

CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES DE *Coffea* spp. VIA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM PLANTA MODELO

Larissa Girotto¹; Suzana Tiemi Ivamoto-Suzuki²; Fernanda Freitas de Oliveira³; Caroline Aryoshi⁴; Tiago Benedito dos Santos⁵; Luiz Filipe Protasio Pereira⁶

¹Doutoranda, MS, UEL, Londrina, PR, Brasil, larissagirotto@yahoo.com.br

²Pós-doutoranda, PhD, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil, profsuzanatiemi@gmail.com

³Doutoranda, MS, UEL, Londrina, PR, Brasil, fernandafreitasdeoliveira92@gmail.com

⁴Doutoranda, MS, UEL, Londrina, PR, Brasil, carolineariyoshi@hotmail.com

⁵Professor, PhD, Unoeste, Presidente Prudente, Brasil, tiagobio02@yahoo.com.br

⁶Pesquisador, PhD, Embrapa-café, Campinas, Brasil, filipe.pereira@embrapa.br

RESUMO: As mudanças climáticas globais têm causado danos a produtividade agrícola cafeeira com impactos econômicos e sociais, e apresentam o potencial de reduzir áreas disponíveis para o plantio de cafeeiros. Diante deste cenário foi investigado o potencial do promotor da galactinol sintase (*GolS*) do gênero *Coffea*, que catalisa a primeira etapa da via de síntese de oligossacarídeos da família da Rafinose, cujo acúmulo ocorre principalmente em resposta a estresses abióticos. Entender a estrutura e composição de sequências gênicas promotoras de cafeeiros é de fundamental importância para compreender melhor os mecanismos genéticos e os processos de regulação da expressão gênica induzidos em períodos de estresse hídrico e salino. Neste estudo identificamos 14 promotores *GolS* presentes nos genomas de *Coffea arabica*, *C. canephora* e *C. eugenoides*. Dentro das regiões promotoras desses genes, foram observados 12 *cis*-elementos relacionados a regulação de genes em resposta a condições adversas, dentre eles: ARE, ABRE, MYB e STRE. Após a caracterização *in silico* dos 14 promotores, o promotor da isoforma de *GolS3* (*CcGolS3*) de *Coffea canephora* (Cc) foi clonada com o objetivo de verificar o seu comportamento frente a estresses abióticos. Plasmídeos contendo a construção *pCcGolS3::GUS* (gene repórter da β -glucuronidase) foram inseridos em *Arabidopsis thaliana* via transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*. A coloração histoquímica do gene repórter *GUS* foi verificada em todos os tecidos de *A. thaliana* transformadas. Para analisar o comportamento deste promotor, as plantas de *A. thaliana* foram submetidas a estresses hídrico e salino *in vitro* (0h, 12h, 24h e 48h), os seus respectivos RNAs foram extraídos e a síntese de cDNA foi realizada para a quantificação da atividade transcricional do gene repórter *GUS* via RT-qPCR. Os nossos resultados indicaram que o promotor de *CcGolS3* pode ser caracterizado como do tipo estresse-induzido, visto que o perfil transcricional do gene *GUS* diretamente proporcional ao tempo de duração dos estresses. O promotor do gene *CcGolS3* apresenta um grande potencial para ser utilizado em projetos futuros de melhoramento genético de cafeeiros e obtenção de plantas mais tolerantes a estresses abióticos.

PALAVRAS-CHAVE: café, promotor, galactinol sintase, mudanças climáticas, estresse abiótico.

CHARACTERIZATION OF COFFEE PROMOTERS VIA GENETIC TRANSFORMATION IN MODEL PLANT

ABSTRACT: Global climate change has decrease coffee crop productivity with economic and social impacts, and has the potential to reduce areas available for coffee production culture. In this scenario, the potential of the *galactinol synthase* (*GolS*) promoter of *Coffea* spp., which catalyzes the first stage of the synthesis pathway of the raffinose family of oligosaccharides, whose accumulation occurs mainly in response to abiotic stresses, was investigated. Understanding the structure and composition of coffee promoter gene sequences is of fundamental to better understand the genetic mechanisms and processes of gene expression regulation induced in periods of drought and salt stress. We analyses 14 *GolS* promoters present in the genomes of *Coffea arabica*, *C. canephora* and *C. eugenoides*. Those promoters presented, 12 *cis*-elements related to gene regulation in response to adverse conditions were observed, including: ARE, ABRE, MYB and STRE. Subsequently *in silico* characterization of the 14 promoters, the *Coffea canephora* (Cc) *GolS3* (*CcGolS3*) isoform promoter was cloned in order to verify its role against abiotic stresses. Plasmids containing the *pCcGolS3::GUS* construct (β -glucuronidase reporter gene) were introduced into *Arabidopsis thaliana* via genetic transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. Histochemical assays of the *GUS* reporter gene was verified in *A. thaliana* tissues. To analyze the behavior of this promoter, *A. thaliana* plants were subjected to drought and salt stresses *in vitro* (0h, 12h, 24h and 48h), their respective RNAs were extracted and cDNA synthesis was performed to quantify the transcriptional activity of the *GUS* reporter gene via RT-qPCR. Our results indicated that the *CcGolS3* promoter can be characterized as stress-induced, since the transcriptional profile of the *GUS* gene is directly proportional to the period of stress. The *CcGolS3* gene promoter has great potential to be used in future coffee breeding projects and to obtain more abiotic stress tolerant plants.

KEY-WORDS: coffee, promoter, *galactinol synthase*, climate change, abiotic stress.

INTRODUÇÃO

O café é uma das principais *commodities* agrícolas dos países em desenvolvimento, sendo o Brasil seu maior produtor e exportador. O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae e inclui aproximadamente 124 espécies (Davis et al., 2011), com especial relevância para *C. arabica* e *C. canephora*.

As mudanças climáticas globais determinam fortemente a produtividade agrícola e causam impactos econômicos e sociais, podendo ocorrer a redução em áreas disponíveis para plantio do gênero *Coffea*. Dentre os estresses que mais influenciam o desenvolvimento vegetal, o estresse hídrico afeta as funções fisiológicas e bioquímicas em todas as fases do ciclo de crescimento do café. A transformação genética visando o aumento da tolerância a estresse hídrico é uma das estratégias que pode ser empregada diante desse cenário de mudanças climáticas. Com isso, a identificação de regiões promotoras e a caracterização de genes relacionados aos mecanismos de resposta a condições adversas é de fundamental importância para o sucesso e o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas.

A região codificadora de proteína de cada gene é regulada por uma região promotora única e específica. A caracterização funcional desta região é interessante pois pode-se direcionar a expressão de um transgene para um determinado órgão, tecido e/ou condição ambiental específica, e com isso, otimizar a resposta da planta para enfrentar diversos tipos de estresses. Os oligossacarídeos da rafinose (RFOs) são produzidos em maiores quantidades e acumulados quando a planta é submetida a situações de estresse abiótico, essas proteínas conferem osmoproteção às plantas. A galactinol sintase (*Gols*) é um dos principais genes envolvidos na biossíntese de RFOs.

Neste trabalho, foi realizada a caracterização de um promotor do gene *Gols*, específico de *Coffea* spp. Foi analisada *in silico* a arquitetura promotora através dos papéis dos *cis*-elementos identificados nos promotores *Gols* específicos de café, localizados nos genomas disponíveis de *Coffea* spp. Discutimos os principais *cis*-elementos encontrados nos promotores *Gols* de *Coffea* spp. envolvidos na regulação da transcrição das respostas de defesa e estresse nas plantas. Em seguida, foram transformadas plantas geneticamente modificadas de *A. thaliana* empregando o promotor *Gols*, isoforma de *C. canephora*, fusionados ao gene repórter *GUS*. Verificou-se a expressão do gene *GUS* através de experimentos de estresse abiótico, para prova de conceito e correlacionar um papel de tolerância desse promotor frente a situações de estresses.

MATERIAL E METODOS

Sequências das regiões promotoras do *Gols*s (a montante -2000 do códon de iniciação), foram selecionadas do genoma de *C. canephora* (Denoëud et al., 2014), disponível no *Coffee Genome Hub* (<http://coffee-genome.org/>), Genoma de *C. arabica* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) disponível em *Coffea arabica* UCDv 0.5. e *C. eugenoides* (dados não publicados), gentilmente cedidos pelo Consórcio do Genoma do Café Arábica (ACGC Consortium). Sequências *Gols* foram selecionadas nos bancos de dados *Coffee Genome Hub* e *Phytozome* através de pesquisa por palavras-chave. Para *C. eugenoides*, usamos *galactinol sintases* já caracterizadas funcionalmente em *Arabidopsis* como sequências isca, para identificar suas respectivas regiões promotoras.

A presença e a frequência dos *cis*-elementos relacionados à resposta de defesa e estresse, resposta hormonal, regulação de luz, expressão tecidual e outros motivos foram analisados utilizando o PlantCARE (Plant Cis-Actin Regulatory Element) (Lescot et al., 2002). Plantas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia 0) foram transformadas via *A. tumefaciens* (EHA105), contendo o promotor *Gols*, isoforma de *C. canephora* (Cc02_35360) (*pCcGols3::GUS*), através do método adaptado de aspersão + vácuo infiltração (Chung et al., 2000; Clough et al., 2005; Tangué & Mantis, 2006).

Para avaliar *in vitro* o estresse hídrico, nas plantas de *A. thaliana pCcGols3::GUS* (terceira geração de transformantes), utilizou-se o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) (pH 5,6), suplementado com o agente osmótico, polietilenoglicol (PEG) 8000, nas concentrações de 10%, 20% e 30%. Plantas com um mês, foram transferidas para as diferentes concentrações de PEG e mantidas em câmara de crescimento (16 horas de luz/dia e temperatura de 22 ± 2°C) por 12, 24 e 48 horas de incubação. Para simular efeito de estresse salino, equivalente protocolo foi utilizado, com o meio MS (pH 5,6), suplementado com o agente estressante, cloreto de sódio (NaCl), nas concentrações de 50 mM, 100 mM e 250 mM.

Para confirmação da inserção do promotor *pCcGols3::GUS* nas plantas transformadas de *A. thaliana*, amostras coletadas foram imersas em solução de X-Gluc (Jefferson et al., 1987) e o DNA genômico das plantas foi extraído (Doyle & Doyle, 1987) e usado na reação de PCR convencional com três pares de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam a construção *pCcGols3::GUS*.

O perfil de atividade transcricional foi avaliado através da metodologia de PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) com a utilização do equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e seguindo protocolos previamente descritos para cafeeiros (Ivamoto et al., 2017).

RESULTADOS

Foram encontrados 14 promotores *Gols* nos genomas estudados. Sete no genoma de *C. canephora*, quatro em *C. arabica* e três em *C. eugenoides* (Fig. 1). Os *cis*-elementos foram classificados em cinco categorias de processos biológicos. Em todos os promotores, a maioria dos motivos encontrados foram relacionados às respostas de defesa e

estresse, confirmando a possibilidade deste promotor ser estresse-induzido. Em seguida, presentes em todos os promotores, em menor número, estavam relacionados à resposta hormonal, seguido de regulação de luz, observado em 12 promotores.

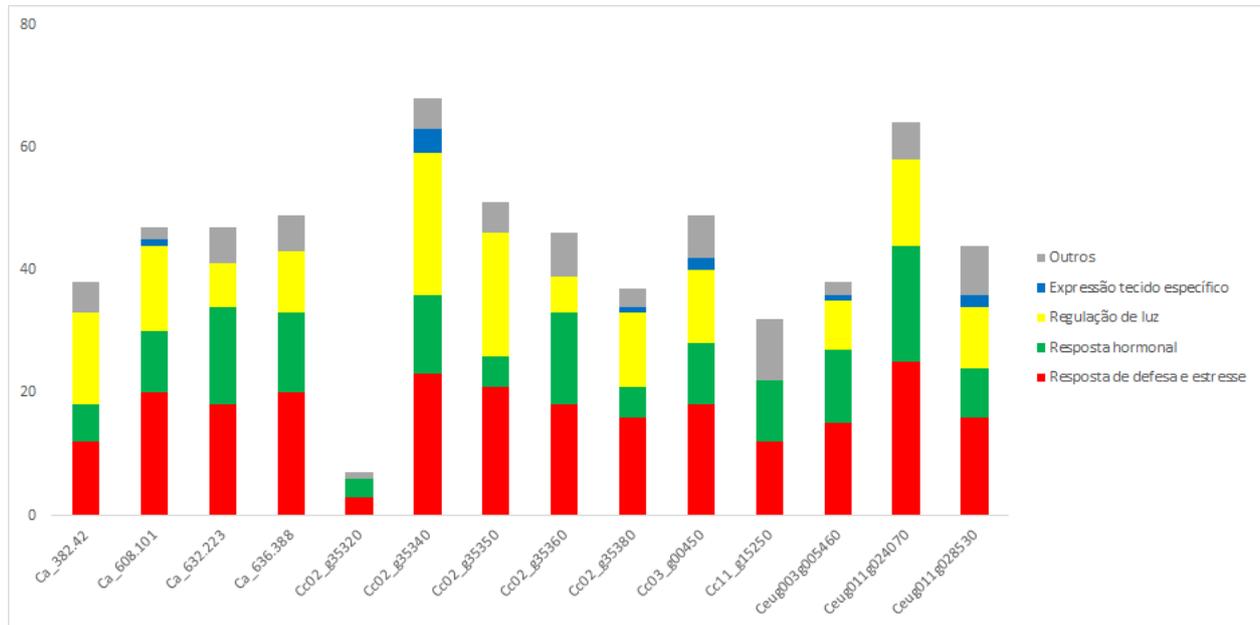


Figura1. Representação gráfica do número de cis-elementos encontrados nos promotores *Gols* de *Coffea* spp. Os promotores foram agrupados de acordo com suas funções relacionadas a partir do banco de dados de promotores de plantas PlantCARE [3]. (Cc - *Coffea canephora*; Ca - *C. arabica* e Ceug - *C. eugenioides*).

A Tabela 1 apresenta os 12 tipos de cis-elementos relacionados a função de defesa e estresse apresentados através das análises com PlantCARE. Todos os promotores apresentaram três ou mais motivos dentro desta categoria. O MYB foi o motivo mais abundante relacionado ao estresse, presente em todos os promotores com 3 a 11 cópias. O ácido abscísico (ABA) é um regulador chave da adaptação, resposta e tolerância da planta, regulando a expressão de muitos genes sob estresse hídrico, níveis de salinidade, ataque patogênico e resposta a condições ambientais em constante mudança (Cheng et al., 2017, 2018). Isto sugere um possível papel da sinalização ABA a montante do gene *Gols*.

Seguido pelo cis-elemento ARE (12 promotores), e pelo WUN-motif (11 promotores). MBS, STRE e W-Box foram encontrados em nove dos 14 promotores *Gols*, ABRE em sete promotores e TC-rich repeats cinco promotores. Cis-elementos DRE e LTR o foram localizados em quatro promotores e GC-motif em três.

Tabela 1. Número de cis-elementos relacionado a estresse em promotores do gene *Gols* de *Coffea*.

Promotor (ID)	ABRE (s)	ARE	CARE	DRE	GC-motif	LTR	MBS	MYB	STRE	TC-rich repeats	W-Box	WUN-motif	Total
Ca_382.42	6					1		3				1	11
Ca_608.101		3	1	1	1	1		6	3	1	1	2	20
Ca_632.223		6			1		1	3	4		1	2	18
Ca_636.388		5					2	7	3		1	2	20
Cc02_g35320		1						2					3
Cc02_g35340	4	2		1		1	2	11		1		1	23
Cc02_g35350	7	1		1				6		1	1	1	18
Cc02_g35360		6			1		1	3	4		1	2	18
Cc02_g35380	3	4						1	3	1		1	14
Cc03_g00450	2							1	9	2	1	2	17
Cc11_g15250		2						1	8			1	12
Ceug003g005460	1	4						1	7	1	1	1	16
Ceug011g024070	2	6						1	11	1		2	24
Ceug011g028530		1	1	1		1		5	4			2	15
Total	25	41	2	4	3	4	11	84	23	5	10	17	

Para caracterização *in vitro* e *in vivo*, clonamos o promotor do gene *CcGols3*, que é um ortólogo ao previamente descrito em *C. arabica* (*CaGols3*) (dos Santos et al., 2011). O promotor seguido pelo gene repórter *GUS* foi transformado em plantas de *A. thaliana*. Caracterizamos a resposta da região promotora do gene da *galactinol sintase* de *C. canephora* (*CcGols3*) para resposta a estresse hídrico, em simulações com meio de cultura contendo PEG e NaCl. Nas concentrações intermediárias dos agentes estressantes, evidenciaram que as plantas transgênicas de *A. thaliana* (PEG 20%) apresentaram uma redução no número de transcritos em 12 horas de tratamento, em relação as plantas controle. Após 24 horas, os níveis transcricionais de *GUS* aumentaram em relação ao período de 12 horas, e foram semelhantes aos níveis observados nas plantas controle. Com 48h de exposição ao estresse, as plantas aumentaram quase três vezes os níveis transcricionais do gene *GUS*, em relação ao período de 24 horas. Esses resultados evidenciam que o gene *GUS* foi diferencialmente expresso com o aumento de 48 horas de tempo de estresse (Fig. 2- a). Para o estresse salino médio de 100 mM, foi possível perceber a diferença entre níveis de transcritos do gene *GUS*, onde houve uma expressão crescente entre 12 e 48 horas de tratamento. Esta expressão apresenta uma maior diferença entre os tratamentos de 48 horas em relação ao controle (Fig. 2- b).

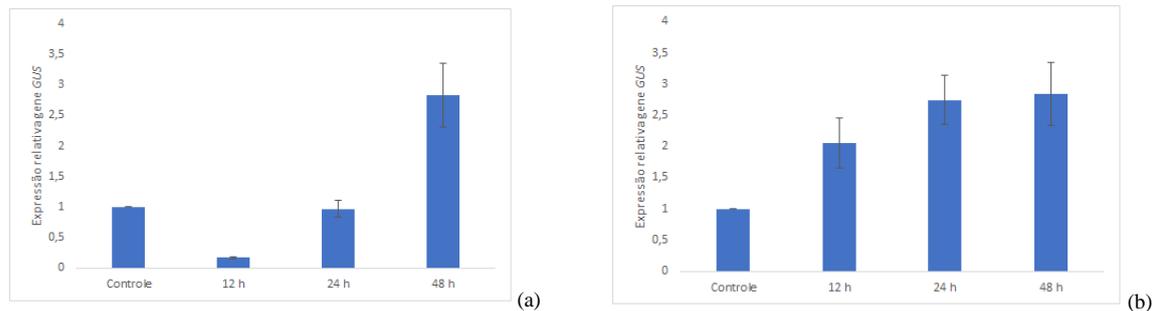


Figura 2. Expressão relativa do gene *GUS* com o promotor *CcGols3* em plantas de *A. thaliana*. Submetidas a estresse hídrico *in vitro* (PEG 20%) (a). Submetidas a estresse salino *in vitro* (NaCl 100 mM) (b).

Nos experimentos de estresse abióticos realizados, a expressão histoquímica de *GUS* foi avaliada e revelou forte sinal, com coloração positiva em diferentes tecidos e regiões, em todas as plantas de *A. thaliana*, com um mês de idade, contendo a construção *pCcGols3::GUS*, conforme observados nas Figura 3 e 4. Apesar do promotor *CcGols3* apresentar-se como um bom candidato para regular os transcritos de genes relacionados ao aumento da tolerância das plantas frente a estes estresses, onde ocorreu um aumento da expressão genica, faz-se necessário mencionar que também foi observado a expressão do gene *GUS* nas plantas controle. Provavelmente, o promotor *CcGols3* tem uma ação *leaky*, induzindo transcritos, em um nível menor, sem a presença de estresse.

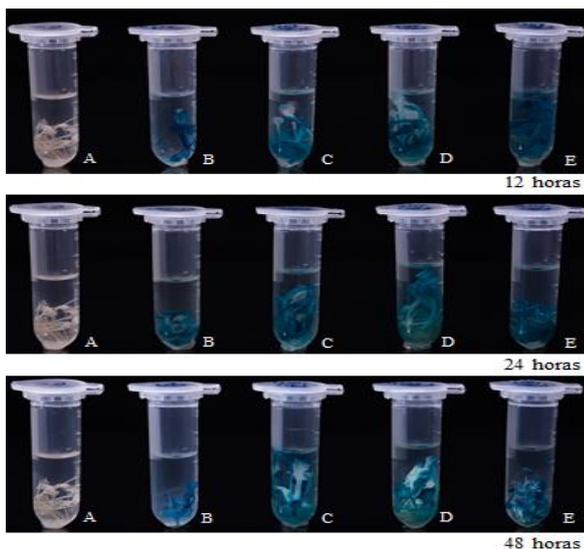


Figura 3. Expressão de *GUS* dirigida pelo promotor do gene *CcGols3* de *Coffea* no experimento de estresse hídrico *in vitro* (PEG).

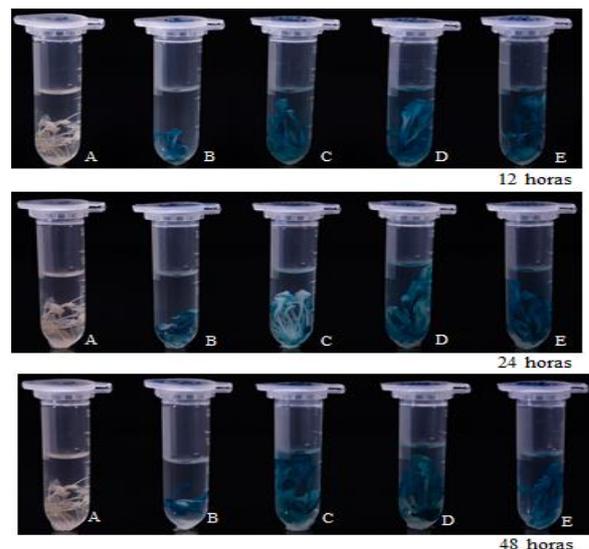


Figura 4. Expressão de *GUS* dirigida pelo promotor do gene *CcGols3* de *Coffea* no experimento de estresse salino *in vitro* (NaCl). Controle negativo (planta não transformada (A)), controle positivo (0 horas (B)), 12 horas (C), 24 horas (D), 48 horas (E) de estresse.

CONCLUSÃO

1. Nossos estudos levaram à descoberta dos principais *cis*-elementos, associados aos promotores estresse-induzido, fornecendo uma visão estrutural dos promotores *GolS* do gênero *Coffea* spp.;
2. Esta observação sugere que o promotor *GolS* desempenha um papel importante na resposta da planta ao ABA e estresses abióticos, evidenciando o seu potencial uso como um promotor estresse-induzido;
3. Indicamos que este é um promotor estresse-induzido, por possuir atividade de respostas a estresses abióticos, como nos experimentos de estresse hídrico e salino, apesar de apresentar uma atividade *leaky* em plantas de *A. thaliana*.
4. Estes resultados auxiliam na compreensão do promotor *CcGolS3* onde em futuros trabalhos, poderá se tornar um sistema para expressão de genes em cafeeiros visando uma diminuição de danos causados por estresses abióticos.

AGRADECIMENTO

Ao Consórcio Pesquisa Café, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, e as instituições UEL, IAPAR e EMBRAPA-CAFÉ colaboradoras deste projeto.

REFERÊNCIAS

- CHENG, C. et al. *SCFA1PP2-B11* modulates ABA signaling by facilitating SnRK2.3 degradation in *Arabidopsis thaliana*. PLOS Genetics, v. 13, n. 8, p. e1006947, ago. 2017.
- CHENG, C. et al. The Soybean GmNARK Affects ABA and Salt Responses in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in plant science, v. 9, p. 514, 2018.
- CHUNG, M. H.; CHEN, M. K.; PAN, S. M. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. Transgenic Research, v. 9, n. 6, p. 471–476, 2000.
- CLOUGH, S. J. Floral Dip: *Agrobacterium*-Mediated Germ Line Transformation. In: Peña, L. (Ed.). Transgenic Plants: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press v. 286, p. 91–101, 2005.
- DAVIS AP, et al. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. Bot J Linn Soc, v. 167, p.357–377, 2011.
- DENOEUDE F, et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. Science, v. 345, n.6201, p.1181-1184, 2014.
- DOS SANTOS TB, et al. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. Plant Physiology and Biochemistry, v. 49, n. 4, p. 441–448, 2011.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, v.19, n. 11–15, 1987.
- IVAMOTO ST, et al., Transcriptome analysis of leaves, flowers and fruits perisperm of *Coffea arabica* L. reveals the differential expression of genes involved in raffinose biosynthesis. PloS one, v. 12, n. 1, p. e0169595, 2017.
- JEFFERSON, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. *GUS* fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO journal, v. 6, n.13, p. 3901–3907, 1987.
- LESCOT, M. et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Research, v. 30, n. 1, p. 325-7, 2002.
- MURASHIGE, T, SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, Copenhagen, v. 15, n.3, p.473-497, 1962.
- TAGUE, B. W.; MANTIS, J. In Planta *Agrobacterium*-Mediated Transformation by Vacuum Infiltration. In: Salinas, J.; Sanchez-Serrano, J. J. (Eds.). *Arabidopsis* Protocols. Totowa, NJ: Humana Press. V. 323, p. 215-23, 2006.