

ESTRESSE HÍDRICO ALTERA O PERFIL DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DA SUBUNIDADE MENOR (RBCS) DA RUBISCO EM FOLHAS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora*¹

Gabriel Sergio Costa Alves², Humberto Ramos³, Gustavo Costa Rodrigues⁴, Luiz Gonzaga Esteves Vieira³, Pierre Marraccini⁵, Alan Carvalho Andrade⁶

¹ Trabalho financiado pela FINEP e Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D-Café

² Bolsista CNPq, LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF

³ Pesquisador, IAPAR, Londrina-PR

⁴ Pesquisador, Embrapa Cerrados, Planaltina-DF

⁵ Pesquisador, Cirad UMR DAP Montpellier-França / LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF

⁶ Pesquisador, LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF, alan@cenargen.embrapa.br

RESUMO: A ampliação do conhecimento sobre os determinantes moleculares e genéticos da tolerância à seca no cafeeiro, com vistas a possibilitar a identificação de marcadores ligados à tolerância ao estresse hídrico é uma etapa essencial para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético do cafeeiro, por seleção assistida. Aqui apresentamos resultados preliminares sobre os efeitos do estresse hídrico na expressão do gene *RBCS* codificando para a pequena subunidade (RBCS) da enzima Ribulose Di-fosfato Carboxilase (RUBISCO). Uma análise dos dados do projeto Genoma Café, possibilitou a identificação de diferentes contigs codificando para essa enzima. Primers específicos para esses contigs foram desenhados e os resultados das reações de qPCR realizadas, mostraram que a expressão do gene correspondente é altamente reduzida em folhas de *C. canephora* e *C. arabica* submetidas ao estresse hídrico. Por outro lado, uma comparação dos perfis protéicos (2DE) demonstraram que a expressão total da RBCS aumenta em resposta ao estresse hídrico e que novas isoformas dessa enzima foram observadas especificamente, em condições de déficit hídrico. Esses resultados indicam que o estresse hídrico afeta a expressão de genes importantes para a atividade fotossintética em plantas de café e que a expressão de formas alélicas diferentes/ou modificações pós-traducionais da RBCS, podem representar uma resposta adaptativa do cafeeiro à restrição hídrica.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, estresse hídrico, expressão gênica, RUBISCO

DROUGHT STRESS AFFECTS THE EXPRESSION OF THE RUBISCO SMALL SUBUNIT (RBCS) ISOFORMS IN LEAVES OF *Coffea arabica* AND *Coffea canephora*

ABSTRACT: The first step, for the establishment of a breeding program based on marker-assisted selection for drought tolerance on coffee, is the identification of molecular markers associated with this trait. This work reports on preliminary results of the effect of drought stress on the expression of the small subunit (RBCS) of the enzyme Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase (RUBISCO). Different contigs encoding for this enzyme could be identified by analyzing the Coffee Genome Database. Specific primers designed based on these contig sequences were used for qPCR experiments and the results indicated that *RBCS* gene expression in leaves of *C. canephora* and *C. arabica* is down regulated by drought stress. On the other hand, proteomic analyses by 2DE have shown that the total expression of RBCS increases upon drought stress and new isoforms of this enzyme could specifically be observed under these conditions. These results indicate that a drought stress affects gene expression of important components of the photosynthetic apparatus of coffee plants and the appearance of new isoforms and/or post-transduction modifications of RBCS might represent an adaptive response of coffee plants to water limitation.

Key words: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, gene expression, RUBISCO, drought stress

INTRODUÇÃO:

É conhecido que os períodos da seca afetam o desenvolvimento do cafeeiro e a produtividade (DaMatta & Ramalho, 2006). Em caso de seca severa, pode ocorrer danos à florada, ao desenvolvimento dos grãos, podendo até provocar o aborto dos frutos e a morte das plantas. Em consequência da elevação das temperaturas devido ao aquecimento global, poderão ocorrer mudanças nas regiões de cultivo do cafeeiro (Assad et al., 2004), o que poderá acarretar grandes problemas ambientais e sócio-econômicos. Neste contexto, o desenvolvimento de novas variedades de café tolerantes à seca tornou-se uma das prioridades nas pesquisas com café. O desenvolvimento de ferramentas moleculares geradas pelos avanços recentes na genômica (Lashermes et al., 2008) propicia agora, a possibilidade de se estudar o determinismo genético da tolerância à seca e a identificação dos genes controlando essa característica.

Para se identificar os genes envolvidos na tolerância à seca do cafeeiro, diferentes estratégias foram seguidas no laboratório, tais como a identificação de genes candidatos (GC) via análises *in silico* dos dados do projeto Genoma café (Vinecky et al., 2005), a utilização de membranas de macroarranjos (Marraccini et al., 2008) e por meio da análise comparativa dos perfis protéicos por meio de experimentos em géis de eletroforese bi-dimENSIONAL (2DE) (Ramos et al.,

2007). Neste trabalho, apresentamos um estudo detalhado do gene *RBCS* codificando a pequena subunidade da enzima RUBISCO. Os efeitos do estresse hídrico na expressão desse gene foram analisados em folhas de clones de *Coffea canephora* var. conilon, tolerantes e sensíveis a seca, e também nos cultivares de *C. arabica*, Rubi e Iapar59.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal:

Os clones tolerante (14) e sensível (22) à seca da variedade Conillon de *C. canephora* foram selecionados pelo INCAPER (Ferrão et al., 2000) e cultivados em casa de vegetação, com irrigação (I) ou sem irrigação (NI = condição de estresse hídrico nas folhas com $\Psi_{pd} = -3.0$ MPa). Os cultivares Rubi e Iapar59, cultivados em condições de campo (Embrapa Cerrados, Planaltina-DF) com irrigação (I: $\Psi_{pd} = -0.5$ MPa) ou sem irrigação (NI: $\Psi_{H_2O} \approx -1.7$ MPa) no sistema de pivô central. Em todos os casos, o potencial de base (Ψ_{pd} : “pre-dawn water potential”) foi medido usando uma bomba de Scholander. Para todas as plantas, as folhas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas na temperatura de -80°C até a extração dos RNA totais.

Northern-blot experiment:

RNA total foi extraído e testado pela técnica de “Northern-blot” como descrito anteriormente (Geromel et al., 2006) usando como sonda, o cDNA do gene *rbcs* (GenBank AJ419826), marcado aleatoriamente (“random-priming”) com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

PCR quantitativo em tempo real (qPCR):

As amostras de RNA total extraído de folhas foram submetidos a um tratamento enzimático com DNaseI-RNase “free”, e 1 μg de cada amostra foi utilizado para a transcrição reversa, com a enzima ImPromII (Promega), conforme recomendações do fabricante. O cDNA fita-simples sintetizado, foi diluído (1/50) e testado por qPCR usando pares de primers específicos do gene *rbcs*. Esses primers foram desenhados usando as seqüências consenso de contigs disponíveis, na Base de Dados do Genoma Café (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>). As reações de qPCR foram realizadas com 1 μl de cDNA fita-simples em um volume final de 10 μl . Foi utilizado o fluoróforo SYBR-green (SYBRGreen qPCR Mix-UDG/ROX, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e as reações foram analisadas no aparelho ABI 7500-FAST (Applied Biosystems). Para cada amostra, os níveis da expressão foram normalizados com a expressão do gene *UBQ10* (www.sgn.cornell.edu SGN-U347154), o qual codifica para a ubiquitina. Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa SDS 1.3.1 (Applied Biosystems). Os níveis da expressão gênica foram apresentados na forma de quantificação relativa.

Análise proteômica:

A análise do perfil protéico foi realizada pela técnica de eletroforese bi-dimensional (2DE). As proteínas foram extraídas de folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora* pelo método modificado de fenol/SDS (Ramos et al., 2007) seguido pela eletroforese bi-dimensional. A primeira dimensão (focagem isoelétrica) foi realizada usando IPG Strips de 13cm (pH 3-10 ou pH 4-7) reidratados (20°C durante 12h) com 500-1000 μg de proteínas e analisados no sistema IPGphor (GE Healthcare). A segunda dimensão foi feita com géis SDS-PAGE (11%) usando o sistema Hoefer SE 600 Ruby system (GE Healthcare) sob 15mA/gel - 45mn e 30mA/gel -180mn numa temperatura de 12°C . Os géis foram corados com Coomassie G-250 e R-350, digitalizados usando um scanner ImageScanner e analisados com o software ImageMaster 2D Platinum 6.0. As proteínas foram removidas manualmente dos géis, submetidas ao tratamento enzimático com tripsina e analisadas por espectrometria de massas, usando um espectrômetro Maldi-Tof/Tof (Autoflex, Bruker).

Identificação da proteína pelo MS:

As proteínas foram identificadas por PMF (“Peptide Mass Fingerprinting”) usando PiumsGUI2.2 e MS/MS Ion Search usando o software X!Tandem para a busca de proteínas similares nos bancos de dados do HarvEST e do Genoma Café (Vieira et al., 2006). Os pacotes Trans-Proteomic Pipeline (TPP) e Scaffold foram usados para analisar, validar, e armazenar os dados das proteínas identificadas. Os resultados da identificação foram verificados pela inspeção visual e por seqüenciamento *de novo*, usando o software PepSeq.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação *in silico* dos genes candidatos (CG):

As bibliotecas de cDNA de folhas do projeto Genoma (SH2 = *C. arabica* cv. Rubi MG 1189 [cultivar considerado como sensível à seca] e SH3 = *C. canephora* var. Conillon clone 14 [tolerante à seca] ambas submetidas à estresse hídrico) foram analisadas usando a ferramenta do teste estatístico de Fisher, disponível na Base de Dados do Genoma Café (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>) para a seleção de ESTs diferencialmente expressos. Entre os ESTs selecionados, foi identificado o contig #13239, formado a partir da clusterização de 73 ESTs dos quais, 64, somente ocorriam na biblioteca de cDNA SH3 (clone 14 de *C. canephora*). Análise de TBlastX, revelou que esse contig codifica para uma proteína que apresenta alta similaridade (E-value $1e^{-83}$) com a proteína RBCS (GenBank CAD11991)

Nas reações de qPCR foram utilizados os pares de primers B18244F/R localizados na seqüência 3' UTR do gene *RBCS*. Em ambas análises, foi observada uma alta expressão do gene *RBCS* nas folhas das plantas irrigadas e uma queda dessa expressão nas folhas de plantas não-irrigadas.

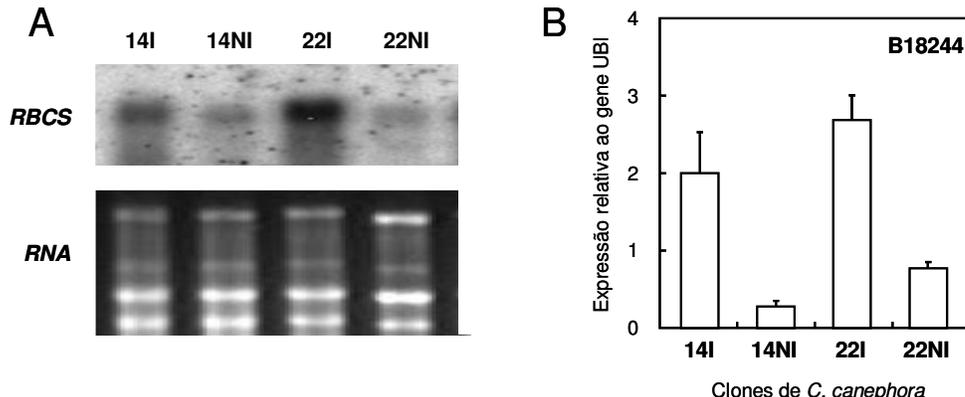


Figura 3: Expressão do gene *RBCS* testada pela técnica de “Northern-blot” (A) e de qPCR (B). Os clones 14 e 22 de *C. canephora* e as condições de irrigação (I = plantas irrigadas; NI = plantas não irrigadas) são indicadas. As amostras de RNA total depositados no gel de eletroforese são mostrados, confirmando o depósito de quantidades equivalentes de RNA total (A- painel inferior). Os resultados de qPCR foram obtidos utilizando-se o par de primer B18244 e os resultados são apresentados em expressão relativa, normalizados à expressão do gene endógeno *UBI10*.

A expressão do gene *RBCS* foi também testada por qPCR, utilizando-se RNA total extraído de folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora* var. Conillon com os pares de primers C18244F/R (específico do contig #13239) e D18244F/R (específico do contig #10569). Esses primers foram desenhados nas regiões nucleicas divergentes das seqüências 3'UTR dos contigs (Figura 4). Os mesmos pares de primers, foram também utilizados para testar a expressão do *RBCS*, nas amostras de RNA total extraído de folhas dos cultivares Rubi e Iapar59 de *C. arabica*. Em *C. canephora*, e com ambos pares de primers testados, os resultados de qPCR mostraram uma queda importante da expressão do gene *RBCS* sob o estresse hídrico. Em termos de nível de expressão, e, considerando os pares de primers C18244F/R e D18244F/R como específicos aos diferentes genes *RBCS*, parece que a expressão do contig #10569 foi maior que aquela do contig #13239, nas folhas de *C. canephora*. Vale ressaltar, que quando os mesmos pares de primers foram testados nos cultivares Rubi e Iapar59 de *C. arabica*, não foi possível detectar a expressão do gene *RBCS* nas folhas do cultivar Rubi quando foi utilizado o par de primers C18244F/R. Entretanto, este mesmo par de primers foi eficiente em detectar a expressão do gene *RBCS* nas amostras de folhas do cultivar Iapar59. Por outro lado, foi possível observar a expressão do gene *RBCS* com o par de primers D18244F/R nos dois cultivares de *C. arabica* (resultado não apresentado). Como o Rubi corresponde a um cultivar 100% “arabica” e o Iapar59 é oriundo de um cruzamento que tem o Híbrido de Timor HT832.2 como um dos progenitores (Lashermes et al., 2000), podemos propor que o par de primers C18244F/R amplifica uma forma alélica do gene *RBCS*, específica de *C. canephora*.

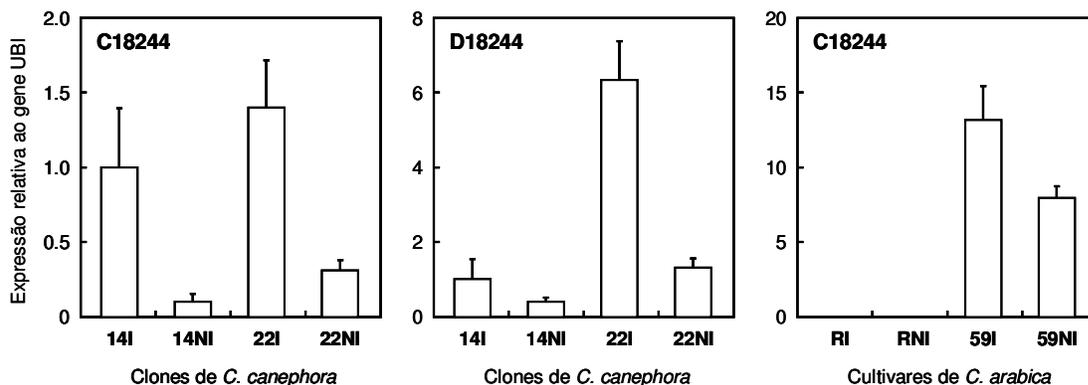


Figura 4: Expressão do gene *RBCS* testada com qPCR em folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora* e dos cultivares Rubi (R) e Iapar59 (59) de *C. arabica* em condições de irrigação (I = plantas irrigadas; NI = plantas não irrigadas). As reações de qPCR foram realizadas usando os pares de primers C18244 e D18244 como indicado nos gráficos. Os resultados são apresentados em expressão relativa, normalizados à expressão do gene endógeno *UBI10*.

Análise proteômica:

As análises de extratos protéicos de folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora* sob condições de estresse hídrico demonstraram uma alteração no padrão de expressão da proteína RBCS pelo estresse hídrico (Figura 5). Pode-se observar um aumento significativo do acúmulo de RBCS, bem como o aparecimento de “spots” adicionais desta proteína em condições de estresse hídrico (Figura 5.1B e 5.1D). As análises destas proteínas por MS1 e MS2 indicaram que elas podem corresponder a 4 isoformas da proteína RBCS, similares a proteína deduzida do contig #13239. Alternativamente, modificações pós-traducionais podem explicar as diferenças de pI. Peptídeos das proteínas isoladas do gel foram seqüenciados por MS2 (Figura 5.2) e o ponto isoeletrico calculado correspondeu ao observado no gel (Figura 5.1B e 5.3).

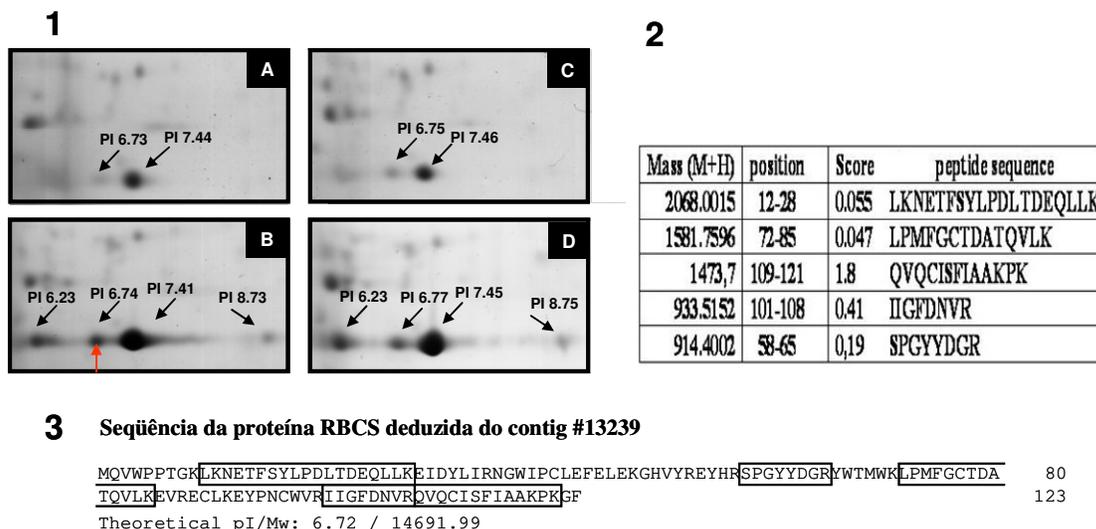


Figura 5: Expressão diferencial das isoformas da subunidade RBCS da RUBISCO analisadas por eletroforese bi-dimensional (2DE) e por espectrometria de massas (MS). Em (1) as setas indicam os pontos isoeletricos (PI) observados para cada uma das isoformas da RBCS identificadas por MS (1A = clone 14I; 1B = clone 14NI; 1C = clone 22I e 1D = clone 22NI). A seta vermelha indica a isoforma de pI 6.74 que foi seqüenciada. Os peptídeos obtidos após o seqüenciamento são apresentados (2). A seqüência da proteína RBCS deduzida do contig #13239 é apresentada (3) assim como o cálculo do pI teórico e a massa molecular (MW). Os peptídeos correspondentes e que foram seqüenciados estão indicados..

CONCLUSÕES

Os dados de expressão protéica obtidos com a análise dos géis 2DE, juntamente com os dados de qPCR, confirmam que ocorrem alterações nos perfis de expressão gênica e protéica da RBCS da RUBISCO em função do estresse hídrico, no cafeeiro. Esses resultados corroboram com as observações de Lima et al. (2002) e Praxedes et al. (2005) que mostraram uma queda importante na taxa de assimilação do carbono nas folhas de *C. canephora* sob estresse hídrico, tanto nos clones tolerantes, como nos clones sensíveis. A provável presença de diferentes isoformas dessa proteína, somente observadas nas folhas de *C. canephora*, em condições de déficit hídrico, pode justificar a diminuição dos níveis de mRNA observado nas análises por qPCR. Nestas condições, é possível que algumas formas alélicas do gene *RBCS* possam ser reprimidas, enquanto outras podem estar sendo induzidas para que as plantas possam adaptar o aparelho fotossintético. Também, não fica excluída a possibilidade de que modificações pós-traducionais das proteínas RBCS sejam responsáveis pelas diferenças de pI, observadas nas análises de 2DE. Os dados apresentados neste trabalho, tanto em nível nucléico, quanto proteômico, não permitem excluir a existência de outras isoformas de RBCS e também não permitiram, a caracterização das mudanças pós-traducionais que podem ocorrer nas formas alélicas identificadas, em função do estresse hídrico no cafeeiro. Desta forma, estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão das respostas adaptativas do cafeeiro ao estresse hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSAD, E.D.; PINTO, H.S.; ZULLO, J.R.J.; ÁVILA, A.M.H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.** 39:1057-1064, 2004.
- DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.C. Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Braz. J. Plant Physiol.** 18:55-81, 2006.

- FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; SILVEIRA, J.S.M.; FERRÃO, M.A.G.; BRAGANÇA, S.M. EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. **Rev. Ceres** 273: 555-560, 2000.
- FISHER, R.A. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. **J. Royal Stat. Soc.** 85:87-94, 1922.
- GEROMEL C, FERREIRA LP, CAVALARI AA, PEREIRA LFP, GUERREIRO SMC, VIEIRA LGE., LEROY T, POT D, MAZZAFERA P, MARRACCINI P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **J. Exp. Bot.** 57: 3243-3258, 2006.
- LASHERMES, P.; · ANDRZEJEWSKI, S.; · BERTRAND, B.; COMBES, M.C.; · DUSSERT, S.; · GRAZIOSI, G.; · TROUSLOT, P.; ANTHONY, F. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theor. Appl. Genet.** 100: 139-146, 2000.
- LASHERMES, P.; ANDRADE, A.C.; ETIENNE, H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: Genomics of Tropical Crop Plants. H Moore & R Ming eds. Springer, pp. 203-226, 2008.
- LIMA, A.L.S.; DAMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.A.; TOTOLA, M.R.; LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water stress. **Environ. Exp. Bot.** 47: 239-247, 2002.
- MANZARA, T.; GRUISSEM, W. Organization and expression of the genes encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in higher plants. **Photosynthesis Res.** 16: 117-139, 1988.
- MARRACCINI, P.; RAMOS, H.; VIEIRA, L.G.E.; FERRÃO, M.A.G.; DA SILVA, F.R.; TAQUITA, J.A.; BLOCH JR., C.; ANDRADE, A.C. Study of drought tolerance mechanisms in coffee plants by an integrated analysis. **22th International Conference on Coffee Science**, Campinas-Brasil, B212, 2008.
- MARRACCINI, P.; COURJAULT, C.; CAILLET, V.; LAUSANNE, F.; LEPAGE, B.; ROGERS, W.J.; DESHAYES, A. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiol. Biochem.** 41: 17-25, 2003.
- PRAXEDES, S.C.; DAMATTA, F.M.; LOUREIRO, M.E.; FERRÃO, M.A.G.; CORDEIRO, A.T. 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, 2005.
- RAMOS, H.J.O.; SEIXAS, D.F.; PEREIRA, L.F.P.; CRUZ, L.M.; FUNGARO, M.H.; HUNGRIA, M.; OSAKU, C.; PETZL-ERLER, M.L.; AYUB, R.A.; PERALTA, M.; MARUR, C.J.; SOUZA, E.M.; VIEIRA, L.G.E.; PEDROSA, F.O. Análise proteômica do estresse hídrico em cafeeiro. **V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Águas de Lindóia (SP)-Brasil, Embrapa Café, CD-rom, 2007.
- VIEIRA LGE, ANDRADE AC, COLOMBO CA, MORAES AAH, METHA A, OLIVEIRA AC, LABATE CA, MARINO CL, MONTEIRO-VITORELLO CB, MONTE DC, GIGLIOTI E, KIMURA ET, ROMANO E, KURAMAE EE, LEMOS EGM, ALMEIDA ERP, JORGE EC, BARROS EVSA, DA SILVA FR, VINECKY F, SAWAZAKI HE, DORRY HFA, CARRER H, ABREU IN, BATISTA JAN, TEIXEIRA JB, KITAJIMA JP, XAVIER KG, LIMA LM, CAMARGO LEA, PEREIRA LFP, COUTINHO LL, LEMOS MVF, ROMANO MR, MACHADO MA, COSTA MMC, GROSSI DE SÁ MF, GOLDMAN MHS, FERRO MIT, TINOCO MLP, OLIVEIRA MC, SLUYS MAV, SHIMIZU MS, MALUF MP, EIRA MTS, GUERREIRO FILHO O, ARRUDA P, MAZZAFERA P, MARIANI PDSC, OLIVEIRA RL, HARAKAVA R, BALBAO SF, TSAI SM, MAURO SMZ, SANTOS SN, SIQUEIRA WJ, COSTA GGL, FORMIGHIERI EF, CARAZZOLLE MF, PEREIRA GAG. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Braz. J. Plant Physiol.** 18: 95-108, 2006.
- VINECKY, F.; DE BRITO, K.M.; DA SILVA, F.R.; ANDRADE, A.C. 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 Cafés do Brasil**, Londrina (PR)-Brasil, Embrapa Café, CD-rom, 2005.