

EXPRESSÃO DE MICRORNAS POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA RESPOSTA A ELEVADAS TEMPERATURAS EM CAFEIEIRO¹

Kellen Kauanne Pimenta de Oliveira²; Luiza Diehl Sperandio³; Christiane Noronha Fernandes-Brum⁴; Bárbara Castanheira Ferrara-Barbosa⁵; Gabriel Lasmar Reis⁶; Antonio Chalfun Júnior⁷

¹Trabalho financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café – INCT Café

²Doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, kauannepi@hotmail.com

³Agrônoma, Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, luh_sperandio@hotmail.com

⁴Doutora em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, chrisbioufla@gmail.com

⁵Doutora em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG, lfmp.dbi@ufla.br

⁶Mestrando em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, gabrielasmarreis@hotmail.com

⁷Professor Associado III, Universidade Federal de Lavras, chalfunjunior@ufla.br

RESUMO: Brasil é o maior produtor de café do mundo e também maior exportador. O cafeeiro é bastante suscetível às condições ambientais como oscilações na temperatura e distribuição de chuva, e também pelo fotoperíodo. Com a estimativa de aumento da temperatura global se fazem necessários estudos que visem compreender os mecanismos de regulação das plantas de café às condições estressantes e assim buscar melhorá-las geneticamente. Um dos mecanismos de regulação gênica pós transcricional são os microRNAs que possuem de 20 a 24 nucleotídeos, e em plantas os microRNAs estão envolvidos em rotas de tolerância ao estresse, além de serem reguladores de genes de crescimento, desenvolvimento e florescimento em condições de estresse. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de microRNAs envolvidos na tolerância a altas temperaturas em cafeeiro. Foram comparadas duas cultivares de *Coffea arabica*, Catuaí IAC e Acauã, que se supõe diferirem na tolerância ao calor, cultivadas nas cidades de Varginha e Pirapora, que apresentam amplitudes térmicas diferentes. Pudemos observar que a expressão de ambos os microRNAs não diferiram entre as cultivares, e ambos foram menos expressos na cidade de Pirapora que apresentou temperaturas mais elevadas também no período noturno, ou seja, menor amplitude térmica entre dias e noites.

PALAVRAS-CHAVE: microRNAs, *coffea arabica*, estresse térmico.

MICRORNAS EXPRESSION THAT ARE POTENTIALLY INVOLVED IN RESPONSE OF HIGH TEMPERATURE IN COFFEE PLANTS

ABSTRACT: Brazil is the largest coffee producer in the world and also the largest exporter. The coffee tree is very susceptible to environmental conditions such as fluctuations in temperature and rainfall distribution, and also by photoperiod. With the estimation of global temperature increase, studies are necessary to understand the mechanisms of regulation of coffee plants to stressful conditions and thus seek to improve them genetically. One of the mechanisms of post-transcriptional gene regulation is microRNAs that have 20 to 24 nucleotides, and in plants microRNAs are involved in stress tolerance pathways, as well as regulating growth, development and flowering genes under stress. The objective of this work was to analyze the expression of microRNAs involved in high temperature tolerance in coffee. We compared two cultivars of *Coffea arabica*, Catuaí IAC and Acauã, which are supposed to differ in heat tolerance, grown in the cities of Varginha and Pirapora, which have different thermal amplitudes. We could observe that the expression of both microRNAs did not differ between the cultivars, and both were less expressed in Pirapora city which presented higher temperatures also at night, that is, lower temperature range between days and nights.

KEY WORDS: microRNAs, *coffea arabica*, heat stress.

INTRODUÇÃO

As variações climáticas são alguns dos fatores que mais influenciam na produção de grãos de café no Brasil. O cafeeiro é fortemente influenciado pelos parâmetros climáticos, pois estes afetam de diferentes formas as fases de crescimento e desenvolvimento da cultura (CAMARGO, 2010). O relatório de avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2014) prevê um aumento da temperatura média da superfície de 2,0 a 4,5 ° C até o final deste século, portando é de extrema importância a busca por ferramentas que favoreçam a tolerância dos cafeeiros a estas novas condições climáticas, sendo uma dessas ferramentas o melhoramento genético de plantas. Os microRNAs (microRNAs) são pequenas moléculas de RNA, de 21-24 nucleotídeos (KIM, 2005). Eles são incorporados a um complexo de proteínas, e são guias para a clivagem ou repressão da tradução de seus RNAs mensageiros complementares, atuando na regulação gênica pós transcricional (BARTEL, 2004). Atualmente, diversos estudos identificaram como a expressão de diversos microRNAs se comportam mediante à estresses abióticos como salinidade, frio, condições de seca e elevadas temperaturas (LIU et al., 2008; LAUBINGER et al., 2010; WANG et al., 2016), sugerindo que os microRNAs possam ser um novo alvo para melhorar a tolerância das plantas em condições adversas (ZHANG, 2015). Então é de extrema importância compreender melhor a atuação desses microRNAs envolvidos nas

respostas à estresse térmico, portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de dois microRNAs, nas cultivares Catuaí IAC 144 e Acauã de *Coffea arabica*, cultivadas nas cidades de Varginha e Pirapora, que diferem entre si na amplitude térmica entre dias e noites. E assim observar como estes resultados podem trazer novas perspectivas para o aumento da tolerância através do melhoramento genético de plantas de café.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais vegetais utilizados foram provenientes do trabalho de Ferrara-Barbosa (2016), sendo duas cultivares de *Coffea arabica*, Catuaí IAC 144 e Acauã, que supostamente diferem na tolerância ao calor, cultivadas em dois locais diferentes, Pirapora e Varginha, nos meses de março e abril de 2015, em época de safra (Tabela 1). Em Pirapora, as plantas eram irrigadas por um pivô central, enquanto as plantas de Varginha dependiam apenas do regime de chuvas para abastecimento de água. Além disso, as plantas de café em ambos os campos experimentais tinham cerca de 7 anos de idade. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, sendo composto por três blocos, com três repetições biológicas cada um, com duas cultivares cultivadas em duas localidades com condições térmicas diferentes, totalizando 36 plantas. Gerou-se uma biblioteca de RNA-Seq do material vegetal proveniente do trabalho de Ferrara-Barbosa (2016) e segundo o protocolo de SOUZA GOMES, DE et al. (2011), foi possível a identificação dos precursores de microRNAs. Por meio de análises computacionais, identificou-se os microRNAs expressos na biblioteca de RNA-seq. Posteriormente, buscou-se na literatura dois dos microRNAs, presentes na biblioteca, que já foram identificados como responsivos à alteração da temperatura ambiental para a análise de suas expressões. Foram selecionados um microRNA da família miR396, sendo este o ccp-miR396a-5, e um microRNA da família miR828, o ccp-miR828-5p. As amostras foram constituídas por três folhas jovens e completamente expandidas de cada planta. A extração do RNA foi realizada utilizando o mirVana™ microRNA Isolation Kit seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e análise quanto à presença de contaminantes e foi feita a partir do espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare), também foi feita eletroforese em gel de agarose (0,7%). Sintetizou-se o DNA complementar (cDNA) a partir do método stem-loop RT-PCR descrito por Chen et al. (2005). A análise da expressão dos microRNAs escolhidos foi feita a partir do termociclador Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Qiagen), utilizando o sistema de detecção SYBR® Green. A análise da expressão relativa foi calculada utilizando o método descrito por Pfaffl (2001), utilizando os genes de referência 14 3 3 e RPL39.

Tabela 1. Abreviatura dos tratamentos (Ferrara Barbosa, 2016).

Abreviação	Descrição
PC1	Plantas de Catuaí cultivadas em Pirapora
PC2	Plantas de Acauã cultivadas em Pirapora
VC1	Plantas de Catuaí cultivadas em Varginha
VC2	Plantas de Acauã cultivadas em Varginha

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de dados coletados no trabalho de Ferrara-Barbosa (2016), podemos observar que nas cidades de Pirapora e Varginha, no mês de abril, as temperaturas não apresentam variação quanto ao período diurno, se mantendo próximas aos 32 °C. Porém quando avaliamos a temperatura noturna, Varginha apresentou uma queda maior de temperatura, 22,4 °C, enquanto que em Pirapora a temperatura diminuiu no período noturno em apenas 3,3°C (Figura 1).

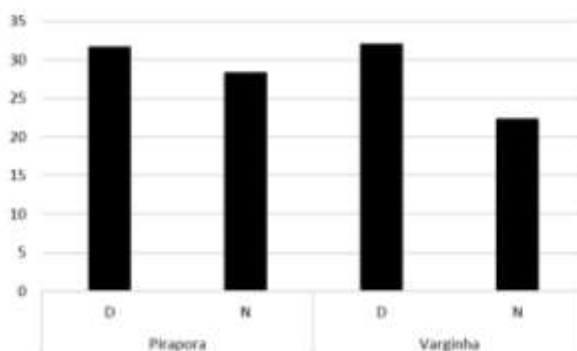


Figura 1. Avaliação das temperaturas, D= dia e N= noite, nas cidades de Varginha e Pirapora no mês de abril (adaptado de Ferrara-Barbosa, 2016).

A diferença de temperatura entre dias e noites, ou seja, o delta, é maior em Varginha, enquanto que em Pirapora a temperatura se mantém mais elevada durante a noite, variando poucos graus em relação ao período diurno (Figura 2).

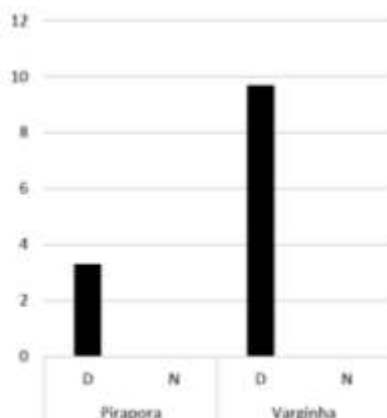


Figura 2. Delta entre temperaturas em °C, D=dia e N=noite, nas cidades de Varginha e Pirapora no mês de abril (adaptado de Ferrara=Barbosa, 2016).

A análise da expressão do ccp-miR396a-5p não apresentou diferença de expressão entre as cultivares. Porém, sendo a amostra calibradora a PC2, ambos foram aproximadamente três vezes menos expressos na cidade de Pirapora em relação a cidade de Varginha, sendo que em Pirapora as temperaturas continuavam elevadas também no período noturno para o mês de abril (Figura 3).

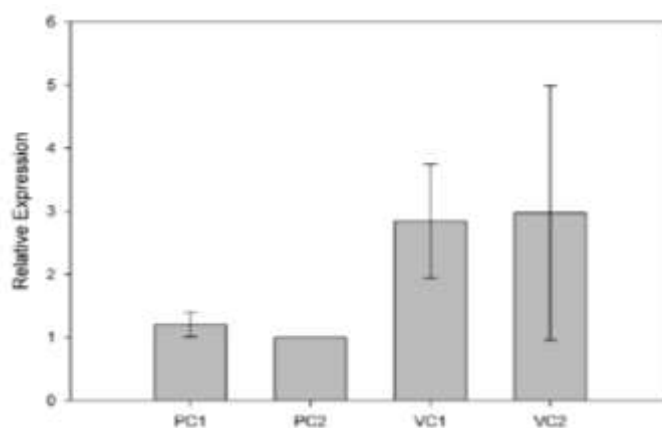


Figura 3. Expressão do microRNA396-5p nas duas cultivares e nos dois locais de cultivo

Plantas transgênicas de girassol expressando a forma resistente do HaWRKY6 ao seu regulador miR396, mostraram uma maior sensibilidade nas primeiras respostas a altas temperaturas. O estudo também revela que o miR396 exerce um possível papel na proteção em condições de elevadas temperaturas em girassol, uma planta particularmente bem adaptada a este tipo de estresse (GIACOMELLI et al., 2012). O ccp-miR396a-5p apresentou padrão semelhante ao descrito anteriormente em *Arabidopsis*, sua expressão foi reprimida em resposta a condições de calor, os miR396a-5p de *Arabidopsis* e de *C. arabica* apresentam a mesma sequência (LAUBINGER et al., 2010). O comportamento da expressão do ccp-miR828-5p foi semelhante ao ccp-miR396a-5p, não apresentando diferença de resultados entre as cultivares analisadas na cidade de Pirapora, sendo mais expresso na cidade de Varginha quando comparado com Pirapora. A amostra calibradora neste caso também foi a PC2, e observamos aumento na expressão em cinco vezes para a cultivar Catuaí e aproximadamente oito vezes para a cultivar Acauã (Figura 4).

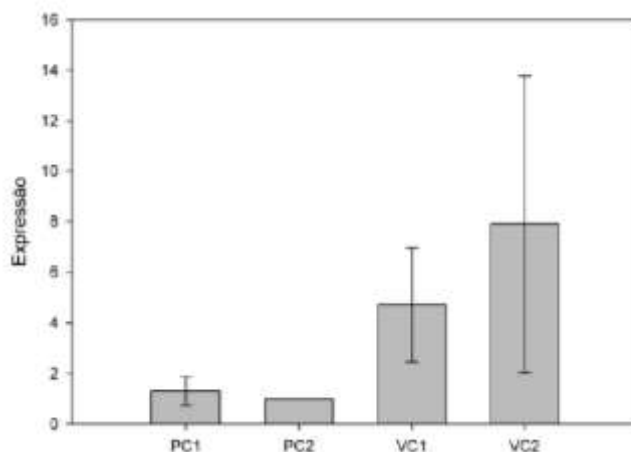


Figura 4. Expressão do microRNA828-5p nas duas cultivas e nos dois locais de cultivo.

Em resposta a condições de alta temperatura nos dias e noites na cidade de Pirapora, o miR828 apresenta baixa expressão, como o ocorrido em algodoeiro ao ser exposto a altas temperaturas (WANG et al., 2016), possivelmente o acúmulo do gene antes regulado por este microRNA, apresenta papel na tolerância da planta a elevadas temperaturas. A atuação do miR828 na regulação de genes envolvidos no desenvolvimento dos tricomas em *Arabidopsis* (GUAN et al., 2014), pode ser indício da participação deste microRNA no desenvolvimento de estruturas de tolerância ao calor e regulação da perda de água pelas plantas. Porém como em cafeeiro não há a presença de tricomas, este microRNA pode estar envolvido em processos de regulação a altas temperaturas ainda não descritos. Em maçã, diversos genes MYB foram descritos como potencialmente regulados pelo miR828, destes genes, muitos envolvidos em diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento de plantas (XIA et al., 2012) além de ser um fator de transcrição capaz de mediar respostas de hormônios envolvidos ao estresse (HIMMELBACH et al., 2003). Possivelmente, a expressão negativa destes microRNAs possa servir de parâmetro para constatar se as plantas de café estão sob condições de estresse térmico, devido a expressão ser semelhante entre as cultivares sob condições de altas temperaturas.

CONCLUSÕES

MiR396a e o miR828 não apresentaram diferença de expressão entre as duas cultivares de *C. arabica*, Catuaí IAC 144 e Acauã, mas foram diferencialmente expressos nas cidades de Varginha e Pirapora, sendo menos expressos na cidade de Pirapora que apresentou temperaturas elevadas também no período noturno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- CAMARGO, M. B. P. DE. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. *Bragantia*, v. 69, n. 1, p. 239–247, 2010.
- FERRARA-BARBOSA, B. C. Physiological and molecular characterization of two *Coffea arabica* cultivars under different heat stress conditions. 2016. 81 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- GIACOMELLI, J. I.; WEIGEL, D.; CHAN, R. L.; MANAVELLA, P. A. Role of recently evolved microRNA regulation of sunflower HaWRKY6 in response to temperature damage. *New Phytologist*, v. 195, n. 4, p. 766–773, 2012.
- GUAN, X.; PANG, M.; NAH, G.; et al. miR828 and miR858 regulate homoeologous MYB2 gene functions in *Arabidopsis* trichome and cotton fibre development. *Nature communications*, v. 5, p. 3050, 2014.
- HIMMELBACH, A.; YANG, Y.; GRILL, E. Relay and control of abscisic acid signaling. *Current opinion in plant biology*, v. 6, n. 5, p. 470–479, 2003. Elsevier.
- IPCC. Proceedings of the 5th assessment report, WGII, climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2014.
- KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 6, n. 5, p. 376, 2005.
- LAUBINGER, S.; ZELLER, G.; HENZ, S. R.; et al. Global effects of the small RNA biogenesis machinery on the *Arabidopsis thaliana* transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201012891, 2010. LIU, H.-H.; TIAN, X.; LI, Y.-J.; WU, C.-A.; ZHENG, C.-C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna*, v. 14, n. 5, p. 836–843, 2008.

SOUZA GOMES, M. DE; MUNIYAPPA, M. K.; CARVALHO, S. G.; GUERRA-SÁ, R.; SPILLANE, C. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Genomics*, v. 98, n. 2, p. 96–111, 2011.

WANG, Q.; LIU, N.; YANG, X.; TU, L.; ZHANG, X. Small RNA-mediated responses to low-and high-temperature stresses in cotton. *Scientific reports*, v. 6, p. 35558, 2016.

XIA, R.; ZHU, H.; AN, Y.; BEERS, E. P.; LIU, Z. Apple microRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome biology*, v. 13, n. 6, p. R47, 2012. BioMed Central.

ZHANG, B. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *Journal of experimental botany*, v. 66, n. 7, p. 1749–1761, 2015.