

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS PARA A TOLERÂNCIA À SECA EM FOLHAS DE CLONES DE *Coffea canephora* VAR. CONILLON, CARACTERIZADOS FISIOLÓGICAMENTE

Pierre MARRACCINI^{1,3}, E-mail: marraccini@cirad.fr; Vânia A. DA SILVA²; Sonia ELBELT¹; Breno L. S. GUIMARÃES²; Marcelo E. LOUREIRO²; Fábio M. DAMATTA²; Maria A. G. FERRÃO³; Aymbiré F.A. DA FONSECA³; Felipe R. DA SILVA; Alan C. ANDRADE¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, ²UFV, Viçosa, MG, ³INCAPER, Vitória, ES, ⁴Cirad UMR DAP, Montpellier, França

Resumo:

Genes candidatos envolvidos na tolerância à seca no cafeeiro, foram selecionados através de uma análise *in silico* (Northern eletrônico) das bibliotecas de cDNA SH2 e SH3 presentes na Base de Dados do Genoma Café. Assim, 18 “contigs” apresentando, uma expressão diferencial nas análises *in silico*, foram identificados e caracterizados por análises de Northern-blot, utilizando-se RNA total extraído de folhas de clones de *Coffea canephora* var. Conillon, sensíveis e tolerantes à seca, caracterizados fisiologicamente em experimentos com vasos realizados em casa de vegetação. Os resultados de caracterização fisiológica indicam que o clone 22 (sensível) apresentou queda mais rápida do potencial hídrico, devido à maior condutância estomática. Além disso, sob -3,0MPa, o clone 22 apresenta menor fotossíntese que os demais, devido ao maior estresse oxidativo que ocorre nas folhas. Os resultados das análises da expressão gênica indicam que a maioria dos genes candidatos identificados pelas análises de Northern eletrônico, também apresentavam expressão diferencial nas análises por Northern-blot. Além disso, alguns desses genes candidatos, apresentavam perfil de expressão diferencial entre os quatro materiais genéticos testados (clones sensíveis vs. tolerantes à seca). Perspectivas de uso dessas informações são discutidas.

Palavras-chave: tolerância seca, estresse abiótico, transcrito, bioinformática, expressão gênica, *Coffea*

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF CANDIDATE GENES FOR DROUGHT TOLERANCE IN LEAVES FROM CLONES OF *Coffea canephora* VAR. CONILLON PHYSIOLOGICALLY CHARACTERIZED.

Abstract:

Candidate genes involved in coffee drought tolerance were selected by *in silico* analysis (Electronic Northern) of SH2 and SH3 cDNA libraries of the Coffee Genome database. Eighteen “contigs” with *in silico* differential expression were identified and characterized by Northern-blot experiments using total RNA extracted from leaves of drought tolerant and susceptible clones of *Coffea canephora* var. Conillon grown in greenhouse under controlled conditions. Physiological analyses showed that the clone 22 (drought susceptible) presented faster decrease of leaf water potential than resistant ones that was attributed to its higher stomatal conductance. Below -3.0MPa, this clone also showed lower photosynthetic activity correlated with elevated oxidative stress. For most of the candidate genes selected by “Electronic Northern” approach, differential gene expression was confirmed by conventional Northern-blot analyses. Interestingly, some of them also presented differential expression patterns between the four clones tested (drought susceptible vs. drought tolerant). Research perspectives are discussed based on these results.

Key words: Drought tolerance, abiotic stresses, transcriptome, bioinformatics, gene expression, biotechnology, *Coffea*

Introdução

Durante muitos anos, os programas de melhoramento genético do cafeeiro consistiram em identificar e utilizar a variabilidade natural existente no gênero *Coffea*, em esquemas de seleção, a fim de se criar novos híbridos adaptados às exigências dos cafeicultores (para os aspectos de produtividade) e dos consumidores (para os aspectos de qualidade da bebida). O sucesso obtido pelos programas de melhoramento é evidente e o parque cafeeiro brasileiro da espécie *C. arabica* é predominantemente ocupado por cultivares que apresentam alto potencial produtivo, alta adaptação e estabilidade, e muitas características agrônomicas desejáveis. Porém, *C. arabica* se caracteriza pela ausência de características quantificadas de tolerância aos estresses abióticos o que é atribuída à diversidade genética muito restrita da espécie. Outra possível hipótese é a de que não existe em *C. arabica*, formas alélicas de genes que conferem estas características de tolerância. Em contrapartida, estas formas alélicas devem existir na espécie *C. canephora*, reconhecidamente mais tolerante à seca. Assim, os genótipos originários do grupo Guineano e o subgrupo SG1 do Conguês (provavelmente os Conillons originalmente cultivados no Brasil) são considerados, respectivamente, como muito resistentes e razoavelmente resistentes à seca enquanto os genótipos do subgrupo SG2 de Conguês são considerados como muito sensíveis à seca (Montagnon and Leroy, 1993). Esta variabilidade genética da espécie *C. canephora* relativo à tolerância à seca, também foi constatada nas populações de *C. canephora* cv. Conillon cultivadas no Brasil (INCAPER-ES), e vários clones tolerantes à seca, já foram identificados (Ferrão et al., 1999, 2000) e alguns destes já foram caracterizados quanto aos mecanismos fisiológicos envolvidos na tolerância à seca (Lima et al., 2002; DaMatta et al., 2003; Pinheiro et al., 2004, Pinheiro et al., 2005, Praxedes et al., 2006).

No projeto Genoma Café, foram realizadas cerca de 218.000 seqüências ESTs de café a partir de várias bibliotecas de cDNA, principalmente de folhas obtidas essencialmente da espécie *C. arabica* (88.7%), mas foram também obtidas seqüências das espécies *C. canephora* e *C. racemosa* (Vieira et al., 2006). Entre as seqüências de *C. canephora* obtidas, a maior parte provém de plantas cultivadas em condições de estresse hídrico, o que possibilita a identificação dos genes envolvidos na resposta a essa condição de estresse. Desta forma, torna-se possível a identificação de genes "candidatos", responsáveis potenciais pela tolerância ao estresse hídrico, nos clones de *C. canephora*.

Uma análise prospectiva das seqüências disponíveis na Base de Dados do projeto Genoma Café já resultou na identificação de vários genes de café potencialmente envolvidos na resposta aos estresses abióticos (Vinecky et al., 2005). Mais recentemente, uma nova análise *in silico* foi realizada, comparando-se as freqüências de ocorrência de ESTs entre as bibliotecas de cDNA SH2 e SH3, pela estratégia de "Northern eletrônico", resultando na identificação de novos "genes candidatos" (GC). Assim, 18 contigs apresentando uma expressão diferencial foram identificados. Nesse trabalho são apresentados os resultados da expressão de alguns desses genes candidatos, realizadas por análises de Northern-blot contendo RNA total extraído de folhas de diferentes clones de *C. canephora* cv. Conillon (sensíveis e tolerantes) cultivados na condição de ausência e presença de estresse hídrico.

Material e Métodos

Material Vegetal

Mudas dos clones de *Coffea canephora* cv. Conillon (Ferrão et al., 2000b) tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) obtidas no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, foram plantadas e cultivadas em vasos de 12 L, em Viçosa, MG (20°45'S, altitude de 650 m). O substrato utilizado para enchimento dos vasos consistiu de uma mistura de solo, areia e esterco bovino (3:1:1, v/v/v). A adubação foi feita de acordo com a análise do solo, segundo recomendações de Ribeiro et al. (1999). As mudas foram mantidas em casa de vegetação, cujas laterais permitiam livre troca de ar entre seu interior e exterior. A densidade média de fluxo de fótons fotossintético na casa de vegetação foi de 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ao meio-dia. Após seis meses de cultivo (abril de 2006), as plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) e sob deficiência hídrica, imposta pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingissem o potencial de $\psi_w = -3,0$ MPa na antemanhã.

Avaliações Fisiológicas

O potencial hídrico da folha foi determinado em folhas individuais com uma bomba de pressão tipo Scholander, na antemanhã, em folhas completamente expandidas de ramos plagiotrópicos, do terço superior das plantas.

As trocas gasosas foram analisadas em folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto pares a partir do ápice de ramos plagiotrópicos do terço superior das plantas. As taxas de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (gs), a transpiração (E) foram medidas em sistema aberto, 07:00 e 09:00 h, sob luz saturante artificial (1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração de CO₂ ambiente e temperatura constante de 25 °C, com um analisador de gás a infravermelho portátil (LCpro+, Analytical Development Company, Hoddesdon, Reino Unido).

Extrações de RNA

As folhas desses clones quando as plantas atingiram o potencial de $\psi_w = -3,0$ MPa de antemanhã, foram colhidas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. As folhas foram pulverizadas em nitrogênio líquido e RNA total foi extraído utilizando o reagente Concert (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Para as análises de expressão, foram realizados Northern-blots com 15 μg de RNA total conforme descrito anteriormente (Geromel et al., 2006). As membranas foram hibridizadas independentemente com sondas específicas marcadas com ³²P, correspondentes aos cDNAs de contigs selecionados pelas análises de Northern eletrônico.

Resultados

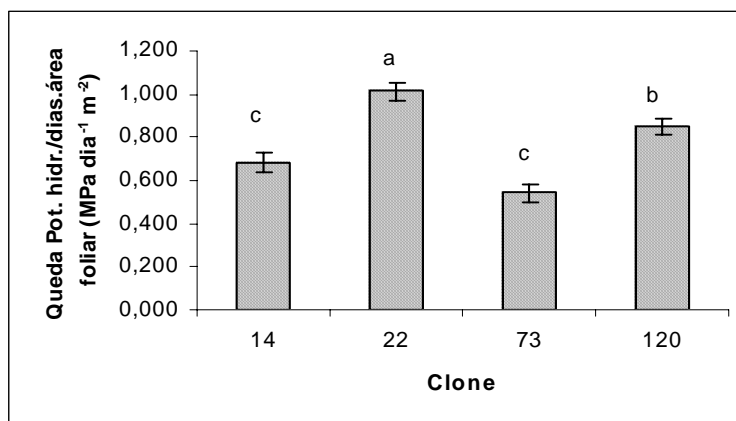


Figura 1. Queda do potencial hídrico antemanhã (ψ_{am}) em clones de *C. canephora* submetidos ao déficit hídrico até $\psi_{am} -3,0$ MPa.

Os resultados de caracterização fisiológica indicam que o clone 22 (sensível) apresentou queda mais rápida do potencial hídrico, devido a maior condutância estomática. Além disso, sob $-3,0\text{MPa}$, o clone 22 apresenta menor fotossíntese que os demais, devido ao maior estresse oxidativo que ocorre nas folhas.

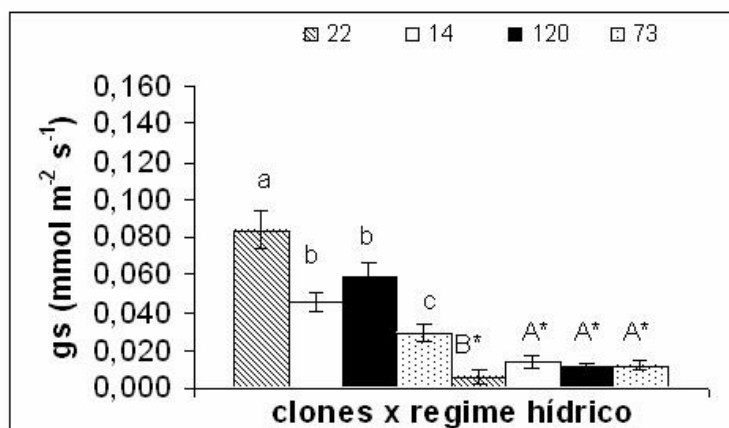


Figura 2. Condutância estomática (gs) em folhas de quatro clones de *C. canephora*, em condições irrigadas (I) e sob déficit hídrico (NI) ($\psi_{am} = -3,0\text{MPa}$). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre médias de clones irrigados, e letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de clones sob déficit hídrico (Newman-Keusl, $P \leq 0,05$). As médias de plantas estressadas marcadas com um asterisco diferem das médias das plantas-controle (Teste F, para $P \leq 0,05$). As colunas representam a média, e as barras o erro-padrão, de cinco repetições.

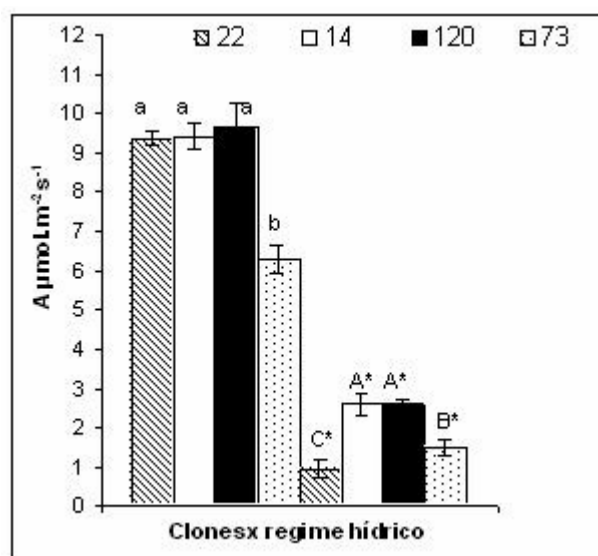


Figura 3: Taxa de assimilação líquida de CO_2 em folhas de quatro clones de *C. canephora*, em condições irrigadas (I) e sob déficit hídrico (NI) ($\psi_{am} = -3,0\text{MPa}$). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre médias de clones irrigados, e letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de clones estressados (Newman-Keusl, $P \leq 0,05$). As médias de plantas estressadas marcadas com um asterisco diferem das médias das plantas-controle (Teste F, para $P \leq 0,05$). As colunas representam a média, e as barras o erro-padrão, de cinco repetições.

Dos resultados obtidos pela estratégia de Northern-blot, apenas são mostrados alguns exemplos (Figura 4) para ilustrar os diferentes tipos de respostas obtidas. Assim, foi possível encontrar GC que são altamente expressos em condições de irrigação mas que estão reprimidos em condição de estresse hídrico independentemente dos clones analisados (Figura 4A). Inversamente, alguns GC apresentaram uma expressão maior em condição de estresse hídrico independentemente dos clones analisados (Figura 4B). Observa-se também, nos dados apresentados na figura 4B, uma resposta mais acentuada na expressão deste GC no clone 73, nas condições de estresse hídrico em comparação com os demais clones estudados, nas condições de déficit hídrico. Interessante, também foram obtidos resultados que indicam expressão gênica diferencial entre os clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de *C. canephora* cv. Conilon, onde somente observa-se a expressão deste GC no clone 22 (Figura 4C). Inversamente, os dados de expressão gênica apresentado na figura 4D, pode-se observar maior expressão nos clones tolerantes, aparentemente com sinais mais intensos nas condições de irrigação, enquanto a sinais de expressão no clone 22 (sensível a seca) sempre foi muito fraca.

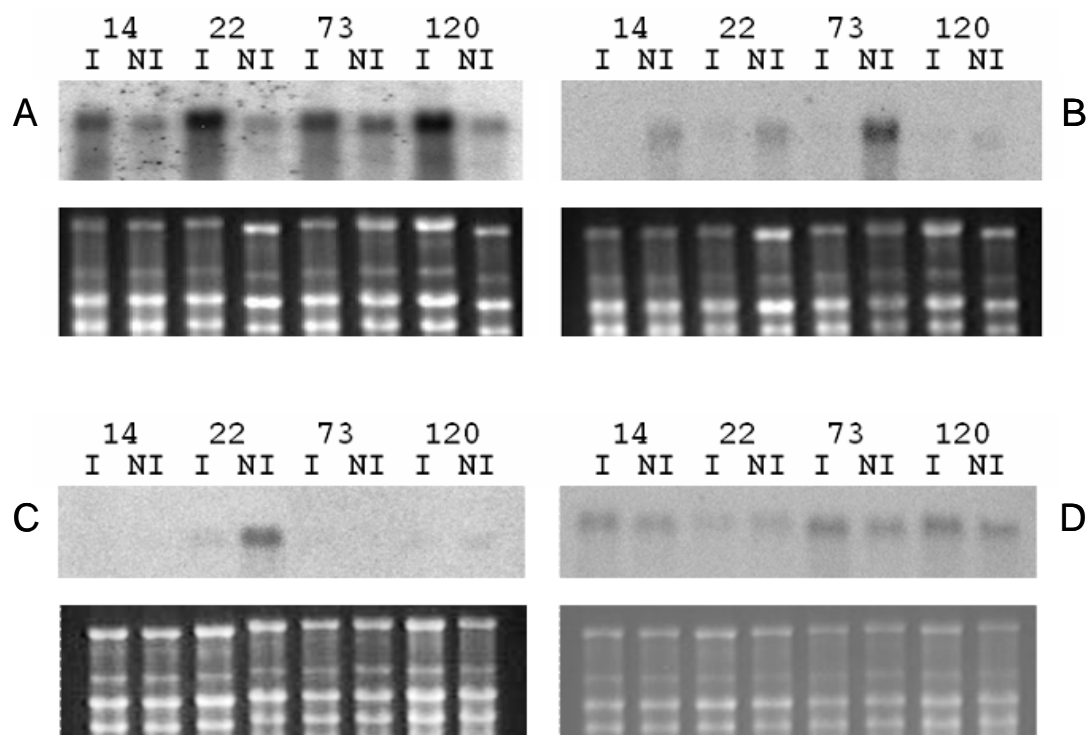


Figure 4. RNA totais de folhas de clones de *C. canephora* em condições irrigadas (I: irrigado) e déficit hídrico (NI: não irrigado) foram separados em gel de agarose e transferidos para membranas de nylon. As membranas foram hibridizadas com sondas específicas marcadas com $^{32}\text{P}\alpha\text{-dCTP}$ (parte superior) (Figuras A-D – diferentes genes candidato -GC, selecionados por Northern eletrônico). Géis com RNA totais coloridos com BET (parte inferior) indicam depósitos semelhantes de RNA nos géis.

Discussão

Os resultados apresentados nas análises de Northern-blot indicam que na maioria dos casos, a expressão diferencial dos GC selecionados *in silico* (“Northern eletrônico”), foi confirmada. Os resultados de caracterização fisiológica indicam que o clone 22 apresentou queda mais rápida do potencial hídrico, devido a maior condutância estomática. Além disso, sob $-3,0\text{MPa}$, o clone 22 apresenta menor fotossíntese que os demais, devido ao maior estresse oxidativo. Essas análises associadas aos dados de expressão gênica são fundamentais para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância à seca em *C. canephora*, permitindo a identificação de marcadores moleculares para uso em programas de melhoramento por seleção assistida. Os trabalhos em andamento no Laboratório estão atualmente focados na confirmação dos dados apresentados neste trabalho, utilizando-se a estratégia de PCR quantitativo (qPCR) e a prospecção de novos genes candidatos para a tolerância à seca através de hibridizações com macroarranjos.

Agradecimentos

Este projeto é apoiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e faz parte do Projeto de Cooperação Técnica entre a Embrapa, o Incaper e o Cirad para o estudo dos mecanismos de tolerância à seca no cafeeiro aprovado pela Agência Brasileira de Cooperação (ABC) (2007-2009). P. Marraccini recebeu o apoio financeiro de Embaixada da França no Brasil (DCSUR-BRE-4C5-008).

Os autores agradecem a colaboração dos estudantes, Werner Camargos Antunes, Rita Márcia Cardoso de Paiva, Geraldo F. Ferreira e Alexandre Tromas, na condução dos ensaios experimentais realizados neste trabalho.

Referências bibliográficas

- Cromarty, A.S.; Ellis, R.H. & Roberts, E.H. (1985). *The design of seed storage facilities for genetic conservation*. Rome, IBPGR.100p.
- DaMatta FM, Chaves ARM, Pinheiro HA, Ducatti C, Loureiro ME (2003). Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Sci* 164: 111-117.
- Ferrão RG, Silveira JSM, Fonseca AFA, Bragança SM, Ferrão MAG (1999). EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca. Comunicado Técnico. Vitória (ES) ISSN 0101-7693: 1-10.
- Ferrão RG, Fonseca AFA, Silveira JSM, Ferrão MAG, Bragança SM (2000a). EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. *Rev Ceres* 273: 555-560.
- Ferrão RG, Fonseca AFA, Ferrão MAG (2000b). Avaliação de clones elites de café Conilon em condição de estresse hídrico no estado do Espírito Santo. I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG, CD-rom: 402-404.

- Geromel C, Ferreira LP, Cavalari AA, Pereira LFP, Guerreiro SMC, Vieira LGE., Leroy T, Pot D, Mazzafera P, Marraccini P. (2006) Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. J Exp Bot 57: 3243-3258.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002). Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water stress. Env Exp Bot 47: 239-247.
- Montagnon C, Leroy T (1993). Réaction à la sécheresse de jeunes caféiers *Coffea canephora* de Côte-d'Ivoire appartenant à différents groupes génétiques. Café Cacao Thé 37: 179-189.
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME (2004). Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. Plant Science 167: 1307-1314.
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C (2005). Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. Ann Bot 96: 1001-1008.
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT (2005). Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. Environ Exp Bot 56: 263-273.
- Ribeiro, A.C. Recomendação de calagem e adubação de substratos para mudas, covas e canteiros. In: RIBEIRO, C.A., GUIMARÃES, P.T.E., ALVAREZ V., V.H. (Eds.). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. Viçosa: UFV-MG, 1999. p.263.
- Vieira L.G.E. *et al.* (2006). Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. Braz J Plant Physiol 18: 95-108.
- Vinecky F, de Brito KM, Da Silva FR, Andrade AC (2005). Análise *in silico* de genes potencialmente envolvidos na resposta aos estresses abióticos, presentes na base de dados do projeto Genoma café. IV Simpósio de Pesquisa dos Cafês do Brasil, Londrina-PR, Embrapa Café, CD-rom.