

ANÁLISE PRELIMINAR PARA INTEGRAÇÃO DO PERFIL GENÔMICO E PROTEÔMICO DE RAÍZES DE *Coffea canephora* SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES HÍDRICAS¹

Tatiana Santos Costa², Jorge Alex Taquita Melo³, Fernanda de Araújo Carneiro⁴, Natália Gomes Vieira⁵, Edriana Araújo de Lima⁶, Érica Cristina da Silva Rêgo⁷, Carlos Bloch Jr.⁸, Pierre Marraccini⁹, Alan Carvalho Andrade¹⁰

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

²Bolsista CAPES, Doutoranda, tatianaitase@gmail.com

³Analista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, jorge.melo@embrapa.br

⁴Bolsista Consórcio Pesquisa Café, fearca14@gmail.com

⁵Bolsista Consórcio Pesquisa Café, MS, ngvieiral@gmail.com

⁶Bolsista CNPq, Doutoranda, edrianaal@gmail.com

⁷Bolsista Consórcio Pesquisa Café, ecsr@gmail.com

⁸Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, carlos.bloch@embrapa.br

⁹Pesquisador, PhD, Cirad UMR DAP Montpellier-FR, marraccini@cirad.fr

¹⁰Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, alan.andrade@embrapa.br

RESUMO: O café é uma das principais *commodities* agrícolas do mundo, sendo o Brasil o maior produtor e o segundo maior consumidor. A seca é o principal fator limitante à produção do café no país. O crescimento das plantas em condições de seca é influenciado por alterações na fotossíntese, respiração, translocação, absorção de íons, o metabolismo de nutrientes e hormônios. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica e proteica em raízes de clones de *C. canephora* var. Conilon, cultivados em condições controle e sob estresse hídrico. Os clones avaliados foram o clone 22 (sensível à seca) e os clones 14, 73 e 120 (tolerantes à seca), cultivados em condições controladas (casa de vegetação) com (I) e sem (NI) irrigação. Para cada clone e regime hídrico, foi extraído o RNA total. O perfil do transcriptoma das raízes foi realizado utilizando o sequenciamento 454, o que possibilitou análises *in silico* da expressão por *Northern eletrônico* entre os clones e comparando as condições I vs. NI. As análises proteômicas foram realizadas por LC-MS^E utilizando cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massa. Os resultados de identificação proteica foram obtidos com o software “Protein Lynx”. Os resultados obtidos pelas análises integradas de duas desidrinas *CcDH1a* e *CcDH3* são apresentados. Os resultados mostram que existem diferenças entre as técnicas utilizadas, bem como no comportamento dos clones em relação às condições de estresse. As análises de expressão por qPCR em tempo real foram realizadas para validar os níveis de expressão gênica obtido pelas análises *in silico*.

PALAVRAS-CHAVE: Cafeeiro, seca, expressão gênica, espectrometria de massa, raiz.

PRELIMINARY ANALYSIS FOR INTEGRATING GENOMIC AND PROTEOMIC PROFILING OF ROOTS OF *Coffea canephora* SUBJECTED TO DIFFERENT WATER CONDITIONS 1

ABSTRACT: Coffee is a major agricultural commodity in the world and Brazil is the largest producer and second largest consumer. Drought is the main limiting factor to the national coffee production. Plant growth under drought conditions is influenced by changes in photosynthesis, respiration, translocation, ion absorption, metabolism of nutrients and hormones. The aim of this study was to evaluate the gene and protein expression in roots of clones of *C. canephora* var. Conilon grown under control and drought conditions. Clone 22 (drought sensitive) and clones 14, 73 and 120 (drought tolerant), grown under controlled conditions (greenhouse) with (I) and without (NI) irrigation were used. For each clone and water regime, total RNA and protein was extracted. The profile of the root transcriptome was performed using 454 sequencing, allowing *in silico* analysis of expression by *Electronic Northern* among clones and conditions (I vs. NI). The proteomic analysis was performed by LC-MS using reverse phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Protein identification results were obtained using the software "Protein Lynx". The results obtained by the two integrated analyzes of dehydrins *CcDH1a* and *CcDH3* are presented. The results show that differences exist between the techniques used, and the behavior of the clones with respect to stress conditions. The expression analysis by real-time qPCR were performed to validate the gene expression levels obtained by an *in silico* analysis.

KEYWORDS: Coffee, drought stress, gene expression, mass spectrometry, coffee roots.

INTRODUÇÃO

O café é a *commodity* agrícola mais valiosa do planeta, sendo cultivado em mais de 60 países, o Brasil é o maior produtor e exportador de café no mundo, constituindo aproximadamente 35% do valor global das exportações (ICO, 2013). Por ser um país de clima tropical, o Brasil sofre diferentes intempéries climáticas que vêm agravando-se em decorrência do aquecimento global e, dentre os fatores abióticos que afetam a agricultura brasileira, o estresse hídrico destaca-se no

âmbito nacional como o principal agente redutor da produção agrícola. Para o cafeeiro, o estresse hídrico é um fator que pode ser extremamente prejudicial, portanto a seleção de cultivares tolerantes é de grande importância, principalmente diante da expansão da cafeicultura brasileira para áreas consideradas marginais para o cultivo do café por estarem sujeitos à deficiência hídrica (DAMATTA & RAMALHO, 2006). Das duas espécies de maior comercialização, o *Coffea canephora* é a que melhor se adapta às regiões mais secas. Em resposta ao estresse, as plantas desencadeiam múltiplas vias de sinais que induzem e alteram a expressão de um grande número de genes, desencadeando uma cascata de sinais como percepção, transdução de sinal, expressão de genes e alterações metabólicas que preparam a planta para se adaptar ao ambiente (AGARWAL *et al.*, 2006). A avaliação conjunta da genômica, transcriptômica e proteômica permite um melhor entendimento da fisiologia da planta. Genes candidatos para tolerância à seca já foram descritos em trabalhos anteriores (FREIRE, 2010; MARRACCINI *et al.* 2011; MARRACCINI *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2013). Comparando os dados de qPCR com os de MS/MS associada ao gel 2-D em folhas de diferentes clones de *C. canephora* cultivados com (NI) ou sem (I) déficit hídrico, foi possível identificar genes candidatos para a tolerância a seca (Marraccini *et al.*, 2012). No presente trabalho, usamos a mesma estratégia e, para identificar proteínas e genes apresentando expressão diferencial nas raízes dos mesmos clones. Dentre os GCs analisados, apresentamos os resultados obtidos de duas desidrinas *CcDH1a* e *CcDH3*. Objetivando complementar os trabalhos anteriores o presente trabalho tem por finalidade integrar os dados de análise do transcriptoma e proteômico de raízes de *C. canephora* var. Conilon submetidos à deficiência hídrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Para análises de raízes, foram utilizados os clones de *C. canephora* Pierre var. Conilon tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) à seca, conforme descritos previamente (MARRACCINI *et al.*, 2012). Para a análise do comportamento da planta quanto à deficiência hídrica, adotou-se como genótipos estressados aqueles que na condição de não irrigação atingiram um potencial hídrico de antemã (Ψ_{am}) de -3.0 MPa (MARRACCINI *et al.*, 2012).

Análise do Transcriptoma: Para todos os clones e nas duas condições, o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® Reagent (Life technologies), conforme instruções do fabricante. Após a análise da qualidade do RNA, procedeu-se o tratamento com o Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) para a retirada de todos os vestígios de DNA genômico. O RNA total foi utilizado para o sequenciamento pela técnica de pirosequenciamento 454. A partir destes resultados, a análise *in silico* da expressão gênica foi realizada utilizando-se o software Q-Seq (Lasergene). A expressão dos genes codificando para Dehidrinas foram validados por qPCR, conforme descrito anteriormente (MARRACCINI *et al.*, 2013).

Proteômica: As proteínas totais foram extraídas com o mesmo material, utilizando o protocolo proposto por Sussulini *et al.* (2007). O extrato protéico foi submetido a uma digestão trípica e, posteriormente o fracionamento dos produtos da digestão foi realizado no LC-MS^E utilizando cromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrometria de massa. Para o fracionamento das proteínas totais foi aplicada uma coluna analítica capilar (NanoAquit, UPLC-Waters, USA) com capilaridade de 1,7µm, na qual a fase móvel A foi composta de água + ácido fórmico 0,1% e a fase móvel B de acetonitrila + ácido fórmico 0,1%. As amostras foram introduzidas diretamente na fonte ESI, com bombeamento num fluxo constante de 0.6µL/min. Os experimentos MS/MS foram realizados pela seleção do íon de interesse, no quadrupolo Q. O íon de interesse será dissociado na câmara de colisão (q2), após colidir com o argônio (Collision Induced Dissociation – CID). Os íons produzidos neste processo foram analisados no analisador de massa TOF e os dados brutos obtidos foram processados utilizando-se o programa “ProteinLynx” (versão 5.2.2) da Water/Micromass, o qual já possui um aplicativo para identificação das proteínas. Para cada análise foram efetuadas três replicatas técnicas. E a busca das proteínas foi realizada utilizando o banco de dados do café. Para padronização dos dados gerados nas duas análises, estes foram normalizados com a ubiquitina, considerada uma proteína constitutiva, na qual a expressão é constante independente da condição em que planta se encontra (BARSALOBRES-CAVALLARI *et al.*, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de transcriptoma: Como ilustrado na Figura 1, tanto na análise *in silico* de dados de sequenciamento 454, como nos dados obtidos por qPCR, pode-se observar uma alta indução dos genes que codificam as Dehidrinas DH1a e DH3 no clone 22 na condição de seca (NI). Para o *CcDH3*, nos clones tolerantes, a expressão também foi induzida na condição de seca, sendo que o clone 120 apresentou a maior expressão..

Proteômica: Quanto aos valores da análise de proteínas, a maior quantidade de *CcDH3* foi observada no clone 120 na condição de irrigação (Figura 1-A-Painel direito). Para a proteína *CcDH1a* a maior quantificação foi apresentada no clone 73 na condição de estresse (NI) (Figura 1-B-Painel direito).

Comparação entre genômica e proteômica:

Observando-se os dados obtidos por expressão gênica e proteômica, especialmente no caso do clone 22, constata-se que houve aumento de transcritos e também de proteínas CcDH1a e CcDH3, na condição de estresse hídrico, em todas as análises realizadas (transcriptoma, qPCR e proteômica).

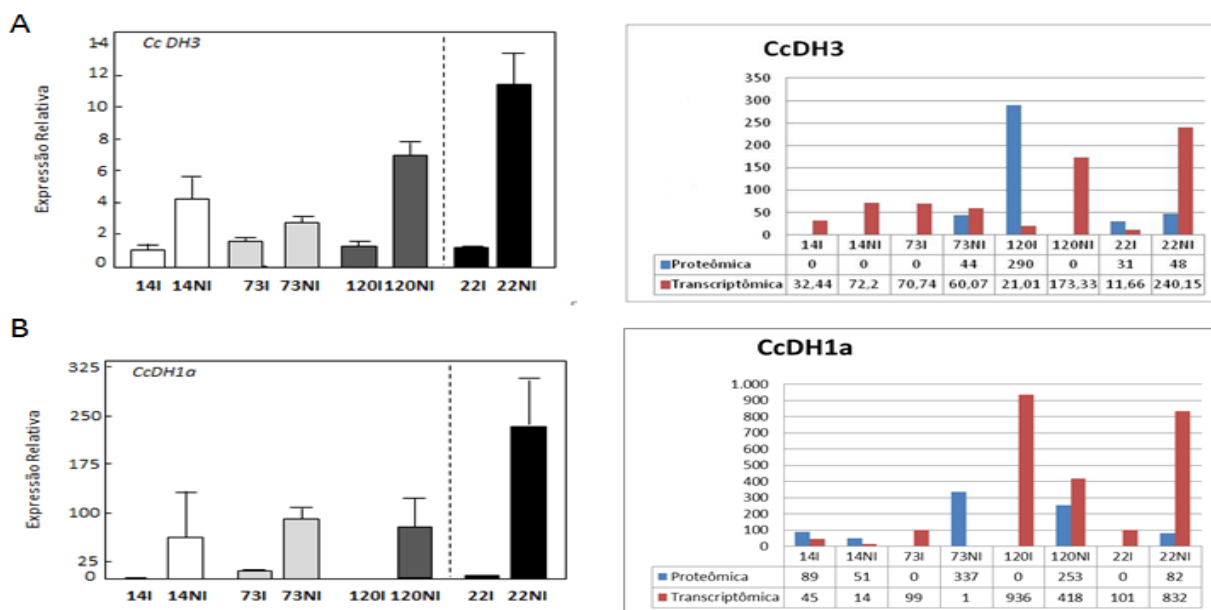


Figura 1. Gráficos comparativos de análises de expressão gênica por qPCR em tempo real (Painel esquerdo) e de expressão protéica e *in silico* das desidrinas CcDH3 (Figura 1A) e CcDH1a (Figura 1B) expressas em raízes de *C. canephora*. Para as três análises os valores de expressão relativa foram padronizados com base nos valores de quantificação da Ubiquitina.

CONCLUSÃO

Resultados preliminares das análises integradas de expressão gênica obtidos por sequenciamento 454 e qPCR, indicam uma boa correlação dos resultados, com algumas exceções. Divergências de resultados também foram observados nas correlações entre os dados de expressão e proteômica, indicando que a técnica de análises do perfil proteico a partir de extratos totais tripsinizados, ainda necessita de aprimoramento, principalmente no que tange à dados quantitativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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*, 25 (12): 1263-1274. (2006).
- ALVARENGA, S. M. *et al.* *In silico* identification of coffee genome expressed sequences potentially associated with resistance to diseases. *Genetics and Molecular Biology*, 33, (4):795-806. (2010).
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F.; SEVERINO, F. E.; MALUF, M. P.; MAIA, I. G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology*, 10 (1): 1-11. (2009).
- DAMATTA F.M. E RAMALHO J.D.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 55-81. (2006).
- FREIRE, L. P. Análise de polimorfismos nucleicos e estudo da expressão de genes candidatos para a tolerância à seca em cafeeiro. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal), *Universidade Federal de Lavras*. (2010).
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION – ICO. Trade Statistics. Disponível em: http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics. Acesso em 20 de agosto de 2013.
- MARRACCINI, P. *et al.* RBCS1 expression in coffee: *Coffea orthologs*, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. *BMC Plant Biology*, 11. (2011).
- SUSSULINI, A. *et al.* Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchimica Acta*, 158: 173-180. (2007).

VIEIRA et al. Different Molecular Mechanisms Account for Drought Tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. *Tropical Plant Biology*. (2013).