IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *DREB2A* EM VÁRIOS GENÓTIPOS DO GÊNERO *COFFEA*[1]

Gabriel Sérgio Costa Alves[2]; Luciana Pereira Freire[3]; Ingrid Gomes Renoldi Heimbeck[3]; Natália Gomes Vieira[4]; Felipe Vinecky[5]; Pierre Marraccini[6]; Luciano Vilela Paiva[7]; Alan Carvalho Andrade[8]

[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 Brasília – UnB, Brasília – DF.
[6] Pesquisador, PhD, CIRAD 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 moleculares que ocorrem na resposta do cafeeiro às condições de estresse hídrico. Neste sentido, estudos recentes já resultaram na identificação de vários genes candidatos apresentando expressão diferencial entre genótipos contrastantes para essa característica. Resultados prévios obtidos analisando-se a expressão relativa do gene *DREB2A* em genótipos de *C. canephora*, tolerante (Clone 14) e sensível (Clone 22), demonstraram expressão diferencial destes genótipos em plantas submetidas ao estresse hídrico. Desta forma, o objetivo deste trabalho consistiu na identificação e análise de polimorfismos na região promotora do gene *DREB2A* destes dois clones de *C. canephora*, além de outros diferentes genótipos do gênero *Coffea* (*C. eugenioides* e *C. arabica*). Com os resultados obtidos foi possível identificar os elementos *cis* de regulação, e avaliar a ocorrência de polimorfismos na região promotora do gene *DREB2A* de cafeeiro. Os polimorfismos encontrados também permitiram a identificação de diferentes haplótipos nos genótipos estudados e a distribuição dos alelos deste *locus* nos genótipos sugere a segregação dos alelos de *C. canephora* e *C. eugenioides* nos genótipos de *C. arabica*. A presença de elementos *cis* de regulação no promotor *DREB2A* para fatores de transcrição da via dependente de ABA sugerem a possibilidade de atuação conjunta das duas vias (dependente e independente de ABA), na regulação do gene *DREB2A*.

Palavras-chave: Café, fatores de transcrição, marcadores moleculares, tolerância à seca.

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN THE PROMOTER REGION OF THE GENE *DREB2A* IN DIFFERENT GENOTYPES OF *COFFEA* GENUS

ABSTRACT: Although some studies in plant physiology have 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. In this regard, recent studies have identified several candidate genes showing differential expression between contrasting genotypes for this trait. Previous results obtained by analyzing the relative expression of the gene *DREB2A* in genotypes of *C. canephora*, tolerant (clone 14) and sensitive (clone 22) showed differential expression of these genotypes in plants subjected to water stress. Thus, the aim of this study was to identify and analyze the polymorphisms within the promoter region of the gene *DREB2A* in those two clones of *C. canephora*, and other genotypes of *Coffea* genus (*C. eugenioides* and *C. arabica*). With the results achieved it was possible to identify the *cis* regulatory elements, and evaluate the occurrence of polymorphisms in the promoter region of the coffee gene *DREB2A*. The polymorphisms found have also allowed the identification of different haplotypes among those genotypes and the allelic distribution of these loci suggests the segregation of *C. canephora* and *C. eugenioides* alleles in the *C. arabica* genotype. The presence of *cis* regulatory elements from TFs belonging to ABA – dependent pathway in the promoter *DREB2A* suggest the possibility of cross-talk between the two network (ABA – independent and – dependent) response in the regulation process of *DREB2A* gene.

Key words: *Coffee*, transcription factors, molecular markers, drought tolerance.

INTRODUÇÃO

Historicamente, climas amenos e índices pluviométricos bem distribuídos ao longo do ano são característicos das regiões de cultivo da cultura cafeeira. Condições climáticas desfavoráveis e a crescente expansão da cafeicultura para regiões marginais, onde tais condições intensificam-se, contribuem significativamente para a redução da produtividade, tornando a seca o principal estresse abiótico que afeta a produção de café nos países cafeicultores. Em regiões de cultivo de café sem irrigação, períodos de seca intensa podem representar uma redução de até 80% da área de plantio. A difícil reprodutibilidade das condições ideais de cultivo requer algumas vezes o desenvolvimento de métodos biotecnológicos para garantir a sustentabilidade da produção cafeeira.

Atualmente, muitas pesquisas têm objetivado a compreensão dos mecanismos de tolerância dos vegetais ao estresse hídrico. Diferentemente da resistência aos estresses bióticos, as repostas genéticas aos estresses abióticos são multigênicas, e assim mais complexas e difíceis de controlar. Devido a sua capacidade de interagir com múltipilos genes, os fatores de transcrição (TFs) compõem uma classe protéica importante para a compreensão dos mecanismos de resposta ao estresse abiótico. Os TFs interagem com elementos *cis*-regulatórios integrantes das regiões promotoras dos vários genes induzidos por estresse abiótico, e por consequência, co-regulam os genes envolvidos na manifestação da tolerância. Resultados prévios obtidos, analisando-se a expressão relativa do gene integrante da via de resposta ao estresse hídrico *DREB2A* em genótipos de *C. canephora*, tolerante (Clone 14) e sensível (Clone 22), demonstraram expressão diferencial destes genótipos em plantas submetidas ao estresse hídrico (Marraccini *et al*, 2009). O objetivo deste trabalho foi identificar e isolar a região promotora do gene *DREB2A* em diferentes genótipos do gênero *Coffea* visando analisar as características deste promotor, e assim, tentar elucidar a influência da sua regulação na adaptação ao déficit hídrico. Os resultados dessa análise serão apresentados neste trabalho e sugerem a ocorrência de polimorfismos nos motivos *cis*-regulatórios da região promotora do gene *DREB2A*, assim como, a ocorrência de diferentes haplótipos nos genótipos avaliados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal:

O material vegetal utilizado foi escolhido visando ter-se a maior cobertura possível da variabilidade genotípica existente no gênero *Coffea*. Para a escolha dos genótipos, foram considerados critérios como a tolerância ao estresse hídrico e a genealogia das variedades. Os materiais biológicos dos genótipos (I) *C. canephora*, clones 14 e 22, (II) *C. arabica*, Bourbon e Typica (coleção Etiópia do IAPAR), Catuaí 144, IAPAR59, Mundo Novo, Obatã, Rubi e Tupi, (III) *C. eugenioides*, e (IV) *C. racemosa* foram cedidos pelo IAPAR e INCAPER.. Foram escolhidos cultivares de *C. arabica* sem introgressão de *C. canephora* (Bourbon, Catuaí, Mundo Novo, Rubi), acessos de *C. canephora* tolerante (clone 14) e sensível (clone 22) à seca, cultivares de *C. arabica* com introgressão genética de *C. canephora* (IAPAR59, Tupi e Obatã), e espécies mais distantes geneticamente tais como *C. eugenioides* e *C. racemosa*. Os DNAs(g) foram extraídos e amplificados com primers específicos – arquitetados a partir da análise da sequência promotora de *DREB2A* de *C. canephora*. Os amplicons foram clonados e sequenciados.

SNPs e Motivos *cis*-regulatórios:

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas a partir do uso do programa "Sequencing analysis" versão 5.2 da Applied Biosystems. Após a análise das sequências, as mesmas foram alinhadas com o auxílio do programa Seqman (DNASTAR). A partir dos alinhamentos obtidos e análises dos eletroferogramas, foi possível a detecção dos polimorfismos. Foi realizado um alinhamento múltiplo de sequências no programa ClustalW2 (EMBL-EBI) para a análise do padrão alélico do *locus DREB2A* nos genótipos estudados. Análises *in silico* das sequências da região promotora dos diferentes genótipos, nos bancos de dados de elementos regulatórios Plant CARE ("Plant cis-acting regulatory element") e PLACE ("Plant cis-acting regulatory DNA elements"), permitiram a identificação de motivos *cis*-regulatórios no DNA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e identificação da região promotora:

A sequência referência obtida de *C. canephora* possui 1588 pares de bases e abrange a região da posição -1451 a +137 do gene *DREB2A*, incluindo os primeiros 45 resíduos de aminoácidos da proteína.

As análises da sequência consenso nos bancos de dados de motivos *cis* de regulação PLACE e PlantCARE possibilitou a identificação dos elementos de regulação característicos da resposta ao estresse hídrico, como ERF/DRE (Dehydration Responsive Element), ERE (Ethylene Responsive Element), ABRE (ABA Responsive Element), ERD1 (Early Responsive to Dehydration 1), entre outros (dados não apresentados). Com base na sequência consenso obtida de *C. canephora*, foram arquitetados *primers* visando à amplificação dos diferentes genótipos do gênero *Coffea*.

Tabela 1. *Primers* utilizados para as amplificações dos DNAg dos 12 genótipos estudados. Onde [(a)], [(b)] e [(c)] correspondem aos pares de *primers* utilizados para amplificação do promotor *DREB2A*.

Primer	Sequências dos Primers	Amplicon (pb)
DrebS1F [(a)]	5'–ACTCCTAGTAAGCGGCACGTTGTT–3'	837
DrebS1R [(a)]	5'–CCTTTCGTGGTTGTCTCTTGACCT–3'	
DrebS2F[(b)]	5'–TCGTGCATTCAACAGCACCGTCA–3'	952
DrebS2R[(b)]	5'–TGGCTTTGCAGGCATTGACTACG–3'	
DrebS1F[(c)]	5'–ACTCCTAGTAAGCGGCACGTTGTT–3'	1560
DrebS2R[(c)]	5'–TGGCTTTGCAGGCATTGACTACG–3'	

O amplicon S1 abrange os pares de base -1438 ao - 601 da região promotora. Já o amplicon S2 amplifica a região – 843 a + 109, abrangendo, assim, 843 pb anterior à região codante e mais 109 pb posterior ao códon inicial. O amplicon S1/S2 corresponde à amplificação da região – 1438 a + 109 do gene *DREB2A*.

Os pares de *primers* S1F/R, S2F/R e S1F/S2R amplificaram sequências de aproximadamente 800, 900 e 1500 pb, respectivamente, condizentes com os amplicons esperados para as sequências–alvo, S1 (837 pb), S2 (952 pb), e S1/S2 (1560 pb).

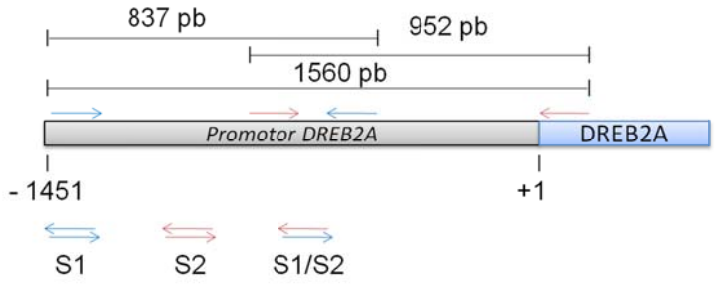

Figura 1. Esquema representativo da estratégia utilizada para isolar e amplificar a região promotora do gene *DREB2A*. Os amplicons obtidos S1, S2 e S1S2 e o tamanho dos fragmentos 837, 952 e 1547 pb são indicados.

Foi realizada a clonagem dos produtos de amplificação dos genótipos de *C. canephora* (Clone 14 e 22), *C. arabica* (Catuaí 144, IAPAR59, Mundo Novo, Obatã, Rubi, Tupi e Typica), *C. eugenioides* e *C. racemosa*. Os amplicons, S1, S2 e S1S2 foram clonados com o objetivo de individualizar os alelos. Para o sequenciamento, foram selecionados 16 clones por genótipo para a (i) clonagem S1, (ii) clonagem S2, e (iii) clonagem S1S2, além de um clone controle (colônia azul).

Os 48 clones de cada genótipo (16 clones x 3 clonagens) foram sequenciados na plataforma de sequenciamento 3730 XL da Applied Biosystem. As sequências foram analisadas no programa *Sequencing Analises* (Applied Biosystem) e apresentaram boa qualidade gerando fragmentos de aproximadamente 600 pb com Phred superior ou igual a 20. Com o auxílio do programa Seqman (DNASTAR), as estruturas do vetor foram removidas e o as sequências alinhadas. Primeiramente foi realizado um alinhamento completo por genótipo com todas as 48 sequências obtidas. O resultado do alinhamento permitiu visualizar as estratégias de sequenciamento e a orientação dos fragmentos clonados. Pode ser observado que a distribuição e orientação dos fragmentos são proporcionais, confirmando a eficiência do sequenciamento e da estratégia de clonagem (Figura 2A).

Análises dos polimorfismos na região promotora do gene *DREB2A:*

As sequências geradas para a região promotora do gene *DREB2A*, permitiu a identificação de polimorfismo e consequentemente dos haplótipos nos diferentes genótipos analisados. Dois alelos de cada genótipo foram selecionados e as sequências foram alinhadas. Os genótipos de *C. canephora*, clone 14 e 22 apresentaram distribuição alélica diferente para o *locus* do gene *DREB2A* (Figura 2B). As alterações encontradas nos alelos adquiridos na domesticação são mais comuns em regiões promotoras.

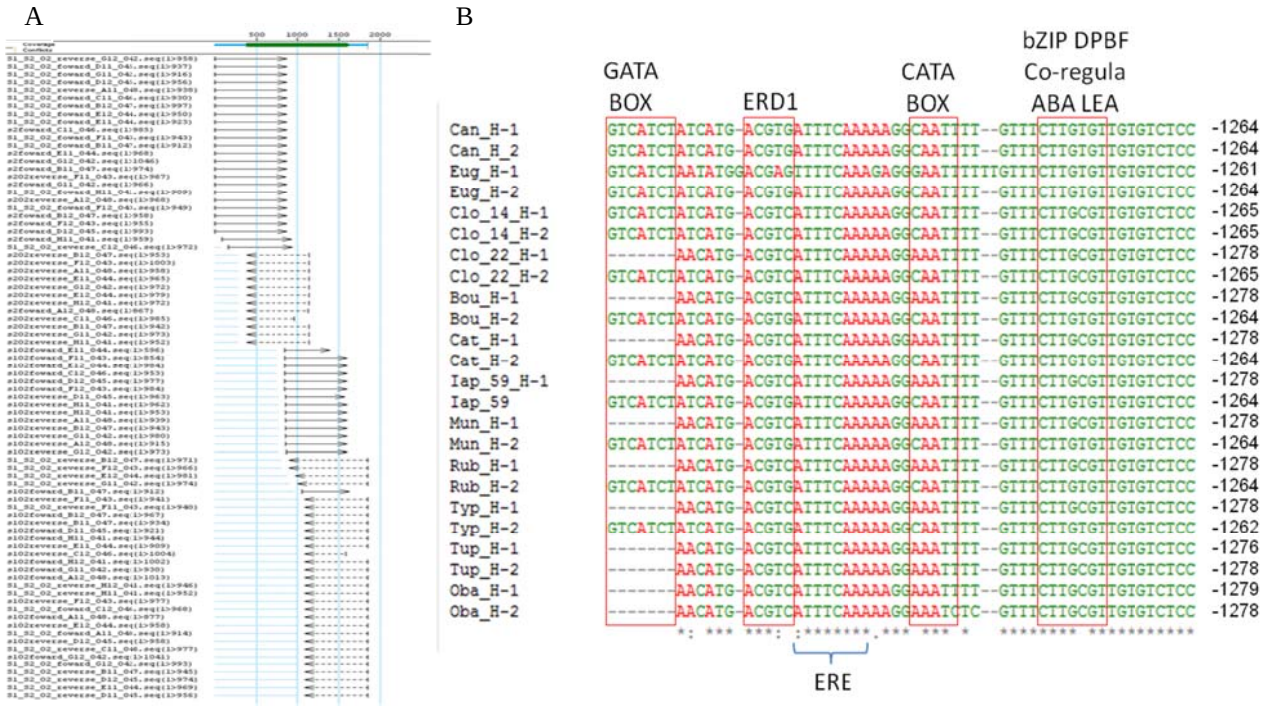

Figura 2. (A) Alinhamento das 96 sequências obtidas após o sequenciamento senso e anti-senso dos 48 clones (16 clones x 3 amplicons) gerados para o genótipo Obatã. Foram gerados 16 clones para cada genótipo e região amplificada S1, S2 e S1/S2. (B) Alinhamento da região S1 do promotor *DREB2A*. Regiões polimórficas entre os genótipos estão enquadrados em vermelho. Motivos de regulação *cis* do DNA, região consenso promotora (GATA-BOX e CATA-BOX), elemento inicial de reposta a desidratação (ERD1) e elemento de resposta ao etileno (ERE).

Desta forma, o estudo dessa diferença observada poderá contribuir para identificar as causas da variação na adaptação ao estresse hídrico entre os genótipos clones 14 e 22 (Damatta *et al.*, 2003). A espécie *C. eugenioides* demonstrou homozigose no *locus*, assim como os cultivares Tupi e Obatã de *C. arabica*. Entretanto, os demais genótipos de *C. arabica* demonstraram padrão heterozigótico no *locus* do gene *DREB2A*. A diferença de haplótipos observada nos genótipos heterozigóticos de *C. arabica* corrobora com estudos anteriores da diversidade genética no gênero *Coffea* que descrevem a origem do *C. arabica* como resultado de uma hibridização natural entre o *C. canephora* e o *C. eugenioides* (Lashermes *et al*, 1999). As análises da distribuição alélica sugerem a existência de dois grupos alélicos diferentes , um pertencente ao genótipo *C. canephora* e outro ao *C. eugenioides*. Os genótipos de *C. arabica* heterozigotos apresentam um haplótipo com ambos alelos, indicando um comportamento de segregação dos alelos parentais na progênie.

Já o padrão homozigótico observado nos cultivares de *C. arabica*, Obatã e Tupi, pode ser explicado pela origem desses cultivares, cruzamento entre Villa Sarchi (*C. arabica*) e Híbrido de Timor 832/2 (híbrido natural de *C. canephora* x *C. arabica*). Esse cruzamento pode ter ocasionado a troca de um dos alelos do *locus* atribuindo a este um caráter homozigótico.

Análise dos elementos *cis*-reguladores do DNA:

As sequências amplificadas da região promotora dos diferentes genótipos foram analisadas quanto à ocorrência dos motivos *cis* de regulação do DNA. Várias regiões consenso características de promotores foram encontradas como CATA-, TATA-, CGCG-BOX (Figura 2B). Essas regiões são receptoras do complexo de transcrição da RNA polimerase II (TATA- e CATA-BOX) ou de fatores ativadores da transcrição (CGCG-BOX). A presença dos CATA e TATA-BOX ao longo da região promotora permite uma maior combinação dos motivos reguladores ativos durante o processo transcricional. Vários motivos conservados atuantes no mecanismo de resposta à seca, previamente encontrados na sequência consenso do *C. canephora*, foram confirmados no promotor dos demais genótipos. Entre os quais os motivos ABRE e MYCRS, regulados pelos fatores de transcrição pertencentes às famílias b-ZIP e MYC, respectivamente (Figuras 3). Essas proteínas TFs participam da via de resposta à desidratação dependente de ABA. Uma vez que a família ERF, na qual está incluído o fator de transcrição DREB, participa da via independente de ABA, esses resultados sugerem a interação e co-regulação das vias dependente e independente de ABA corroborando com observações realizadas anteriores (Agarwal *et al.*, 2006).

Os elementos *cis* de ligação ERF, também foram identificados na sequência promotora. A presença dos motivos ERF na região mais próxima ao início do códon de transcrição sugere uma participação mais direta do TF DREB na regulação da expressão do gene *DREB* (Figuras 4).

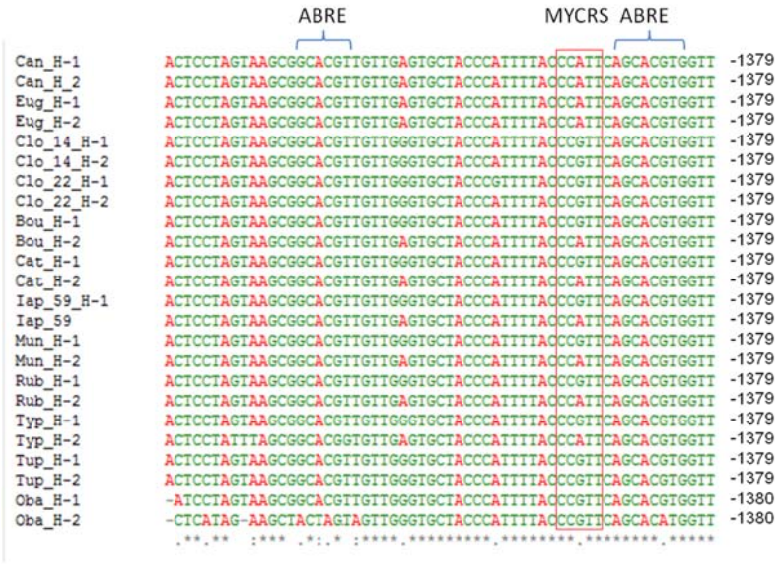

Figura 3. Alinhamento da região S1 do promotor *DREB*. Regiões polimórficas entre os genótipos estão enquadrados em vermelho. Motivos de regulação *cis* do DNA, elemento de resposta ao ácido abscísico (ABRE) e elemento de resposta ao TF MYC (MYCRS).

Figura 4. Alinhamento da região S2 do promotor *DREB2A*. Regiões polimórficas entre os genótipos estão enquadrados em vermelho. Motivos de regulação *cis* do DNA dos fatores de transcrição da família ERF, na qual está incluída a proteína DREB2A (ERF).

CONCLUSÕES

A presença de polimorfismos na região promotora do gene *DREB2A* entre os genótipos, tolerante (clone 14) e sensível (clone 22), pode ser a causa da diferença significativa na expressão gênica observada nas análises quantitativas de PCR em tempo real observados em estudos anteriores. No entanto, para confirmar essa hipótese estudos experimentais adicionais necessitam ser realizados. A transformação genética com cassetes gênicos 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 (Alves *et al*, nesse congresso). A presença desses diversos elementos regulatórios na região promotora do gene *DREB2A* confirma a grande complexidade da cascata de resposta aos estresses abióticos. É notável também, a diferença no padrão alélico entre os genótipos analisados. A distribuição alélica evidencia a presença de pelo menos dois alelos diferentes para o *locus DREB2A*.

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. Caracterização da região promotora do gene *DREB2A* de haplótipos contrastantes de *Coffea canephora.* VII SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, **Anais...**, Araxá, MG, 2011.

AGARWAL, P. K.; AGARWAL, P.; REDDY, M.K.; SOPORY, S.K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports,** v.25, n.12, p.1263-1274, 2006.

DAMATTA, F.M. ; CHAVES, A.R.M.; PINHEIRO, H.A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M.E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science,** v.164, n.1, p.111-117, 2003.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics,** v.261, n.2, p.259-266, 1999.

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 differentes condições de estresse hídrico. VI SIMPOSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, **Anais...**, Vitória, 2009.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology,** v.3, n.3, p.217-223, 2000.

VIDAL, R.O.; MONDEGO, J.M.C.; POT, D.; AMBRÓSIO, A.B.; ANDRADE, A.C.; PEREIRA, L.F.P.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.G. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, v.154, n.3, p.1053-1066, 2010.

MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; TOKUDA, E.K.; PARIZZI, L.P.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, v.11, n.30, 2011.