

ENSAIO DE DÉFICIT HÍDRICO DE *Setaria viridis* TRANSFORMADA COM O GENE ÓRFÃO *CcUNK8* DE *Coffea canephora*¹

Karoline Estefani Duarte²; Natália Gomes Vieira³; Érica C. S. Rêgo⁴; Polyana Kelly Martins⁵; Ana Paula Ribeiro⁶; Bárbara A. D. B. da Cunha⁷; Hugo Bruno Correa Molinari⁸; Adilson Kenji Kobayashi⁹; Carlos Antônio de Sousa¹⁰; Pierre Marraccini¹¹; Alan Carvalho Andrade¹²

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

² Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, karollduarte31@gmail.com

³ Bolsista FAPESP, Doutoranda, UNICAMP, Campinas-SP, ngvieira1@gmail.com

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

⁵ Bolsista CAPES, Pós-doutoranda, Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, polykmartins@gmail.com

⁶ Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, anapaulabiotech@gmail.com

⁷ Analista, MSc, Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, barbara.dias@embrapa.br

⁸ Pesquisador, PhD, Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, hugo.molinari@embrapa.br

⁹ Pesquisador, PhD, Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, adilson.kobayashi@embrapa.br

¹⁰ Pesquisador, PhD, Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, carlos.antonio@embrapa.br

¹¹ Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Brasília-DF, marraccini@cirad.fr

¹² Pesquisador, PhD, Embrapa Café, Lavras-MG, alan.andrade@embrapa.br

RESUMO As plantas respondem e se adaptam as 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 pode facilitar o entendimento da relação planta-ambiente. No intuito de entender os processos que levam algumas plantas a terem uma maior tolerância à seca, ocorreram avanços na descoberta e descrição de genes envolvidos neste processo. Algumas destas sequências não possuem nenhuma similaridade com sequências depositadas nos bancos de dados públicos, e são denominadas “no hits” ou genes órfãos. O gene *CcUNK8* (UNKnown) foi previamente identificado em plantas de *Coffea canephora* Conilon como potencialmente envolvido no processo de tolerância à seca. Para estudar a função biológica deste gene, ele foi clonado no T-DNA de um vetor de transformação e sobre o controle do promotor constitutivo pUBI de milho. Essa construção foi usada para realizar a transformação genética de *Setaria viridis* via o uso de *Agrobacterium tumefaciens*. Os eventos de *Setaria viridis* transformados com pUBI:*CcUNK8* foram submetidos ao ensaio de déficit hídrico.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea canephora*, genes órfãos, estresse abiótico, expressão gênica, seca.

HYDRIC DEFICIT TEST OF *Setaria viridis* TRANSFORMED WITH THE ORPHAN GENE *CcUNK8* FROM *Coffea canephora*

ABSTRACT: Plants respond and adapt the conditions of stresses with a series of morphological, physiological and molecular changes. At the molecular level, the differential expression of genes to tolerate adverse conditions is a good indication of the response of the plant to the environment. Find the function of these genes can facilitate the understanding of plant-environment relationship. In order to understand the processes that lead some plants have increased tolerance to drought, there were advances in discovery and description of genes involved in this process. Some of these sequences have no similarity with sequences deposited in public databases, and are called "no hits" or orphan genes. The gene *CcUNK8* (UNKnown) was previously identified in plants of *Coffea canephora* Conilon as potentially involved in the process of drought tolerance. To study the biological function of this gene, he was cloned in the T-DNA of a vector and transformation over the control of constitutive promoter corn pUBI. This construct was used to perform the genetic transformation of *Setaria viridis* by of *Agrobacterium tumefaciens*. The events of *Setaria viridis* transformed with pUBI:*CcUNK8* were submitted to hydric deficit test.

KEYWORDS: abiotic stress, *Coffea canephora*, drought, gene expression orphan genes.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro é um dos mais valiosos produtos primários no comércio mundial. Devido a essa importância econômica, o cafeeiro vêm sendo alvo de programas de melhoramento genético visando a introdução de novos caracteres para obtenção de plantas com características agrônomicas superiores, por exemplo com uma maior tolerância à seca (Borém, 2011). Desta forma, a realização de uma análise exploratória e discriminatória dos genes ou fatores genéticos, associados com uma determinada característica fenotípica de interesse agrônomico é de vital importância para a

aplicação prática destas ferramentas no melhoramento genético do cafeeiro. 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 prevacente, que limita o crescimento das plantas e produtividade. Sequências denominadas genes órfãos, ou seja, que não possuem similaridade com nenhuma outra depositada nos bancos de dados (Ranz et al., 2012). Esses genes órfãos foram detectados em diversas espécies, como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (Horan, 2008, GUO; 2007). O aparecimento destes genes pode estar relacionado a respostas adaptativas específicas para cada espécie de condições adversas durante o processo evolutivo. As análises de expressão de genes utilizando *Coffea canephora* Conilon identificaram genes candidatos para tolerância à seca. Os estudos foram realizados em folhas dos clones 14, 73 e 120 (tolerantes à seca) e do clone 22 (sensível à seca) cultivados em diferentes regimes hídricos (irrigado vs. não-irrigado) (Marraccini et al., 2012, Vieira et al., 2013). 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. Este *no hit* pode ser um gene que desempenha papel crucial em determinados processos biológicos do cafeeiro, visto que a caracterização deste gene desconhecido é o foco deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O vetor utilizado foi pUBI:*CcUNK8* contendo na região do T-DNA o gene de seleção *hpt II* conferindo resistência a higromicina e o cDNA inteiro *CcUNK8* sob o controle do promotor constitutivo de ubiquitina de milho (pUBI). A transformação genética de *Setaria viridis* ocorreu via *Agrobacterium tumefaciens* de acordo com o protocolo de Brutnell (2010). Para a expressão gênica, folhas foram armazenadas em N₂ líquido. O RNA total foi extraído e tratado. A qPCR foi conduzida utilizando SYBR green fluorochrom (SYBRGreen qPCR Mix-UDG/ROX, Invitrogen), utilizando o equipamento FAST7500 (Applied Biosystems). A expressão das amostras de *CcUNK8* foram estandardizadas utilizando a expressão do gene *SiUBI* (expressão constitutiva) codificando para ubiquitina. Os dados foram analisados utilizando o programa SDS 2.0.1 (Applied Biosystems). A normalização foi realizada utilizando-se a equação ($C_T [CcUNK8] - C_T [SiUBI]$), a quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta C_T}$. Os resultados foram normalizados usando C_{Ts} (Ciclo *Threshold*) obtidos para controles endógenos presentes na mesma reação.

Pares de primers utilizados:

- *CcUNK8*
CcUNK8-F 5'-GGCTGAAGCCAAATCTGCTA-3'
CcUNK8-R 5'-TCACATTTCCACGTGAATCC-3'
- *SiUBI*
UBI-F 5'-CCGGCGAAACCTACCAGTT-3'
UBI-R 5'-GAGCCTCCATGGGATAATGC-3'

Para a amostragem experimental foram utilizados 10 indivíduos para cada evento de transformação (54, 56, 60 e 62) e não transformado (WT). As plantas utilizadas possuíam 32 dias de idade e foram cultivadas em casa de vegetação com condições controladas (T 24°C, RH 54 %), a amostragem foi dividida em blocos contendo 5 plantas em cada e submetidos ao tratamento não irrigado (NI) e irrigado (I) de déficit hídrico, com a suspensão de água durante 7 dias. No período em que as plantas estavam sob o tratamento de suspensão de água o índice de concentração de clorofila (ICC) foi mensurado diariamente utilizando CCM-PLUS (Opti-Sciences), no intuito de co-relacionar o déficit hídrico ocorrido com a manutenção dos níveis de clorofila presentes na planta, já que a alteração dos níveis de clorofila são uma consequência da disponibilidade de água no substrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

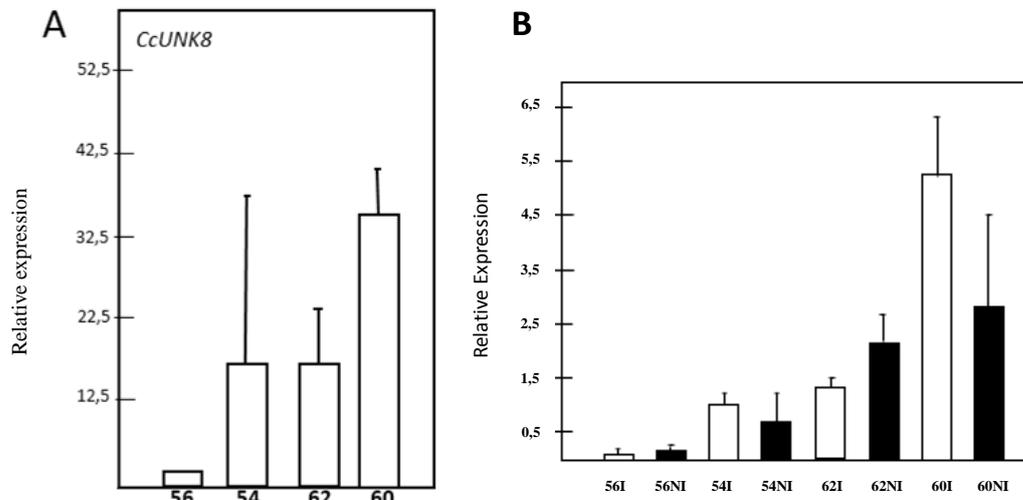


Figura 1. Expressão do cDNA *CcUNK8* analisado por RT-qPCR em folhas de *S. viridis* transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*. (A) Plantas T₀ dos eventos de transformados (54, 56, 60 e 62) sob regime de irrigação. (B) plantas T₂ dos eventos transformados (54, 56, 60 e 62), na condição de irrigação (I) e não irrigação (NI). Os transcritos foram estandardizados utilizando a expressão do gene de referência *SiUBI*. Os valores de expressão relativa (expressos em unidades arbitrárias) foram realizados em três repetições técnicas. Os resultados foram expressos utilizando em (A) o evento 56 e (B) o evento nº 54I como calibrador interno (expressão relativa =1).

Os níveis de expressão relativa obtidos nas plantas T₀ (Figura 1A) são maiores quando comparados com os níveis de expressão relativa obtidos nas plantas T₂ (Figura 1B) irrigadas e não irrigadas. A análise dos níveis de expressão relativa das plantas T₂ demonstram que apesar dos diferentes tratamentos, nos eventos 56 e 54 em ambas as condições não se observou uma diferença significativa entre a condição irrigada e não irrigada. Enquanto nos eventos 62 e 60 ocorrem níveis de expressão relativa significativamente diferentes entre as plantas irrigadas e não irrigadas. No evento 62, a expressão é maior na condição não irrigada e no evento 60 na condição irrigada. No entanto como o cDNA de *CcUNK8* encontra-se sob a regulação de um promotor constitutivo (*ZmUBI*), não espera-se que o tratamento hídrico aplicado altere os níveis de expressão entre plantas de um mesmo evento. A comparação dos níveis de expressão do cDNA *CcUNK8* nas folhas das plantas T₀ e T₂ sempre mostrou níveis de expressão na ordem dos eventos 60 (alta expressão) > 62 ± 54 > 56 (baixa expressão).

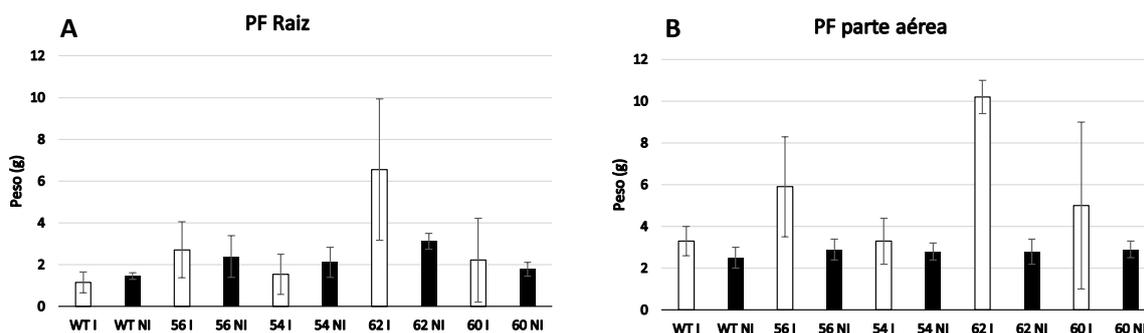


Figura 2. Média dos pesos frescos (PF em gr.) de raiz (A) e parte aérea (B) de plantas de *S. viridis* T₂ não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*. Os números dos eventos são indicados abaixo de cada isobarra. As análises foram feitas com plantas de 39 dias de idade que depois foram irrigadas (I: isobarras brancas) e não-irrigadas (NI: isobarras pretas) durante 7 dias adicionais.

O acúmulo de biomassa fresca nas raízes (Figura 2A) e parte aérea (Figura 2B) das plantas irrigadas T₂ 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 nº 54, enquanto os demais genótipos apresentaram uma leve redução dessa biomassa, a qual foi mais acentuada para o evento nº 62. Na parte aérea, houve redução da biomassa acumulada em todos os eventos NI (sem irrigação). 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 que apresentou os maiores pesos frescos de raiz (x6 comparado ao WT) e da parte aérea (x3 comparado ao WT) na condição irrigada.

O índice de concentração de clorofila (ICC) nos permite de relacionar 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. O ICC foi determinado nas folhas das plantas dos diferentes genótipos de *S. viridis*, durante sete dias a partir da suspensão da irrigação, comparando-se plantas irrigadas (I) e não-irrigadas (NI) (Figura 3). 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).

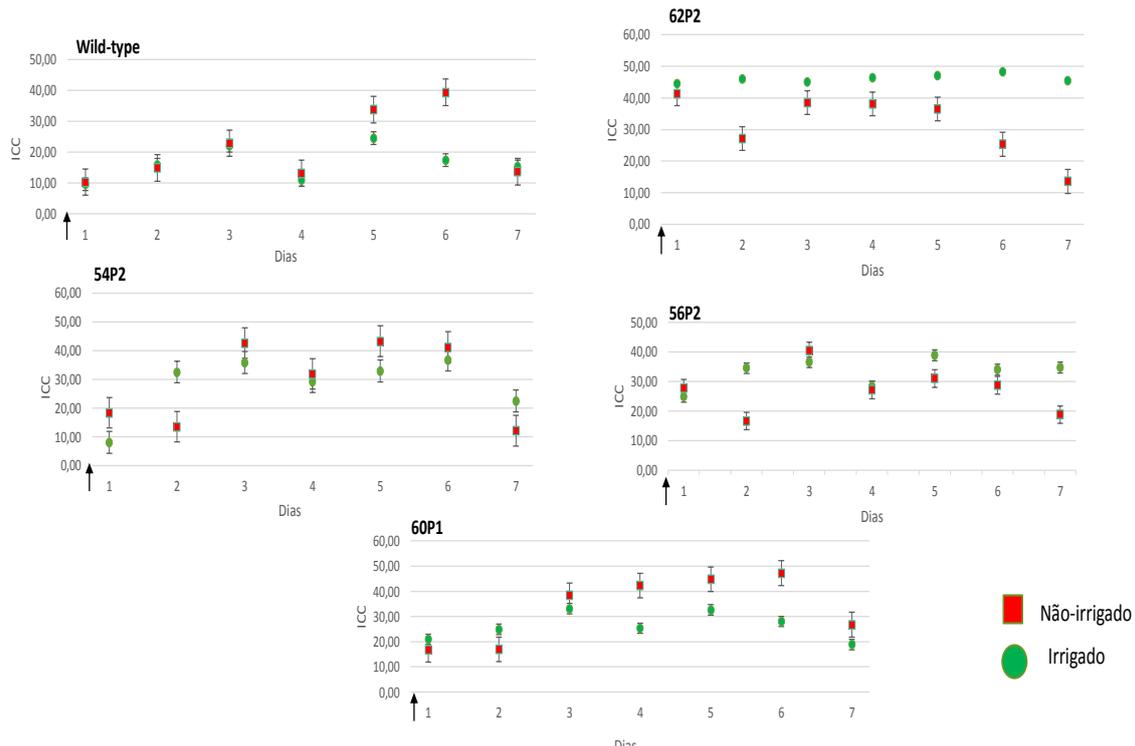


Figura 3. Índice de concentração de clorofila (ICC) em folhas das plantas T₂ de *S. viridis* não transformadas (WT) e transformadas com o vetor pUBI:*CcUNK8*. Grupos de plantas de cada evento foram submetidos à irrigação (símbolo verde) ou à suspensão da irrigação (símbolo vermelho) a partir de 32 dias após a germinação. A seta indica o último dia em que as plantas foram irrigadas.

As mudanças nos valores de ICC, bem como na taxa de crescimento nas plantas dos diferentes eventos T₂ 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. Os eventos T₂ nº 62, 56 e 54 de *S. viridis* são os quais apresentaram maior taxa de crescimento e, conseqüentemente, 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 nº 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. Conseqüentemente, essas plantas apresentaram menor redução na taxa de crescimento devido à seca em relação aos demais genótipos. O ICC dessas plantas NI apresentou um aumento inicial provavelmente devido à 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 5º e o 6º dia nas plantas não irrigadas.

CONCLUSÕES

É possível observar níveis de expressão relativa diferenciados entre os eventos transformados T₀ que podem ser explicados pelo efeito de posição do T-DNA inserido nas plantas transgênicas de *S. viridis* (Peach & Velten, 1991). Observa-se uma redução dos níveis de expressão de T₂ quando comparados as plantas T₀. No entanto ocorre uma queda de expressão do cDNA de *CcUNK8* com o estresse hídrico nas folhas do evento 60 o que não se é esperado já que a expressão desse gene é sobre a dependência do promotor constitutivo pUBI. Mesmo assim, o nível de expressão do cDNA de *CcUNK8* sempre foi maior nas folhas (T₀ e T₂) do evento 60 comparado aos outros eventos. Demonstrou-se que o índice de concentração de clorofila (ICC) possui níveis diferentes nas plantas de *S. viridis* transformadas com pUBI:*CcUNK8* e submetidas ou não a irrigação. O acúmulo de biomassa fresca não é diretamente proporcional aos níveis de expressão relativa apresentados. Todavia, 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. A queda do ICC no último dia de seca mostra uma menor concentração de clorofila nas folhas para a maioria dos eventos, possivelmente devido à ausência de água. 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. Faz-se necessário uma repetição deste experimento em sob maior rigor nas condições experimentais para que nenhuma variável possa interferir no resultado obtido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, P. K. *et al.* Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* 25:1263-1274, (2006).
- BORÉM, A.; ALMEIDA, G. D. Plantas Geneticamente modificadas: Desafios e oportunidades para Regiões Tropicais, 1ª ed, Editora UFV, Viçosa, (2011).
- BRUTNELL, T.P.; WANG, L.; SWARWOOD, K.; GOLDSCHMIDT, A.; JACKSON, D.; ZHU, X.G.; KELLOGG, E.; *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. *The Plant Cell* 22:2537-2544, (2010).
- GUO, W. J. *et al.* Significant comparative characteristics between orphan and nonorphan genes in the rice (*Oryza sativa* L.) genome. *Comparative and Functional Genomics* 1-7, (2007).
- HORAN, K., *et al.* Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. *Plant Physiology*, 147:1:47-51, (2008).
- MARRACCINI, P. *et al.* Differentially expressed genes and proteins upon drought stress in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *Journal of Experimental Botany* 63:4191-4212, (2012).
- PEACH, C., VELTEN, T. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Molecular Biology* 17:49-60. (1991)
- RANZ, J. M. *et al.* Newly evolved genes: Moving from comparative genomics to functional studies in model systems. *BioEssays*, 34:477-483, (2012).
- VIEIRA, N. G. *et al.* Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. *Tropical Plant Biology* 6:181-190, (2013).