10, Mar. 2013.

MONDEGO, J. M. C. et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, p. 11-30, Feb. 2011.

MONTAGNON, C. et al. Amélioration génétique du caféier *Coffea canephora* Pierre: connaissances acquises, stratégies et perspectives. **Cahiers Agricultures**, Madrid, v. 21, n. 2/3, p. 143-153, June 2012.

MONTAGNON, C. et al. Heritability of *Coffea canephora* yield estimated from several mating designs. **Euphytica**, Wageningen, v. 133, p. 209-218, Aug. 2003.

MONTOYA, G. et al. Sequence analysis from leaves, flowers and fruits of *Coffea arabica* var. Caturra. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 21., 2006, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: ASIC, 2006. 1 CD-ROM.

MUELLER, L. A. et al. The tomato sequencing project, the first cornerstone of the international *Solanaceae* Project (SOL). **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 6, n. 3, p. 153-158, Apr. 2005.

MURASHIGE, T. et al. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, July 1962.

PENDERGRAST, M. Coffee: second to oil? **Tea and Coffee Trade Journal**, New York, p. 38-41, Apr. 2009.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 101-108, Mar. 2005.

PONCET, V. et al. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 276, n. 5, p. 436-449, Nov. 2006.

RANZ, J. M. et al. Newly evolved genes: moving from comparative genomics to functional studies in model systems. **BioEssays**, Cambridge, v. 34, p. 477-483, June 2012.

SAGHAI-MAROOF, M. A. et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, Dec. 1984.

SILVA, A. T. et al. Identification of expressed sequences in the coffee genome potentially associated with somatic embryogenesis. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p.1698-1709, May 2013.

TAUTZ, D. et al. The evolutionary origin of orphan genes. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, n. 10, p. 692-702, Oct. 2011.

VIDAL, R. et al. 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**, Bethesda, v. 154, p. 1053-1066, Nov. 2010.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.

VIEIRA, N. G. **Identificação e caracterização de genes órfãos (“no hits”) de café (*coffea spp.*)**. 2013. 125 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

VIEIRA, N. G. et al. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 6, n. 4, p. 181-190, July 2013.

YOSHIFUMI, I. et al. Cloning vectors derived from the pseudomonas plasmid PVS1. **Gene**, Amsterdam, v. 36, p. 27-36, Mar. 1985.