

CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *DREB2A* DE GENÓTIPOS DE *COFFEA CANEPHORA* CONTRASTANTES PARA A TOLERÂNCIA À SECA¹

Gabriel Sérgio Costa Alves²; Luciana Pereira Freire³; Ingrid Gomes Renoldi Heimbeck³; Natália Gomes Vieira⁴; Felipe Vinecky⁵; Pierre Marraccini⁶; Luciano Vilela Paiva⁷; Alan Carvalho Andrade⁸

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café e com apoio da FINEP, INCT-Café (CNPq/FAPEMIG) e CIRAD.

² Doutorando, M. Sc., Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, gscalves2@posgrad.ufla.br

³ Bolsista, M. Sc., Embrapa Café, Brasília – DF

⁴ Mestranda, Bs, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG

⁵ Doutorando, M. Sc., Universidade Nacional de Brasília – UNB, Brasília – DF

⁶ Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Montpellier – FR, marraccini@cirad.fr

⁷ Pesquisador, PhD, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, luciano@dqi.ufla.br

⁸ Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, alan@cenargen.embrapa.br

RESUMO: Apesar de alguns estudos em fisiologia vegetal resultarem em uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância à seca em cafeeiro, ainda é escasso o conhecimento acerca das alterações metabólicas e moleculares envolvidos na resposta do cafeeiro às condições de estresse hídrico. Neste sentido, resultados prévios obtidos, analisando-se a expressão relativa do gene *DREB2A* dos clones 14 (tolerante a seca) e 22 (sensível a seca) de *Coffea canephora* var. Conilon, demonstraram expressão diferencial desse gene em folhas de plantas submetidas ou não ao estresse hídrico. Polimorfismos na região promotora do gene *DREB2A* foram identificados e podem indicar a participação de diferentes haplótipos no controle genético da tolerância a seca. O objetivo deste trabalho consiste na engenharia de cassetes gênicos utilizando o vetor binário pBI121 combinado com diferentes segmentos da região promotora do gene *DREB2A*, isolados dos clones 14 e 22 de *C. canephora* com o intuito de permitir uma melhor caracterização *in vivo*, da participação dos elementos *cis* e da influência dos polimorfismos observados na funcionalidade deste promotor em relação às respostas do cafeeiro ao estresse hídrico.

Palavras-chave: *Coffea*, *DREB*, tolerância à seca, promotor, engenharia genética

CHARACTERIZATION OF THE PROMOTER REGION OF GENE *DREB2A* FROM CONTRASTING GENOTYPES OF *COFFEA CANEPHORA* FOR DROUGHT TOLERANCE

ABSTRACT: Although some studies in plant physiology has resulted in a better understanding of the mechanisms involved in drought tolerance in coffee, there are still lack of information about the metabolic and molecular mechanisms involved in the response of coffee to water stress conditions. Thus, previous results obtained by analyzing the relative expression of the gene *DREB2A* of the clones 14 (drought tolerant) and 22 (drought susceptible) of *C. canephora* var. Conilon showed differential expression of this gene in the leaves of plants subjected or not to water stress. Polymorphisms inside the *DREB2A* promoter region were identified and could indicate the involvement of different haplotypes in the genetic control of drought tolerance. The objective of this work consists of engineering gene cassettes using the binary vector pBI121 combined with different segments of the gene promoter *DREB2A*, isolated from the clones 14 and 22 of *C. canephora* in order to better characterize *in vivo* the involvement of *cis* elements and the influence of the polymorphism found in the functionality of this promoter upon the coffee response to water stress.

Key words: *Coffea*, *DREB*, drought tolerance, promoter, genetic engineering.

INTRODUÇÃO

Entre as estratégias da engenharia genética visando à tolerância à seca estão (i) a introdução de regiões gênicas codificadoras para proteínas capazes de minimizar (diretamente ou indiretamente) os efeitos deletérios do estresse hídrico e (ii) o uso de seqüências reguladoras (promotores) capazes de controlar a expressão de genes específicos na resposta ao estresse hídrico. Os efeitos transcricionais quantitativos e qualitativos ocasionados por promotores podem ser atenuados com a seleção do promotor adequado considerando-se as características da planta e o tipo de transgene. Resultados prévios mostraram que o gene *DREB2A* apresenta uma expressão diferencial nos clones 14 (tolerante a seca) e 22 (sensível a seca) de *C. canephora* var. Conilon quando as plantas são submetidas ou não ao estresse hídrico. Análises da expressão gênica em condições de estresse hídrico têm possibilitado estudos para a identificação de

promotores estresse-induzidos (Alves *et al.*, nesse congresso). Tais promotores são potencialmente úteis na engenharia genética para a expressão direcionada sob condições controladas, evitando os efeitos secundários indesejáveis na ausência do estresse e o silenciamento gênico às vezes resultante da utilização de promotores constitutivos. O objetivo deste trabalho foi construir um cassete gênico que auxiliará (i) na avaliação da participação das regiões promotoras e dos motivos *cis* de regulação na adaptação fenotípica e (ii) na caracterização funcional do núcleo promotor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal:

Folhas foram coletadas de plantas dos clones 14 e 22 de *C. canephora* var. Conilon previamente identificados no INCAPER (Ferrão *et al.*, 2000).

Extração e amplificação do DNA:

O DNAg foi extraído pelo método CTAB (Saghai-Marooof *et al.*, 1984) modificado. A integridade das amostras de DNA extraídas foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0.8% corado com 1 µL de Brometo de Etídio (0.5 µg.mL⁻¹). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop® Espectrophotometer ND-1000). A qualidade foi avaliada pelo espectro (220-600nm) com a razão DO₂₆₀/DO₂₈₀. Os *primers* visando amplificar a região promotora do gene *DREB2A* foram desenhados com auxílio do programa PrimerQuestSM® (Integrated DNA Technologies - IDT), usando as seqüências dos haplótipos dos promotores isolados a partir dos clones 14 (tolerante a seca) e 22 (sensível a seca) de *C. canephora* var. Conilon (Alves *et al.*, nesse congresso). Por isso foram usados seis pares de *primers* para amplificar três sub-regiões de extensões diferentes (Tabela 1). Esses *primers* foram desenhados para incluir sítios para as enzimas de restrição *Hind*III (nos *primers* forward), e *Bgl*II (nos *primers* reverse). A inclusão dos sítios foi realizada para possibilitar a ligação direta dos amplicons ao vetor binário.

A qualidade dos *primers* foram avaliadas pelos programas OligoAnalyzer 3.1 (IDT Technologies) e FastPCR Professional 6.1 (Primer Digital Ltda) (Kalendar *et al.* 2009). Os *primers* desenhados para a amplificação das sub-regiões do promotor foram:

Tabela 1. *Primers* utilizados para as ampliações dos DNAg dos clones 14 e 22 de *C. canephora*. Onde ^(a), ^(b) e ^(c) correspondem aos pares de *primers* utilizados para amplificação do promotor *DREB2A*. O sítios de restrição são indicados em verde (*Bgl*II) e em vermelho (*Hind*III).

<i>Primers</i>	Seqüências dos <i>Primers</i>	Adaptadores (Sítios de Restrição)
<i>DrebPProx</i> ^(a)	5'- TAATTCCAAGCTTGTCTGAAGT-3'	HindIII
<i>DrebPMed</i> ^(b)	5'- AAGAGAACAACAAGCTTCTTGT-3'	HindIII
<i>DrebPDist</i> ^(c)	5'- TCCTAGTAAGCTTCACGTTGT-3'	HindIII
<i>DrebPR</i> ^(a,b,c)	5'- TGTTGAGAAATGGTTAGATCTTGAA-3''	BglII

Os amplicons foram tratados com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bgl*II, e ligados ao vetor binário pBI121 previamente linearizado após a excisão do promotor constitutivo 35S do Vírus do Mosaico da couve flor (CaMV-35S) pela digestão com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração e digestão do vetor pBI121:

O vetor binário utilizado para a construção foi o pBI121 que possui o gene “reporter” *GUS* (ou *uidA*) codificando para a enzima β-glucuronidase. O cassete é composto por um promotor CaMV-35S controlando a expressão do gene *GUS* e o terminador da transcrição NOS (NOS-ter). O DNA plasmidial do vetor teve sua estrutura confirmada com o mapa de restrição usando-se as enzimas *Pst*I e *Pvu*II. Os fragmentos de restrição apresentaram o perfil de bandas esperado, conforme o mapa de restrição (Figura 1).

O vetor pBI121 foi duplamente digerido com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI para a retirada do promotor CaMV-35S. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose, sendo o fragmento do vetor linearizado (livre do promotor CaMV-35S) utilizado para as reações de ligação com os amplicons do promotor *DREBA* previamente tratados com as enzimas *Hind*III e *Bgl*II.

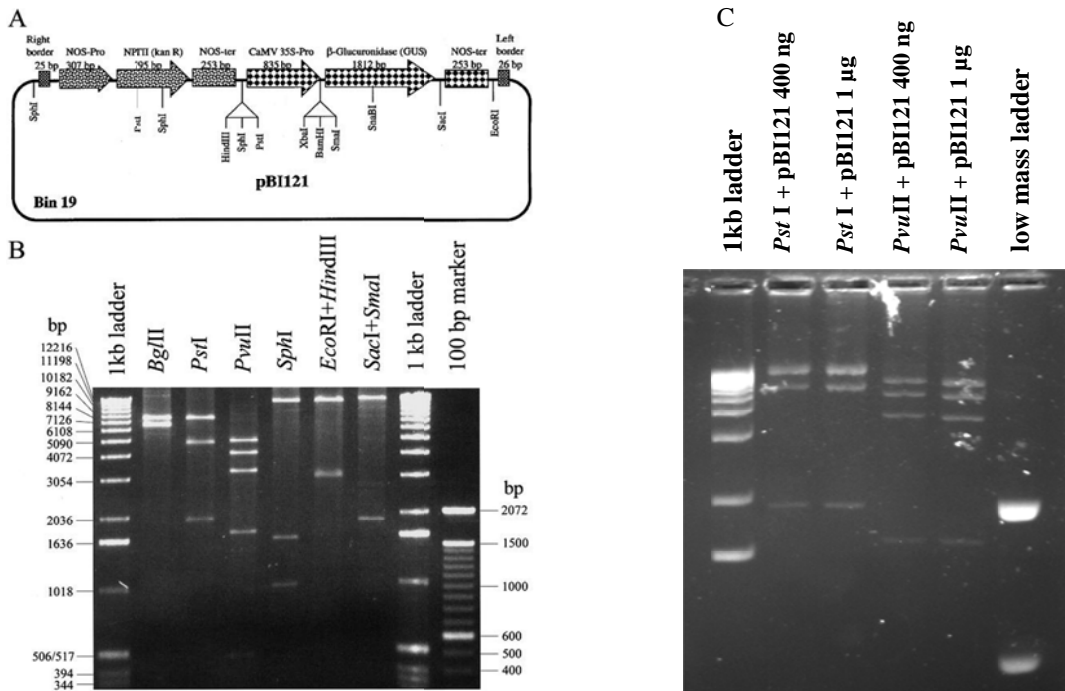


Figura 1. (A) Mapa de restrição simplificado do vetor binário pBI121. A presença dos genes *NPTII* (conferindo a resistência a canamicina), e *GUS* (este último sob a regulação do promotor constitutivo CaMV35S). (B) Análise do vetor pBI121 tratado com diferentes enzimas de restrição. (C) Confirmação da estrutura do vetor pBI121 após as reações de restrição simples com as enzimas *PstI* e *PvuII*.

Amplificação da região promotora

Os *primers* utilizados nas reações de PCR para amplificar os três fragmentos distintos da região promotora, foram os seguintes: Amplicon Dreb Proximal (765 pb), DrebPProxF e DrebPR; amplicon Dreb Mediano (1.118 pb), DrebPMedF e DrebPR; e amplicon Dreb Distal (1.469 pb), DrebPDistF e DrebPR. O amplicon Dreb Proximal abrange os pares de base + 1 ao - 765 da região promotora. Já o amplicon Dreb Mediano amplifica a região + 1 a - 1.118. O amplicon Dreb Distal corresponde à amplificação da região + 1 a - 1469 do gene *DREB*. Apesar da instabilidade no pareamento devido à modificação de algumas bases nucleotídicas para a criação do sítio de restrição, os pares de *primers* foram eficientes na amplificação da sequência-alvo dos clones selecionados. Os amplicons obtidos apresentaram tamanhos correspondentes ao esperado Dreb Proximal (765 pb), Dreb Mediano (1.118 pb), e Dreb Distal (1.469 pb) (Figura 2).

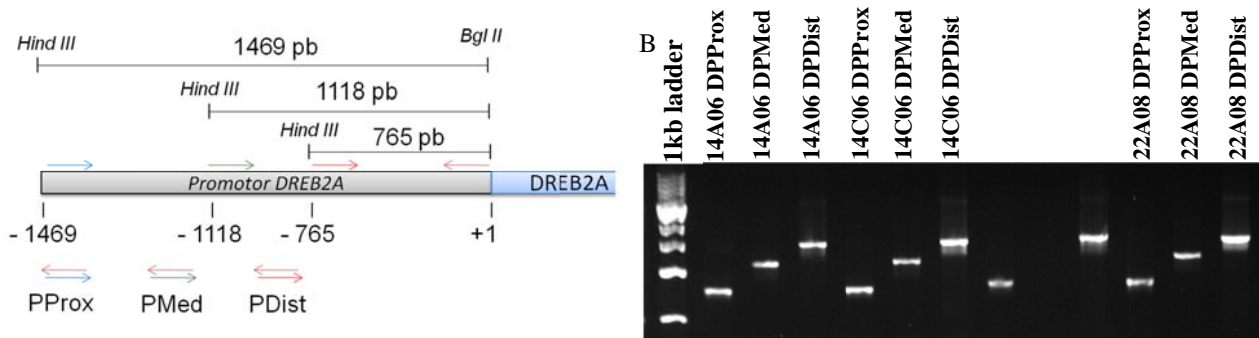


Figura 2. Amplificação da região promotora do gene *DREBA* dos clones 14 e 22 de *C. canephora* var. Conilon com os *primers* DPProx, DPMed, DPDist e DPR. (A) Esquema ilustrativo das regiões do promotor do gene *DREB2A* amplificadas visando a construção do cassete gênico (B) Estão representados os amplicons Dreb Proximal, Dreb Mediano, Dreb Distal de cada um dos clones escolhidos (14A06, 14C06 e 22A08). O marcador molecular de 1kb permite a confirmação do tamanho esperado dos fragmentos 765, 1118 e 1469 pb, respectivamente.

Construções gênicas

Foram realizadas construções de cassetes gênicos com dois alelos do clone 14, tolerante, e um alelo do clone 22, sensível. Para amplificação dos alelos selecionados – clones 14A06 14C06 e 22A08 – foram desenhados *primers* com adaptadores contendo sítios de restrição. Os sítios de restrição foram adicionados no interior dos *primers* para

permitir a clonagem no vetor pBI121. As enzimas de restrição escolhidas possuíam sítios únicos de restrição no vetor reduzindo a formação de clones indesejáveis. Apesar de terem sido utilizados dois pares diferentes de enzimas para a digestão do vetor binário – *HindIII/BamHI* – e dos produtos de PCR – *HindIII/BglIII* – as extremidades 3' resultantes da digestão por *BglIII* ou *BamHI* produzem extremidades compatíveis (Figura 2). As construções geradas foram pD14–1 (pDREB2A 14A06 + pBI121), pD14–2 (pDREB2A 14C06 + pBI121) e pD22 (pDREB2A 22A08 + pBI121). Na construção pD14–1 foram utilizadas três regiões do promotor pDREB2A 14A06, a região proximal, mediana e distal, sendo as construções geradas por estes fragmentos pD14–1 P, pD14–1 M e pD14–1 D. A clonagem foi eficiente e os clones foram confirmados por seqüenciamento.

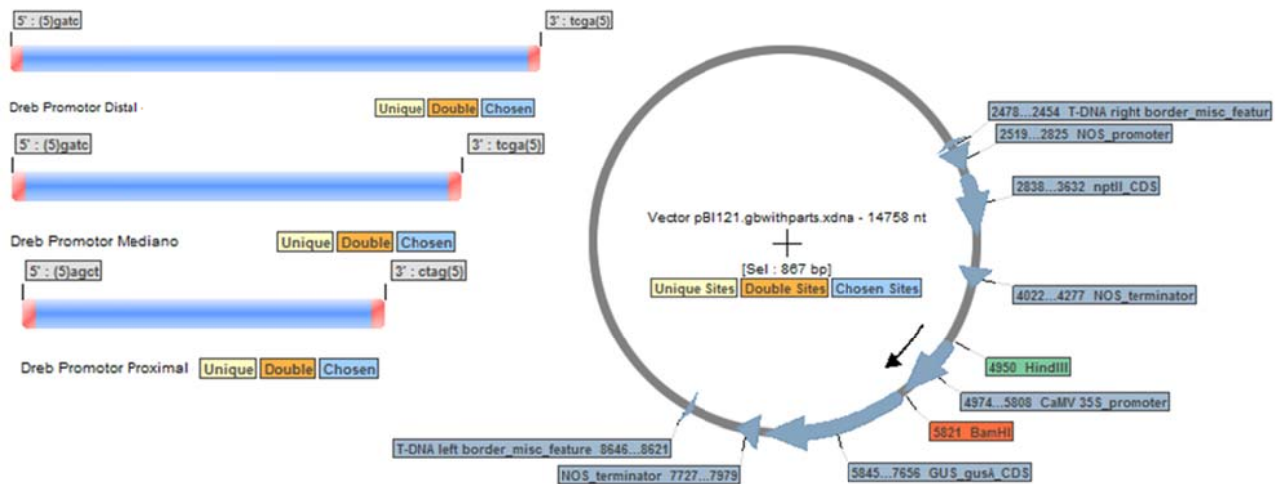


Figura 3. Esquema ilustrativo da estratégia adotada para construção dos cassetes gênicos utilizando o vetor binário pBI121. O promotor constitutivo indicado pela seta é retirado pela digestão com as enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI* e novos promotores são incorporados ao vetor. Os novos promotores passam a mediar a expressão da proteína GUS.

CONCLUSÕES

A transformação genética de citrus e café com os cassetes gênicos descritos, contendo um gene repórter sob a regulação da região promotora do gene *DREB2A* isolada de ambos genótipos auxiliará na elucidação da influência dos polimorfismos no mecanismo de resposta ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.S.C.; FREIRE, L.P.; HEIMBECK, I.G.R.; VIEIRA, N.G.; VINECKY, F.; MARRACCINI, P.; PAIVA, L.V.; ANDRADE, A.C. Identificação e análise de polimorfismos na região promotora do gene *DREB2A* em vários genótipos do gênero *Coffea*. VII SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. **Anais...**, Araxá, MG, 2011.
- ANDRADE, A.C. Advanced Biology Applied to Coffee Research - Current Status and Future Perspectives. 22 INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE – ASIC. **Proceedings of 22 International Conference On Coffee Science**, Campinas, SP, 2008.
- CHEN, P.Y.; WANG, C.K.; SOONG, S.C.; TO, K.Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. **Molecular Breeding**, v.11, n.4, p.287-293, 2003.
- CRUCES, L.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Invited review : targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. **In Vitro**, v.40, n.1, p.1-22, 2004.
- 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. **Revista Ceres**, v.47, n.273, p.555-560, 2000.
- MARRACCINI, P.; ALVES, G.S.C.; VINECKY, F.; FREIRE, L.P.; VIEIRA, N.G.; RAMOS, H.J.O.; VIEIRA, L.G.E., ELBELT, S.; MARQUES, T.; RODRIGUES, G.C.; ANDRADE, A.C. Identificação de genes com expressão diferencial em folhas de cafeeiro *Coffea canephora* e *Coffea arabica* submetidas a diferentes condições de estresse hídrico. VI SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. **Anais...**, Vitória, ES, 2009.
- MOLINARI, H.B.; BESPALHOK, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.; VIEIRA, L.G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, v.99, n.3-4, p.379-385, 2004.

- MOLINARI, H.B.; MARUR, C.J.; FILHO, J.C.B.; KOBAYASHI, A.K.; PILEGGI, M.; JÚNIOR, R.P.L.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, n.6, p.1375-1381, 2004.
- SHARMA, K.K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v.27, p.411-424, 2008.
- UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, n.2, p.113-122, 2006.
- VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n.2, p.123-132, 2005.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v.218, n.1, p.1-14, 2003.