

ANÁLISE DE PROMOTORES DO GENE *CcDREB1D* DE *Coffea canephora* VIA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Nicotiana tabacum*

Sinara Oliveira de Aquino²; Fernanda de Araújo Carneiro³; Érica Cristina Silva Rêgo⁴; Karoline Estefani Duarte⁵; Gabriel Sérgio Costa Alves⁶; Alan Carvalho Andrade⁷; Pierre Marraccini⁸

¹ Trabalho financiado pelo consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

² Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, saquinobiotec@gmail.com

³ Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, fearca14@gmail.com

⁴ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, BS, Universidade Paulista, Brasília-DF, embrapa.ecsr@gmail.com

⁵ Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, karollduarte31@gmail.com

⁶ Pesquisador, PhD, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, gscalves@gmail.com

⁷ Pesquisador, PhD, Embrapa Café, Lavras-MG, alan.andrade@embrapa.br

⁸ Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Brasília-DF, marraccini@cirad.fr

RESUMO: Após sequenciamento, polimorfismos na região promotora do gene *DREB1D* (*Dehydration Responsive Element Binding Protein*) de *Coffea canephora* Conilon, indicaram a participação de três haplótipos (15, 16 e 17) no controle genético da tolerância à seca nos clones 14 (tolerante a seca) e 22 (sensível a seca), com as combinações de haplótipos 15-16 para o clone 14 e 15-17 para o clone 22. A fim de avaliar a capacidade desses fragmentos controlarem a expressão do gene repórter *uidA*, 3 construções gênicas, com os diferentes haplótipos do promotor do gene *CcDREB1D*, foram feitas no vetor binário pBI101 e testadas independentemente via transformação genética de *Nicotiana tabacum*. Testes histoquímicos em plantas transformadas de *N. tabacum* T1 indicaram uma forte atividade GUS correspondente ao controle positivo (pBI121) enquanto nenhuma atividade foi detectada para o controle negativo (WT). Os resultados mostraram que, mesmo fracos, os promotores *pDREB1D* de *C. canephora* são funcionais em tabaco (*N. tabacum*), se comportando de forma diferencial entre os haplótipos, sugerindo que os polimorfismos identificados neles são essências na regulação destas sequências.

PALAVRAS CHAVE: *Coffea*, *DREB*, promotor, polimorfismos, tolerância à seca.

ANALYSIS OF *CcDREB1D* PROMOTERS OF *Coffea canephora* THROUGH GENETIC TRANSFORMATION OF *Nicotiana tabacum*

ABSTRACT: After sequencing, nucleic polymorphisms identified in the promoter region of the *Coffea canephora* Conilon *DREB1D* (*Dehydration Responsive Element Binding Protein*) gene, showed the participation of three haplotypes (15, 16 and 17) in the genetic control of drought tolerance for the clones 14 (drought tolerant) and 22 (drought susceptible), with the combinations 15-16 for the clone 14 and 15-17 for the clone 22. In order to evaluate the capacity of these fragments to control the expression of the *uidA* reporter gene, 3 genetic constructions, including different haplotypes of the *CcDREB1D* gene promoter region, were constructed into the pBI101 binary vector and tested independently by genetic transformation of *Nicotiana tabacum*. Histochemical assays in *N. tabacum* T1 showed a high GUS activity in the tissues of the positive control (pBI121) while no GUS activity was detected for those of the negative control (WT). The results showed that, even considered as weak, the *C. canephora* *pDREB1D* promoters are able to function in tobacco (*N. tabacum*), responding differentially between haplotypes, suggesting that the polymorphisms they contained are essential for the regulation of these sequences.

KEYWORDS: *Coffea*, drought tolerance, *DREB*, promoter, polymorphisms.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, *Nicotiana tabacum* tem-se mostrado uma planta heteróloga muito eficiente para testar de maneira rápida a funcionalidade de promotores de cafeeiro (Lashermes et al., 2008). O primeiro trabalho foi com o promotor do gene *CaCSPI*, responsável por codificar a proteína de armazenamento globulina 11S em sementes de *Coffea arabica*. Ensaio de atividade enzimática GUS com o promotor e suas deleções 5', revelaram a capacidade a alta expressão e especificidade do gene *uidA* no endosperma das sementes (Marraccini et al., 1999). Recentemente, o promotor do gene *CaLTP3* (*Coffea arabica* Lipid Transfer Protein) foi isolado, fragmentado e analisado em *N. tabacum*. O fragmento todo, e uma série de deleções 5' dele, foram fusionados ao gene repórter β -glucuronidase (*uidA*) e analisados em plantas transgênicas de *N. tabacum* (Cotta et al., 2014). Os fragmentos menor (345 pb) e médio (827pb) da região promotora do gene *CaLTP3* mostraram-se tecido-específicos, dirigindo a expressão do gene *uidA* nas sementes das plantas transgênicas de *N. tabacum*.

Outros promotores de cafeeiro também foram testados em plantas transgênicas de *N. tabacum* tal como o promotor do gene *CaRBCS1* codificando a subunidade menor da ribulose 1,5-bis-fosfato carboxilase - Rubisco (Marraccini et al., 2003). O trabalho destaca *cis* elementos responsivos à luz (LRE para *light responsive element*) no promotor do gene *CaRBCS1* que se expressa especificamente nas folhas de *N. tabacum*. Dessa maneira, pode-se afirmar que todos esses trabalhos mostram *N. tabacum* como uma boa planta modelo para ensaios com promotores de cafeeiro, onde pode-se observar o funcionamento, a força e a especificidade dos promotores.

Em cafeeiro, genes responsivos à seca, integrantes de diferentes vias moleculares com funções diversas, foram identificados e descritos por análises de expressão diferencial sob condições de estresse hídrico (Marraccini et al., 2012; Vieira et al., 2013). Neste estudo foi demonstrado que o gene *CcDREB1D* (Agarwal et al., 2006) de *C. canephora* Conilon, apresenta sob déficit hídrico, uma maior expressão nas folhas dos clones 14 (tolerante a seca) que nas folhas do clone 22 (sensível a seca). Por meio da técnica de sequenciamento, polimorfismos (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms* e INDELS - inserções/deleções) na região promotora do gene *CcDREB1D*, indicaram a participação de três haplótipos (15, 16 e 17) no controle genético da tolerância à seca, nos clones 14 e 22. Ambos os clones, 14 e 22, são heterozigóticos: clone 14 possuindo os haplótipos, hp15 e hp16 e, o clone 22 os haplótipos, hp15 e hp17. Assim, ambos compartilham um mesmo haplótipo (hp15) e acredita-se que a presença desses polimorfismos identificados na região promotora do gene *CcDREB1D* podem estar correlacionados a diferença de expressão do gene *CcDREB1D* nos clones 14 e 22 (Alves, 2011).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o funcionamento dos diferentes haplótipos do promotor do gene *CcDREB1D*, isolados a partir dos clones 14 e 22 de *C. canephora*, por meio da capacidade dos mesmos controlarem a expressão do gene repórter *uidA*, mediante ensaios de estresse das plantas de *N. tabacum* T1 geneticamente transformadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *N. tabacum* T1 contendo os haplótipos 15, 16 e 17 do gene *DRE1D* de *C. canephora* foram esterilizadas em etanol 70% por 30 segundos, seguido de uma lavagem com água estéril. Posteriormente as mesmas foram transferidas para uma solução de hipoclorito 2,5% acrescido de Tween-20 0,01% por 30 minutos e lavadas em água estéril. As sementes foram semeadas individualmente em MS sólido (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose e 100 mg.L⁻¹ de canamicina. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas a 28°C por 22 dias, para serem utilizadas posteriormente nos ensaios descritos a seguir. Visando garantir maior segurança nos resultados todos os ensaios foram realizados em triplicata.

- Ensaio sem estresse

Primeiramente, ensaios histoquímicos para a detecção basal da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) foram realizados em plantas de *N. tabacum* T1 contendo os haplótipos 15, 16 e 17 do gene *CcDREB1D* de *C. canephora*, mantidas em condições normais de cultivo.

- Ensaio com estresse térmico

Dado os resultados observados pela análise de atividade basal da enzima β -glucuronidase prosseguiu-se com ensaios de estresse, a princípio, com o haplótipo 17 representado pela construção pD22hp17D.

Para verificar se era possível induzir a expressão do gene *uidA* controlado pelo haplótipo 17 do promotor *DREB1D* causou-se uma situação de estresse térmico nas plantas recém-cultivadas *in vitro* com 22 dias de idade. Estas foram incubadas a 40°C, em estufa digital de esterilização e secagem, durante 48 horas. Amostras para análise histoquímica foram coletadas em 0, 6, 12, 24,36 e 48 horas.

- Ensaio com estresse de desidratação

Dando sequência aos ensaios, as plantas recém-cultivadas *in vitro* foram retiradas do meio de cultura, lavadas com água corrente e submetidas ao estresse de desidratação em temperatura ambiente (24°C), sobre papel filtro, por um período de 12 horas. As amostras foram coletadas em 0, 6 e 12 horas, submetidas a teste histoquímico.

- Ensaio com estresse de frio

O último ensaio foi realizado com todos os haplótipos 15, 16 e 17, no entanto inicialmente com a construção pD22hp17D e posteriormente com as demais, pD14hp15D e pD14hp16D. Neste ensaio, plantas de *N. tabacum* T1 com 22 dias de idade foram incubadas a 4°C, em geladeira, durante 48 horas e as amostras foram coletadas em 0, 12, 24,36, 48 e 168 horas após submissão ao estresse, estas foram submetidas a teste histoquímico.

RESULTADOS

Analisando os ensaios histoquímicos realizados para detecção da atividade basal da enzima β -glucuronidase pode-se observar que os controles utilizados se comportaram como esperado, visto que a planta contendo a construção pBI121 apresenta-se completamente azul e a planta selvagem (WT) encontra-se sem qualquer evidência de coloração. Para a planta transformada com a construção pD14hp15D, nenhuma coloração azul foi observada. Para a construção pD14hp16D, notou-se uma leve coloração azul próxima a região meristemática e no vaso condutor de uma folha. No entanto, para a planta transformada com a construção pD22hp17D, além de ser observada uma coloração azulada, na

região meristemática, nota-se que a intensidade da coloração é mais intensa quando comparada com a apresentada na planta transformada com a construção pD14hp16D (Fig. 1).

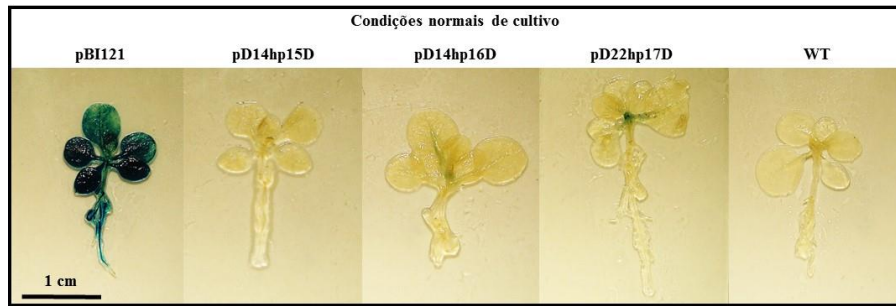


Figura 1. Ensaio histoquímico das plantas T1 de *N. tabacum*, contendo as construções pD14hp15D, pD14hp16D e pD22hp17D, visando verificar a existência de atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas plantas mantidas em condições normais (sem estresse) de cultivo. Os controles utilizados foram plantas transformadas com a construção pBI121 (controle positivo) e WT (“wild type”, controle negativo).

Partindo do princípio de que a região promotora do haplótipo 17 do promotor *CcDREB1D* de *C. canephora* estava funcionando em *N. tabacum*, ensaios buscando induzir a expressão do gene *uidA* foram realizados. No primeiro ensaio, uma planta T1 de *N. tabacum* transformada com a construção pD22hp17D foi submetida a um estresse de temperatura alta (40°C). Isso permitiu observar uma leve coloração azul na região meristemática e também na região foliar, principalmente próximo aos vasos condutores. A partir de 6h de estresse. Após 12h e 24h, essa coloração aumentou nas folhas sugerindo que houve uma maior síntese da enzima β -glucuronidase. Enquanto após 48h de estresse a síntese enzimática baixou (Fig. 2).

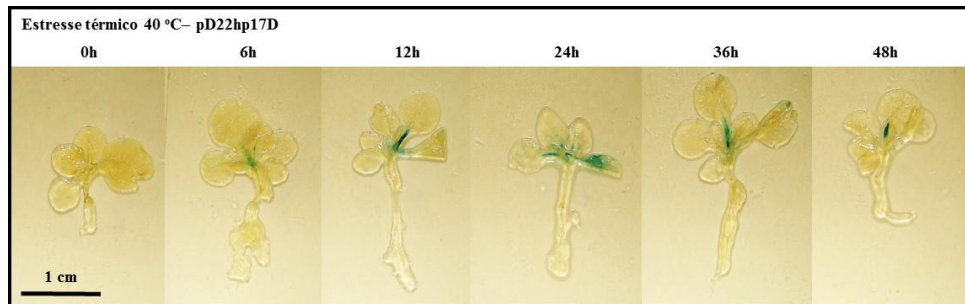


Figura 2. Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas plantas T1 de *N. tabacum* contendo a construção pD22hp17D. As plantas foram submetidas ao estresse térmico (40°C) por tempos (em horas) variáveis.

Com o objetivo de induzir a expressão do gene *uidA*, um ensaio de desidratação também foi realizado, no entanto, devido as condições de desidratação severa não foi possível prolongar o ensaio por um período maior que 12 horas. Como observado durante o ensaio de estresse térmico, houve um leve aumento da coloração azul após 6 horas de desidratação principalmente nos vasos condutores, enquanto essa coloração baixou após 12h de estresse (Fig. 3).

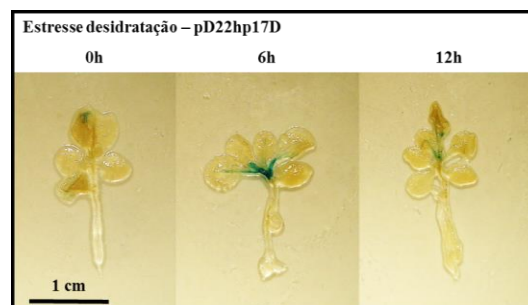


Figura 3. Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas plantas T1 de *N. tabacum* contendo a construção pD22hp17D, realizados após as mesmas serem submetidas a desidratação.

Para finalizar as avaliações com a construção pD22hp17D, um ensaio de estresse de frio (4°C) foi realizado. Neste ensaio também notou-se que houve um aumento da coloração azul principalmente nos tecidos condutores e no limbo das folhas mais intensamente com 24 horas de estresse, e baixou significativamente depois (Fig. 4). Foi também realizado um teste de “recuperação (R)” para o qual as plantas foram incubadas sem estresse durante 7 dias (168h) após o tratamento com 48h de estresse de frio. Neste caso, o aspecto das plantas R foi semelhante ao das plantas não estressadas (0h).

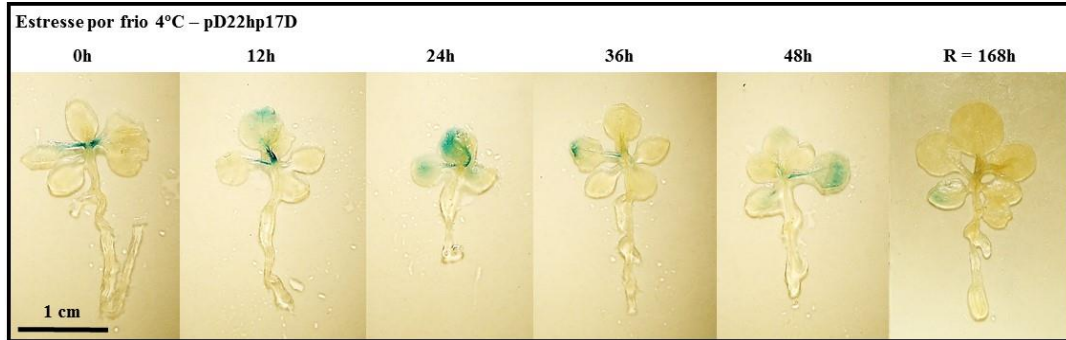


Figura 4. Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas plantas T1 de *N. tabacum* contendo a construção pD22hp17D, submetidas a estresse de frio 4°C.

O ensaio de frio (4°C) foi também conduzido simultaneamente para as outras duas construções, pD14hp15D e pD14hp16D. No caso da construção pD14hp15D observou-se um aumento da coloração azul com 48 horas de estresse (Fig. 5).

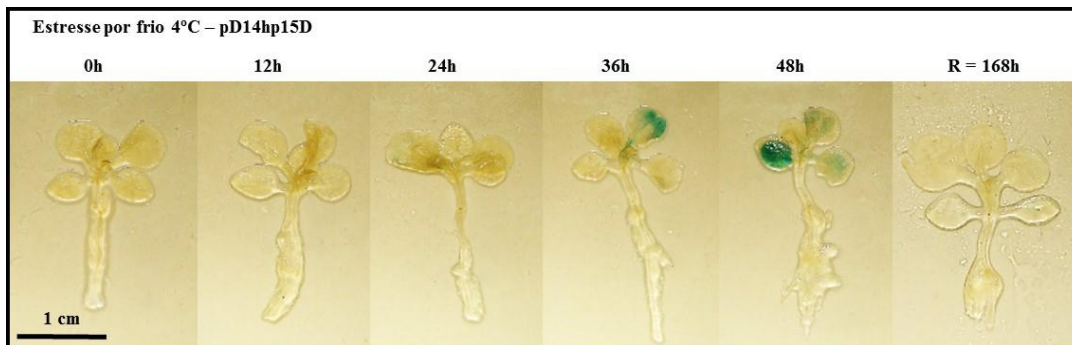


Figura 5. Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas plantas T1 de *N. tabacum* contendo a construção pD14hp15D, submetidas a estresse de frio 4°C.

Quando refere-se a construção pD14hp16D, observou-se uma leve indução com 24 horas de estresse de frio, está manteve-se visualmente constante mesmo 168 horas (R: teste de recuperação) após o estresse (Fig. 6).

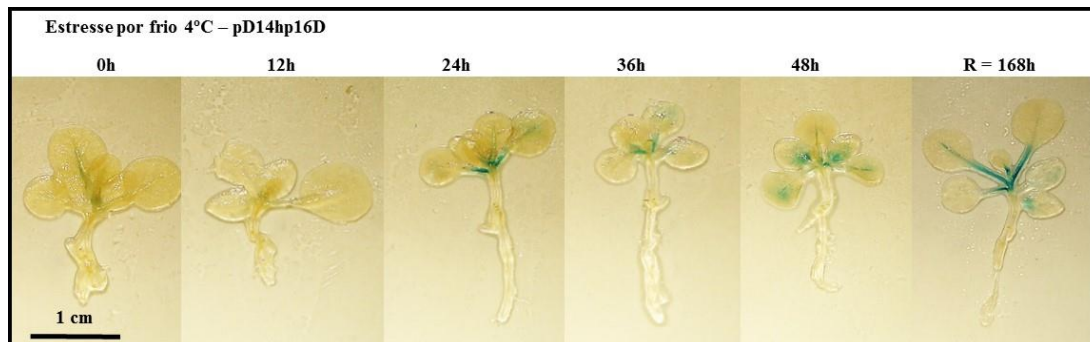


Figura 6. Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (GUS) nas plantas T1 de *N. tabacum* contendo a construção pD14hp16D, submetidas a estresse de frio 4°C.

CONCLUSÕES

- Os ensaios mostraram que foi possível induzir a expressão do gene repórter *uidA* sob o controle dos diferentes haplótipos do promotor gene *CcDRE1D* representados pelas construções pD22hp17D, pD14hp15D e pD14hp16D.
- Obteve-se resultados significativos de indução da expressão do gene *uidA* para a construção pD22hp17D nos ensaios de estresse térmico, desidratação e frio, este último apresentando aparentemente uma maior indução da expressão do gene repórter *uidA* sobre o controle dos promotores do gene *CcDRE1D*.
- Durante o estresse de frio, um aumento da expressão do gene *uidA* foi também observado para as construções pD14hp15D e pD14hp16D.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio financeiro e ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) pelo provimento do clones de *C. canephora* utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P. K. et al. Role of *DREB* transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, Dec 2006.
- ALVES, G. S. C. Identificação e análise de polimorfismos na região promotora do gene *DREB2A* em diferentes genótipos do gênero *Coffea*. 2011. 103p. Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- COTTA, M. G. et al. Lipid transfer proteins in coffee: isolation of *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, expression during coffee fruit development and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, v. 85, n. 1-2, p. 11-31, May 2014.
- LASHERMES, P.; ANDRADE, A. C.; ETIENNE, H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: Moore H, Ming R, eds. *Genomics of tropical crop plants*. Berlin: Springer, 203-226, 2008.
- MARRACCINI, P. et al. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, n. 1, p. 17-25, Jan 2003.
- MARRACCINI, P. et al. Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 4, p. 273-282, Apr 1999.
- MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, Jun 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, Jul 1962.
- VIEIRA, N. G. et al. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. *Tropical Plant Biology*, v. 6, n. 4, p. 181-190, Dec 2013.