

## ANÁLISES DA EXPRESSÃO DOS GENES APX E CAPYL8A EM PROGÊNIES DE *Coffea Arabica* SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO<sup>1</sup>

Jacqueline de Oliveira Santos<sup>2</sup>; Meline de Oliveira Santos<sup>3</sup>; Luana Ferreira Torres<sup>4</sup>; Christiano de Souza Machado Matos<sup>5</sup>; Alessandro Botelho<sup>6</sup>; Alan Carvalho Andrade<sup>7</sup>; Gladyston Rodrigues Carvalho<sup>8</sup>; Vânia Aparecida Silva<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

<sup>2</sup>Bolsista Consórcio Pesquisa Café DSc, EPAMIG SUL, Lavras- MG, jack\_oliver3@hotmail.com

<sup>3</sup>Bolsista Consórcio Pesquisa Café, DSc, EPAMIG SUL, Lavras- MG, melineoli@hotmail.com

<sup>4</sup>Laboratório de Genética Molecular, UFLA, Lavras- MG, luanaferrreiratorres@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Bolsista Consórcio Pesquisa Café DSc, EPAMIG SUL, Lavras- MG, christianomatos@epamig.ufla.br

<sup>6</sup>Bolsista Consórcio Pesquisa Café DSc, EPAMIG SUL, Lavras- MG, alessandrobot@epamig.ufla.br

<sup>7</sup>Pesquisador, D.Sc., EMBRAPA CAFÉ, Lavras-MG, alan.andrade@embrapa.br

<sup>8</sup>Pesquisador, D.Sc., EPAMIG/URESM, Lavras-MG, carvalho@epamig.ufla.br

<sup>9</sup>Pesquisadora, DSc, EPAMIG/URESM, Bolsista BIPDT- FAPEMIG, Lavras- MG, vania.silva@epamig.br

**RESUMO:** Visando auxiliar na caracterização das respostas fisiológicas e moleculares de genótipos tolerantes à seca, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de genes APX e CaPYL8a em genótipos de *Coffea arabica* submetidos ao déficit hídrico em condições de campo. Os genótipos foram avaliados em sistema sequeiro (imposição do déficit hídrico a partir de 24 meses de idade) e sistema irrigado (plantas continuamente irrigadas com sistema de gotejamento). Foram realizadas avaliações de potencial hídrico e expressão de genes APX e CaPYL8a na época seca. Os dados foram submetidos às análises de variância. Os genótipos 7 e 19 apresentaram maiores e os genótipo 3 e 5 menores capacidade de manutenção do potencial hídrico. A expressão do gene CaAPX foi maior nos genótipos 3, 5, 7 em sistema irrigado. O genótipo 19 apresentou maior expressão da CaAPX na condição de sequeiro. Em relação ao gene CaPYL8a os genótipos apresentaram um padrão de expressão divergente entre os genótipos, sendo que os genótipos 3 e 19 apresentaram um aumento na expressão na condição de sequeiro. Os diferentes padrões de expressão dos genes candidatos APX e PYL8a sugerem regulação por mecanismos fisiológicos distintos, indicando maior tolerância ao estresse oxidativo e resposta ao déficit hídrico regulada positivamente pelo ABA no genótipo19.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estresse hídrico, enzimas antioxidantes, ácido abscísico.

## ANALYSIS OF APX AND CAPYL8A GENES EXPRESSION IN COFFEA ARABIC PROGENIES UNDER DROUGHT.

**ABSTRACT:** Aiming to characterize the physiological and molecular responses of drought tolerant genotypes. The objective of this work was to evaluate the expression of APX and CaPYL8a genes in *Coffea arabica* genotypes submitted to the water deficit under field conditions, aiming to characterize the physiological and molecular responses of drought - tolerant genotypes. The genotypes were evaluated in a dryland system (imposition of water deficit from 24 months of age) and irrigated system (plants continuously irrigated with drip system). Water potential and APX and CaPYL8a gene expression were evaluated in the dry season. Data were submitted to analysis of variance. Genotypes 7 and 19 presented higher and genotype 3 and 5 lower maintenance capacity of water potential. CaAPX gene expression was higher in genotypes 3, 5, 7 in irrigated. Genotype 19 showed higher expression of CaAPX in the dry state. In relation to the CaPYL8a gene the genotypes showed a divergent expression pattern among the genotypes, with genotypes 3 and 19 showing an increase in expression in the rainy season. The different expression patterns of the candidate genes APX and PYL8a suggest regulation by different physiological mechanisms, indicating greater tolerance to oxidative stress and response to the water deficit positively regulated by ABA in the genotype19

**KEY WORDS:** Water stress, antioxidant enzymes, abscisic acid.

## INTRODUÇÃO

Entre os vários fatores limitantes da produção do cafeeiro, o déficit hídrico ocupa posição de destaque (Damatta et al., 2018). Esse estresse ambiental interfere no desenvolvimento das culturas agrícolas, caracterizando-se como o fator que mais influência a produtividade da cultura do café, por ocasionar perturbações fisiológicas e morfológicas que prejudicam o seu desenvolvimento e o rendimento agrônomico (Alves, 2014). A magnitude dos efeitos do déficit hídrico nesta cultura sobre a produtividade está relacionada ao período, duração e intensidade de ocorrência desse fator e da capacidade genética da planta em responder as mudanças do meio (Silva et al., 2010).

Baseando nas futuras perspectivas climáticas e nos atuais eventos que já apresentam alterações na distribuição de chuvas com períodos secos atípicos, o programa de melhoramento do café tem avançado substancialmente na seleção de materiais com potencial tolerância à seca. As pesquisas que avaliam as respostas fisiológicas e moleculares dos

materiais genéticos têm auxiliado na indicação de mecanismos de resposta ao déficit hídrico e na identificação de estratégias de tolerância a seca.

Estudos fisiológicos indicam que capacidade de manutenção de potencial hídrico pode variar entre genótipos de café. Além disso, vários estudos moleculares já foram realizados em café, identificando genes candidatos em resposta à seca (GCs)(Marraccini et al., 2012; Vieira et al., 2013; Mofatto et al., 2016). Entre os genes identificados, o gene *CaPYL8a* é regulatório na via de sinalização de receptores de ABA, regulando positivamente a sinalização durante as respostas ao estresse abiótico. Outro gene que também está entre os GCs é aquele que codifica a enzima ascorbato peroxidase (APX), envolvida na detoxificação de peróxido de hidrogênio com função de proteger as células em condições de estresse.

Visando auxiliar na caracterização das respostas fisiológicas e moleculares de genótipos tolerantes à seca, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de genes APX e *CaPYL8a* em genótipos de *Coffea arabica* submetidos ao déficit hídrico em condições de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

A área experimental localiza-se em uma propriedade cafeeira localizada no Município de Diamantina, MG. Localizada a 17° 41' 23" S e 43° 24' 23" O, com altitude média na área do experimento de 880 m.

Os genótipos previamente selecionados pelo programa de melhoramento da EPAMIG foram disponibilizados em área com sistema de irrigação por gotejamento, no espaçamento de 3,8 x 0,8 m. O sistema de irrigação é gotejamento por gravidade, sendo os gotejadores de 2,3 l/h de vazão, espaçados a cada 75 cm. Os tubos gotejadores são abastecidos por um tubo de PVC de 75mm. A água é fornecida por uma represa local. A vazão do emissor é de 2,30l/h/m<sup>2</sup>, ou seja, 2,3 mm/h e o tempo de irrigação foi de aproximadamente de duas horas/dia. A irrigação foi feita de modo a repor a evapotranspiração da cultura fornecida por estação automática local.

A implantação do experimento com sistema irrigado e sequeiro foi realizada em plantas com 24 meses de idade. No sistema irrigado, as plantas continuaram a serem irrigadas com sistema de gotejamento. No sistema sequeiro as mangueiras de irrigação foram desconectadas nas faixas correspondentes para imposição do déficit hídrico durante todo período experimental. Ressalta-se que no sistema irrigado, conforme manejo adotado na fazenda, foi realizada a suspensão da irrigação para uniformização do florescimento por um período de 90 dias (julho a setembro).

As adubações nos tratamentos irrigados feitas por fertirrigação, e nos tratamentos sem irrigação, a fertilização foi realizada de maneira convencional com aplicação de superfície, sob a copa do cafeeiro, seguindo as recomendações realizadas na fazenda, de acordo com o manual de recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais (5ª aproximação).

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) foi determinado em folhas utilizando uma bomba de pressão (PMS Instruments- Plant Moisture- Modelo 1000 de acordo com Scholander et al., (1964). Todas as medidas foram feitas em folhas completamente expandidas de ramos plagiotrópicos do terço mediano das plantas, sempre na antemãnhã (entre 04h30min e 05h30min horas), afim, de evitar os efeitos inibitórios da luminosidade e da temperatura sobre o potencial hídrico. As medições foram realizadas na época seca, ou seja, 40 dias após a indução do déficit para uniformização do florescimento no sistema irrigado.

Para as análises moleculares foram selecionadas quatro progênies nas condições de irrigada e não irrigada, sendo contrastantes quanto a manutenção do potencial hídrico (progênies 7 e 19) e (progênies 3 e 5). Amostras armazenadas a -80°C foram pulverizadas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído seguindo as recomendações do manual do “Plant RNA Purification Reagent” (PRPR) (Invitrogen®), com algumas modificações. Aproximadamente 100mg de material vegetal pulverizado foi adicionado a 600  $\mu$ l de PRPR e então agitado em vórtex por 2 minutos. Os tubos foram deixados na horizontal por 10 min em temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C. Em novos tubos mantidos no gelo, foram adicionados 100  $\mu$ l de NaCl 5M, seguido de 650  $\mu$ l do sobrenadante e 300  $\mu$ l de clorofórmio. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e centrifugados a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo esse processo repetido mais uma vez. Um volume de 450  $\mu$ l do sobrenadante foi transferido para novos tubos e o mesmo volume de isopropanol foi acrescentado, sendo os tubos então misturados por inversão. As amostras foram mantidas em freezer -20°C por 75 minutos para precipitação dos ácidos nucleicos e em seguida centrifugadas a 13200 rpm por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, ao precipitado foram adicionados 600  $\mu$ l de etanol 75% e centrifugou-se a 13200 rpm por 7 minutos a 4°C. O etanol foi descartado, o precipitado foi colocado para secar a temperatura ambiente e em seguida foi ressuspenso em 20  $\mu$ l de água livre de RNase.

A quantificação do RNA foi realizada por meio de um NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A integridade do RNA foi aferida pela análise em gel de eletroforese a 1% de agarose corado com brometo de etídio. O DNA genômico contaminante foi eliminado das amostras de RNA pelo tratamento com RQ1 RNase-free DNase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese do cDNA foi feita com o ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) e oligo(dT 15) de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a síntese dos cDNAs, utilizando o protocolo recomendado para o Fast 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), os cDNAs preparados foram diluídos (1/10) e testados por qPCR usando pares de primers desenhados para os genes candidatos a serem estudados (Tabela 1). Para a qPCR, 1  $\mu$ L de cDNA diluído, 0,2  $\mu$ L de cada primer

(concentração final de 0,2µM na reação) e 2,5 µL do fluorocromo GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) foram utilizados em um volume final de 10 µL. O mix da reação foi incubado por dois minutos a 50° C, em seguida por cinco minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificação de três segundos a 95° C e 30 segundos a 60° C. Os dados foram analisados usando o *7500 Software v2.0.6* (Applied Biosystems) para determinar os valores de Ct (*Cycle Threshold*). A especificidade dos produtos gerados por cada par de primers foi verificada pela análise do tempo médio (Tm) de dissociação dos produtos amplificados. Os níveis de expressão gênica dos genes candidatos foram normalizados para o nível de expressão da ubiquitina (*CcUBQ10*) como uma referência constitutiva (Barsalobres-Cavallari et al., 2009). A expressão relativa foi quantificada pela aplicação da fórmula  $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct_{\text{gene alvo}} = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}}$  e  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gene alvo}} - \Delta Ct_{\text{calibrador interno}}$ . Como calibrador interno foi utilizado o genótipo 3 irrigado, com expressão relativa igual a 1. Os dados foram apresentados com a média  $\pm$  o erro padrão da média.

Tabela 1. Genes candidatos e *primers* correspondentes usados no experimento de qPCR.

Gene	<i>C. canephora</i>	Sequência (5' – 3')
<i>CaAPX1</i>		F: GACCTGAACAATGCCAGAAAG R: CGTAAATGAGCAGCAGGTGATG
<i>CaPYL8a</i>	Cc02_g01800	F: GGTTCGATCAGCCCCAGAAA R: CCACTTCCCTAAGGCTTCCAA

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As progênes de café cultivadas em sistema irrigado apresentaram um potencial hídrico até -1,12 MPa (Figura 1). Ao analisar os genótipos em sistema sequeiro, observou-se que os potenciais foram menores quando comparados ao irrigado, com exceção do genótipo 7. Destaca-se em sequeiro, os genótipos 7 e 19 com maior manutenção do status hídrico hidratado (-0,78 e -0,81 MPa, respectivamente). Dentre os genótipos com menor manutenção, os genótipos 3 e 5 foram selecionados para as análises de expressão de genes candidatos para tolerância a seca APX e CaPYL8a.

A expressão do gene CaAPX foi maior nos genótipos 3, 5, 7 em sistema irrigado do que em sistema sequeiro (Fig. 2). Por outro lado, a expressão relativa no genótipo 19 foi regulada positivamente pela seca, apresentando maior expressão na condição de sequeiro.

Em relação ao gene CaPYL8a os genótipos apresentaram um padrão de expressão divergente entre os genótipos (Figura 3). Os genótipos 3 e 19 apresentaram um aumento significativo na expressão na condição de sequeiro. Para o genótipo 5 a seca regulou negativamente a expressão, enquanto para o genótipo 7 não houve mudanças nos perfis de expressão entre irrigado e sequeiro. Maiores valores de expressão relativa do gene *CaPYL8a* foi observado no genótipo 3 na condição de sequeiro.

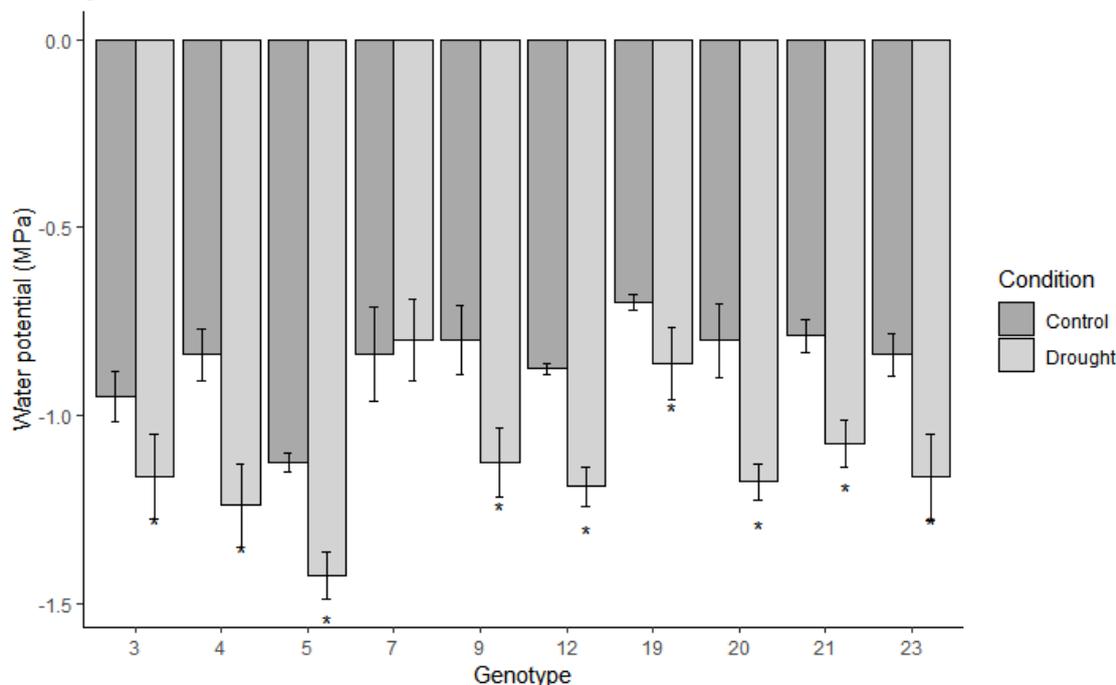


Figura 1. Potencial hídrico em diferentes genótipos de café, cultivados em condição irrigado e sequeiro. As barras seguidas pela \* diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).

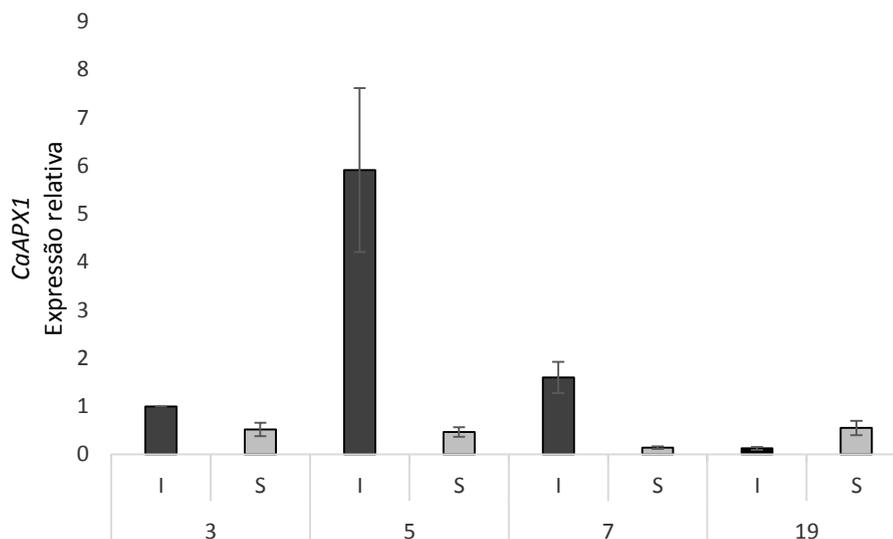


Figura 2. Perfil de expressão do genes *APX1* em folhas de genótipos de *C. arabica* (3, 5, 7 e 19) em sistema irrigado (I) e sequeiro (S). A abundância dos transcritos foi normalizada usando a expressão do gene *CaUBQ10* como um controle endógeno. Os resultados foram expressos usando 3I como a amostra de referência (Expressão relativa =1). Valores de três replicatas técnicas foram apresentados como médias  $\pm$  SE (barras).

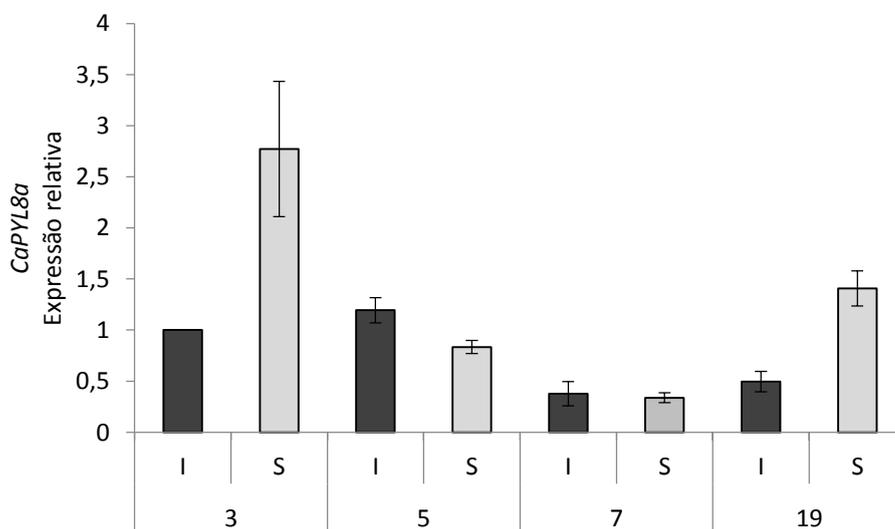


Figura 3. Perfil de expressão do gene *CaPYL8a* em folhas de *C. arabica* (3, 5, 7 e 19) em sistema irrigado (I) e sequeiro (S). A abundância dos transcritos foi normalizada usando a expressão do gene *CaUBQ10* como um controle endógeno. Os resultados foram expressos usando 3I como a amostra de referência (Expressão relativa =1). Valores de três replicatas técnicas foram apresentados como médias  $\pm$  SE (barras).

De maneira geral, ao analisar o potencial hídrico, pode-se observar que, as variações analisadas, relacionam-se com as condições em que as plantas foram cultivadas. Os genótipos que apresentaram um maior potencial hídrico em sistema irrigado, contudo nesse sistema havia um corte da irrigação a 40 dias, realizado por ocasião da uniformização do florescimento, o que justifica os valores próximos a -1 MPa. Maiores diferenças entre os genótipos foram observadas em sistema sequeiro, onde foi possível verificar que as progênies 7 e 19 exibiram uma maior manutenção deste parâmetro quando comparados aos demais. Diante de tal observação, pode-se observar que esses genótipos, mesmo em condições de tensões abióticas, apresentaram, de uma forma geral, uma manutenção da turgescência das células.

Os diferentes padrões de expressão dos genes candidatos observados foram dependentes da sistema de cultivo e indicam que mecanismos fisiológicos distintos regulam a resposta ao déficit hídrico nesses genótipos. Na condição irrigada, onde o déficit hídrico foi imposto somente da fase de uniformização do florescimento, a expressão da APX foi maior do que no sequeiro para as progênies sensíveis (3 e 5) e para a tolerante (7). A APX é uma enzima envolvida na detoxificação de peróxido de hidrogênio com função de proteger as células sob condições estressantes. Nesses

genótipos, a expressão diferencial do gene APX pode fazer parte da primeira linha de defesa do sistema antioxidante enzimático, sendo rapidamente expressa nos períodos iniciais de estresse (Vieira et al., 2013). Alternativamente, o aumento da atividade de enzimas antioxidativas pode ser mais uma consequência do estresse oxidativo ocasionado pelo déficit hídrico do que um mecanismo de tolerância (Silva et al., 2018). Por outro lado, essas progênies, quando em sequeiro, tiveram menores expressões o que pode sugerir a aclimação ao estresse, uma vez que nesse sistema os genótipos passam por ciclos de seca mais intensos, pois não conta com a irrigação durante o ano. Neste contexto, a progênie 19, apresentou menores expressões de APX, porém positivamente regulada pela seca, o que corrobora com a maior tolerância ao estresse oxidativo nesse genótipo verificada pelo menor amarelecimento em condição de deficiência hídrica em campo. Quanto a expressão do gene PYL8a, os genótipos apresentaram distintos perfis de expressão, o que pode sugerir uma sinalização e regulação diferencial do ABA nos genótipos analisados. Destaca-se, porém aumento de expressão nos genótipos 3 e 19 em sequeiro. Esse gene é regulatório na via de sinalização de receptores de ABA, regulando positivamente a sinalização durante as respostas ao estresse abiótico (Saavedra et al., 2009). Os resultados sugerem também que a regulação do ABA pelo gene PYL8a em *C. arabica* pode estar ligado a outros reguladores/repressores das vias de sinalização do ABA.

## CONCLUSÕES

Os genótipos 7 e 19 apresentaram maior capacidade de manutenção do potencial hídrico. Os diferentes padrões de expressão dos genes candidatos APX e PYL8a sugerem regulação por mecanismos fisiológicos distintos, indicando maior tolerância ao estresse oxidativo e resposta ao déficit hídrico regulada positivamente pelo ABA no genótipo 19.

## AGRADECIMENTOS

Ao Consórcio Pesquisa Café, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café - INCT/Café e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Fazenda Sagarana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.A.S., 2014. Alterações fisiológicas em clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*) submetidos ao déficit hídrico. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- DAMATTA, F.M., AVILA, R.T., CARDOSO, A.A., MARTINS, S.C.V., RAMALHO, J.C., 2018. Physiological and Agronomic Performance of the Coffee Crop in the Context of Climate Change and Global Warming: A Review. *J.Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04537>
- MARRACCINI, P., VINECKY, F., ALVES, G.S.C., RAMOS, H.J.O., ELBELT, S., VIEIRA, N.G., CARNEIRO, F.A., SUJII, P.S., ALEKCEVETCH, J.C., SILVA, V.A., DAMATTA, F.M., FERRÃO, M.A.G., LEROY, T., POT, D., VIEIRA, L.G.E., DA SILVA, F.R., ANDRADE, A.C., 2012. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *J. Exp. Bot.* <https://doi.org/10.1093/jxb/ers103>
- MOFATTO, L.S., CARNEIRO, F. DE A., VIEIRA, N.G., DUARTE, K.E., VIDAL, R.O., ALEKCEVETCH, J.C., COTTA, M.G., VERDEIL, J.L., LAPEYRE-MONTES, F., LARTAUD, M., LEROY, T., DE BELLIS, F., POT, D., RODRIGUES, G.C., CARAZZOLLE, M.F., PEREIRA, G.A.G., ANDRADE, A.C., MARRACCINI, P., 2016. Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. *BMC Plant Biol.* <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0777-5>
- SAAVEDRA, X., MODREGO, A., RODRIGUEZ, D., PAZ GONZÁLEZ-GARCÍA, M., SANZ, L., NICOLÁS, G., LORENZO, O., 2009. The Nuclear Interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 Is a Positive Regulator of Abscisic Acid Signaling in Seeds and Stress. *Plant Physiol.* 152, 133–150. <https://doi.org/10.1104/pp.109.146381>
- SCHOLANDER, P.F., HAMMEL, H.T., HEMMINGSEN, E.A., BRADSTREET, E.D., 1964. Hydrostatic Pressure And Osmotic Potential In Leaves Of Mangroves And Some Other Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52, 119–125.
- SILVA, V.A., ANTUNES, W.C., GUIMARÃES, B.L.S., PAIVA, R.M.C., SILVA, V. D F., FERRÃO, M.A.G., DAMATTA, F.M., LOUREIRO, M.E., 2010. Resposta fisiológica de clone de café Conilon sensível à deficiência hídrica enxertado em porta-enxerto tolerante. *Pesqui. Agropecu. Bras.* <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000500004>
- SILVA, V.A., PRADO, F.M., ANTUNES, W.C., PAIVA, R.M.C., FERRÃO, M.A.G., ANDRADE, A.C., DI MASCIO, P., LOUREIRO, M.E., DAMATTA, F.M., ALMEIDA, A.M., 2018. Reciprocal grafting between clones with contrasting drought tolerance suggests a key role of abscisic acid in coffee acclimation to drought stress. *Plant Growth Regul.* <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0385-5>
- VIEIRA, N.G., CARNEIRO, F.A., SUJII, P.S., ALEKCEVETCH, J.C., FREIRE, L.P., VINECKY, F., ELBELT, S., SILVA, V.A., DAMATTA, F.M., FERRÃO, M.A.G., MARRACCINI, P., ANDRADE, A.C., 2013. Different Molecular Mechanisms Account for Drought Tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. *Trop. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1007/s12042-013-9126-0>