

EXPRESSÃO DE TRÊS ISOFORMAS DE GALACTINOL SINTASE EM *Coffea arabica* L. SOB CONDIÇÃO ESTRESSE SALINO

Tiago B. Santos², Luiz Filipe P. Pereira³, Carmem Lucia O. Petrovicz⁴, Luiz Gonzaga E. Vieira⁵

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

²Doutorando, Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina – PR, tiagobio02@yahoo.com.br

³Pesquisador, D. Embrapa – Café, Londrina – PR, lpereira@iapar.br

⁴Pesquisador, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba – PR, cllop@ufpr.br

⁵Pesquisador, IAPAR, Londrina – PR, lvieira@iapar.br

RESUMO: O entendimento de como as plantas de cafeeiro respondem aos estresses ambientais é de fundamental importância para a sustentabilidade de sistema agrícola. A salinização em terras agrícolas representa um grande desafio para o futuro, tendo em vista as previsões sobre as mudanças e alterações climáticas e o crescimento populacional. A resposta das plantas a esse tipo de estresse desencadeia e altera a expressão de inúmeros genes, levando a mudanças morfológicas, fisiológicas e no metabolismo. O objetivo deste trabalho foi buscar novos conhecimentos sobre o papel e a contribuição das isoformas do gene *galactinol sintase* (*CaGols*) do cafeeiro na resposta ao estresse salino e quantificar os oligossacarídeos pertencentes a família da rafinose (RFOs). A expressão da isoforma *CaGols1* é observada tanto constitutivamente em folhas como também durante todo o período de estresse, enquanto que a isoforma *CaGols2* é expressa somente sob condições de estresse salino. O nível transcricional para *CaGols3* foi detectado em níveis mais baixos que as isoformas anteriores. Em relação às quantificações dos carbo-hidratos, foi observado um acúmulo elevado de rafinose durante todo período de estresse. Estes dados indicam que os oligossacarídeos da família da RFO devem desempenhar um papel na osmoproteção ou na proteção contra estresse oxidativo em *Coffea arabica* L. sob condições de salinidade como também observado em outras espécies.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., *galactinol sintase*, estresse salino.

EXPRESSION OF THREE ISOFORMS OF GALACTINOL SYNTHASE IN *Coffea Arabica* L. UNDER SALT STRESS

ABSTRACT: The understanding of how coffee plants respond to environmental stresses is fundamentally important for the maintenance of this agricultural system. High salinity on agricultural lands represents a major challenge in the future, considering the impacts of climate changes and population growth. Plants response to this kind of stress triggers and changes the expression of several genes, leading to morphological, physiological and metabolic changes. The objective of this work was to increase the comprehension on the role of different isoforms of the galactinol synthase gene (*CaGols*) in response to salt stress and to quantify the oligosaccharides belonging to the raffinose family (RFOs). The expression of *CaGols1* isoform was observed on the leaves of plants under normal growth conditions and also throughout the period of stress. On the other hand, the *CaGols2* isoform was expressed only during salt stress conditions. The transcriptional level of *CaGols3* was detected at lower rates than the previous isoforms. We observed a high accumulation of raffinose during the stress period. These data indicate that the oligosaccharides of the RFO family may play a role in osmoprotection or protection against oxidative stress in *Coffea arabica* L. under salt stress conditions as reported for other plant species.

Keyword: *Coffea arabica* L., *galactinol synthase*, salt stress.

INTRODUÇÃO

O impacto da salinidade do solo sobre a produtividade agrícola tem sido um problema generalizado, afetando inúmeras áreas nas regiões semi áridas e desérticas (Yamaguchi e Blumwald, 2005). As concentrações de sais, em geral, restringem o crescimento tanto da parte aérea como do sistema radicular das plantas, em decorrência de efeitos osmóticos, que podem acarretar déficit hídrico, e efeitos específicos de íons, que resultam em toxidez ou desordens nutricionais (Munns, 2002). Os estresses abióticos podem provocar alterações nos níveis dos carboidratos, levando a expressão e alteração de inúmeros genes. A família dos oligossacarídeos da rafinose (RFOs) apresenta diversas funções nas plantas, sendo utilizados para o transporte e armazenamento de carbono e como solutos compatíveis para a proteção da planta contra

estresse abiótico. A biossíntese de rafinose inicia-se a partir da formação de galactinol (*O* – α -D-galactopiranosil – (1 \rightarrow 1) – *L*-*mio*-inositol) pela enzima galactinol síntese (EC 2.1.123 – GolS), catalisando a transferência de UDP-D-galactose para *mio*-inositol (Peterbauer e Richter, 2001).

Em um primeiro momento, ocorre à transferência de uma galactosila para uma molécula de *mio*-inositol, formando o galactinol. Subsequentemente, o galactinol doa a unidade de galactose para uma molécula de sacarose, formando a rafinose, com a liberação de uma molécula de *mio*-inositol. Os compostos superiores desta via (estaquiase, verbascose e ajugose respectivamente) são sequencialmente formados pela ação de galactosil transferases específicas, a partir da doação da unidade de galactose pelo galactinol. Galactinol sintase é a enzima chave que catalisa o primeiro passo na biossíntese da família das RFOs e desempenha um papel regulador importante na partição do carbono entre a sacarose e RFO no desenvolvimento das folhas, tendo como função de galactosil transferase (Saravitz et al., 1987). A via metabólica a síntese de RFO está bem estabelecida, segundo Dey (1985) (Figura 1).

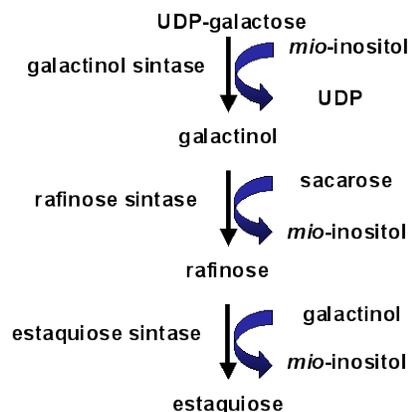


Figura 1. Via da biossíntese de galactinol, rafinose e estaquiase em plantas.

Existem vários trabalhos relatando que a expressão dos genes relacionados com a biossíntese e acumulação intracelular de galactinol e rafinose estão associadas a respostas de estresses abióticos. Em semente de feijão (*Phaseolus vulgaris*), Liu et al. (1998) identificaram a presença de transcritos de *galactinol sintase* (*GolS*), onde foi possível observar uma maior expressão em tecidos vegetativos quando expostos a baixas temperaturas. Taji et al. (2002) estudaram a expressão em *Arabidopsis thaliana* de *AtGolS1*, 2 e 3 sob condições de estresse abiótico. Os genes *AtGolS1* e 2 foram induzidos em condições de estresse hídrico e salino, enquanto que a *AtGolS3* foi expresso em baixas temperaturas. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que *GolS* está envolvido na acumulação de galactinol e rafinose sob diferentes condições de estresses ambientais, e esses oligossacarídeos estariam atuando como osmoprotetores em plantas submetidas a deficiência hídrica. Em folhas de *Glycine max* submetidas a déficit hídrico foi observado a expressão de *GmGolS*, Stolf (2005) sugere que este gene esteja envolvido na resposta à seca. Foi demonstrado que em plantas de *Xerophyta viscosa* sob déficit hídrico com índice abaixo de 5% de conteúdo relativo de água – RWC (Relative Water Content), a sacarose e a rafinose são os carboidratos predominantes, sendo também relatado a expressão de *XvGolS* nessas mesmas condições (Perters et al., 2007). Nishizawa et al. (2006) observaram que a transcrição do gene *GolS1* e *GolS2* de *A. thaliana* é induzida por estresse causado por alta incidência de luz, por estresse térmico e que através do tratamento com peróxido de hidrogênio o fator HsfA2 é ativado em situação de estresse. Análises semi quantitativas através de RT-PCR demonstraram que o gene *galactinol sintase* (*CjGolS*) de *Coptis japonica* foi expresso em toda planta, porém ocorrendo uma maior expressão na parte aérea, pecíolos e folhas (Takanashi et al., 2008). Tendo em vista a importância do impacto que o estresse salino na agricultura, este trabalho deve como objetivo estudar a expressão transcricional das isoformas de *galactinol sintase* e quantificar os carbo-hidratos pertencentes à família das RFOs em plantas de *C. arabica* cultivadas em condições de estresse salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Três isoformas de *galactinol sintase* *CaGolS1*, *CaGolS2* e *CaGolS3* foram identificadas no banco de dados do Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/café/>). Os contigs formados por ESTs de diferentes tecidos do cafeeiro foram analisados através dos programas BlastP e BlastP (National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para confirmar a identidade das sequências (Altshul et al., 1997). O experimento do estresse salino foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Foram utilizadas vinte plantas de

C. arabica cv IAPAR-59, com idade aproximada de seis meses. Para evitar choque osmótico, as plantas foram irrigadas no primeiro dia com 50mM de NaCl, e no segundo dia 100mM. A partir do terceiro dia até o final do experimento as plantas foram irrigadas diariamente com 150mM de solução salina. Folhas do mesmo par foram coletadas de cada planta antes de iniciar o tratamento (controle sem estresse – Dia 0) e 6, 12 e 25 dias após o início do tratamento com NaCl 150mM, e imediatamente submergidas em N líquido e acondicionadas em freezer -80°C . A extração de RNA total de folhas foi baseada em Geromel et al. (2006), e para verificar a presença dos transcritos de *galactinol sintase* foi realizada a técnica de Northern blot. As quantificações de rafinose, galactinol e estaquiase foram realizadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), utilizando o equipamento Shimadzu (Japão) equipado com unidade de controle CBM-10A, forno CTO-10A, bomba LC-10AD e detector de índice de refração RID-10A. Foi utilizada uma coluna Supelcogel Ca (Supelco – USA), 30 cm x 7,8 mm e pré-coluna Supelcogel Ca, 5 cm x 4,6 mm. A temperatura de análise foi de 80°C , fluxo de 0,5 mL/min e água foi o eluente. Foram feitas curvas de calibrações para os padrões de carboidratos (rafinose, galactinol e estaquiase), as quais foram utilizadas para a quantificação absoluta dos carboidratos nas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da busca pelas sequências por palavra chave para o gene *galactinol sintase* no banco de dados do Projeto Genoma Café (www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/) foram encontradas 91 sequências providas de diferentes bibliotecas depositadas no banco de dados. A partir dos reads clusterizados (agrupados por similaridade) foram obtidos 11 contigs e 3 singletons. Dentre os 11 contigs, apenas 3 foram escolhidos para serem utilizados neste trabalho por possuírem sequências provenientes, na quase totalidade, de bibliotecas de folhas e eram *full-length*, sendo então denominados *CaGols1*, *CaGols2* e *CaGols3*. Para certificar que os *contigs* demonstravam similaridade com o gene *Gols* de outros organismos, cada *contig* teve sua sequência confrontada com as sequências do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se os algoritmos BlastX e BlastP (Altschul et al., 1997). A isoforma *CaGols1* possui 1402 pb (pares de bases) e uma sequência deduzida de aminoácidos de (338 aa). Quando realizado BlastX, esta isoforma apresentou maior similaridade com *Coptis japonica* (BAF99254), *Ajuga reptans* (CAB51533), *Verbascum phoeniceum* (ABQ12640) e *Arabidopsis thaliana* (NP_176250). A isoforma *CaGols2* (1445 pb), apresentou uma sequência de 334 aa, demonstrou similaridade com *Capsicum annuum* (ABQ44212), *Brassica napus* (ACJ15472), *Arabidopsis thaliana* (NP_1822401.1) e *Xerophyta viscosa* (ABK27907). *CaGols3* (1702 pb) possui uma proteína deduzida com 344 aa e similaridade com *Capsicum annuum* (ABQ44212), *Ricinus communis* (EEF49998), *Vitis vinifera* (CAN74708) e *Populus trichocarpa* (XP_002320958). As três isoformas de *CaGols* apresentaram um domínio para a família de glicosil transferase 8. A presença desse domínio é uma característica da família das RFOs sintases, incluindo a *Gols*.

A análise do perfil transcricional das isoformas de *Gols* em plantas de *C. arabica* submetidas a estresse salino mostrou que a expressão da isoforma *CaGols1* nas folhas demonstrou ser similar ao nível basal observado em plantas sob condições normais (Dia 0) durante todo o período inicial de estresse (Figura 2), sendo detectado um aumento de transcritos no vigésimo quinto dia de irrigação com solução salina. Por outro lado, *CaGols2* foi expressa de maneira significativa a partir do sexto dia de estresse até o último dia do estresse salino. A expressão para a *CaGols3* foi detectada em níveis mais baixos em relação as duas isoformas anteriores.

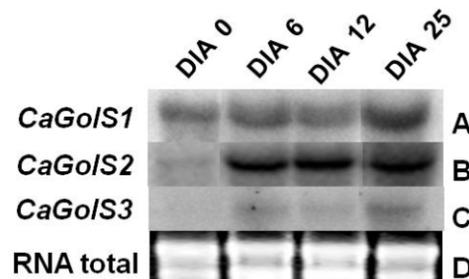


Figura 2. Análise de RNA total de folhas de *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 via Northern blot submetidas ao estresse salino. Expressão apresentada pela isoforma *CaGols1* (A), *CaGols2* (B) e *CaGols3* (C) em diferentes condições de estresse salino (Dia 0, 6, 12 e 25). D= RNA total utilizado para controle.

O padrão de expressão observado para as diferentes isoformas de *CaGols* em folhas de *C. arabica* evidenciou a indução diferencial dessas isoformas em função do período de tempo em que as plantas foram submetidas ao estresse salino, destacando-se as isoformas *CaGols2* e *CaGols3* em comparação com a *CaGols1* que apresenta nível de transcrição constitutiva em folhas de plantas não estressadas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em *Arabidopsis* por

Taji et al. (2002), que mostraram que duas isoformas (*AtGolS1* e *AtGolS2*) também foram induzidas sob condições de estresse salino.

As quantificações de galactinol e dois carbo-hidratos da família das RFOs realizadas através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) mostraram o perfil de acumulação de galactinol, rafinose e estaquiase durante o período de estresse salino foi bastante diferente (Figura 3). Nota-se que o teor de galactinol nas folhas segue um padrão decrescente até quase não ser mais detectado no vigésimo quinto dia de estresse salino. De modo ainda mais evidente, a estaquiase não foi detectada já no sexto dia após o início do estresse. De modo diverso, a rafinose apresentou um aumento quase linear de acumulação até o último dia do experimento, atingindo valores cerca de dez vezes acima dos observados no início do experimento ($\pm 7,0$ mg/gMF).

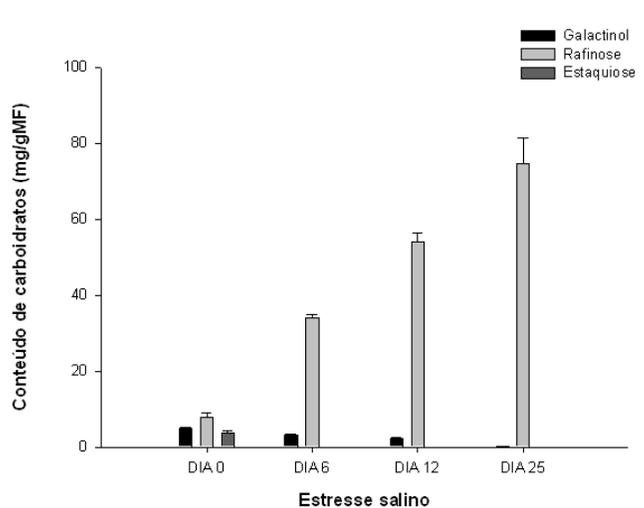


Figura 3. Concentração de galactinol, rafinose e estaquiase em folhas de plantas de *C. arabica* cv IAPAR-59, sob condições de estresse salino. Sem estresse (Dia 0) e 6, 12 e 25 dias após o início do estresse salino (150 mM-NaCl).

Os carbo-hidratos apresentam inúmeras funções nas plantas, e estão envolvidos em diversas vias metabólicas e participam da regulação de vários genes especialmente aqueles envolvidos no metabolismo dos oligossacarídeos da família da rafinose RFO. Os RFOs são uma importante fonte de reserva de carbono disponível durante a germinação das sementes, e são também considerados metabólitos que auxiliam a planta a tolerar condições de estresse (Keller e Pharr, 1996; Peterbauer e Richter, 2001). A alta expressão apresentada por algumas isoformas de *CaGolS* em plantas de *C. arabica* submetidas à salinidade confirmam o papel das RFOs na proteção contra condições estressantes.

Altos níveis de rafinose durante o estresse abiótico está bem estabelecida, mas recentemente foi demonstrado que nem sempre o acúmulo de rafinose está relacionado na melhora da tolerância a baixas temperaturas em *A. thaliana* (Zuther et al., 2004). Possivelmente galactinol foi utilizado como substrato para a biossíntese dos oligossacarídeos de mais alta massa molecular pelas diferentes glicosil transferases. Taji et al. (2002) relatam que planta induzidas ao estresse hídrico e salino desencadearam a expressão do gene *galactinol sintase*, e acumularam altos níveis de rafinose e galactinol. Diferentemente do observado neste estudo com *C. arabica*, aqueles autores informam que não ocorreu acúmulo de estaquiase nas folhas, flores em plantas de *A. thaliana*.

CONCLUSÃO

Através desse trabalho foi possível verificar a expressão diferencial entre as isoformas *CaGolS1*, *CaGolS2* e *CaGolS3* ao longo do período de estresse salino. Como a galactinol sintase é a enzima chave na biossíntese de oligossacarídeos da família da RFO e estes por sua vez, estão envolvidos diretamente nas respostas das plantas a diferentes tipos de estresse, seria importante particularizar o papel da rafinose na proteção das estruturas celulares através da sua interação com membranas, complexos protéicos ou enzimas que facilitam o processo de compartimentalização de sais ou na proteção contra o estresse oxidativo resultante da exposição a altas concentrações de sal.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25, 3389–3402, 1997.
- DEY, P.M. D-Galactoside containing oligosaccharides. In: Dey, P.M. AND Dixon, R.A. (Eds.) Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants. **Academic Press**, New York, p.53-129, 1985.
- GEROMEL, C., FERREIRA, L. P., GUERREIRO, S. M. G., CAVALARI, A. A., POT, D., PEREIRA, L. F. P., LEROY, T., VIEIRA, L. G. E., MAZZAFERA, P., MARRACCINI, P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, 55: 3243-3258, 2006.
- KELLER, F., PHARR, D. M. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides. In E Zamski, AA Schaffer, eds, Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships. Marcel Dekker, New York. p.157-183, 1996.
- LIU, J. J. J., KRENZ, D. C., GALVEZ, A. F., DE LUMEN, B. O. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. **Plant Science**, 134, 11–20, 1998.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell and Environment**, v.25, p.239-250, 2002.
- NISHIZAWA, A., YABUTA, Y., YOSHIDA, E., MARUTA, T., YOSHIMURA, K., SHIGEOKA, S. *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. **Plant Journal**, 48: 535–547, 2006.
- PETERBAUER, T., RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, 11: 185-197, 2001.
- PETERS, S., MUNDREE, S. G., THOMSON, J. A., FARRANT, J. M., KELLER, F. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 58, No. 8, pp. 1947–1956, 2007.
- SARAVITZ, D. M., PHARR, D. M., CARTER, T. E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes; **Plant Physiology**, 83: 185–189, 1987.
- STOLF, R. Avaliações morfo-anatômicas, ecofisiológicas e expressão gênica diferencial em duas cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], durante períodos de déficit hídrico. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina – UEL, 2005.
- TAJI, T., OHSUMI, C., IUCHI, S., SEKI, M., KASUGA, M., KOBAYASHI, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 29, p. 417-426, 2002.
- TAKANASHI, K., SHITAN, N., SUGIYAMA, A., KAMIMOTO, Y., HAMAMOTO, M., IWAKI, T., TAKEGAWA, K., YAZAKI, K. *Galactinol synthase* gene of *Coptis japonica* is involved in berberine tolerance. **Bioscience Biotechnology Biochem**, 72: 398-405, 2008.
- YAMAGUCHI, T., BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. **Trends Plant Science**, 10, 615–620, 2005.
- ZUTHER, E., BUCHEL, K., HUNDERTMARK, M., STITT, M., HINCHA, D. K., HEYER, A. G. The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters** 576, 169–173, 2004.