

MARCOS BRANDALISE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES TECIDO-
ESPECÍFICOS DE RAIZ E FOLHA DE *Coffea arabica***

BOTUCATU – SP

2007

MARCOS BRANDALISE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES TECIDO-
ESPECÍFICOS DE RAIZ E FOLHA DE *Coffea arabica***

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista – Campus
de Botucatu (SP), para obtenção do título de
Doutor em Genética

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Co-orientadora: Profa. Dr. Miriam Perez Maluf

BOTUCATU – SP

2007

Dedicatória

*A todos, que tornaram
possível a realização desse projeto*

Agradecimentos

*A Sorte,
que sempre esteve ao meu lado;*

Aos meus Pais, Nelson e Silvia Brandalise, principalmente pela oportunidade e confiança;

Ao meu ilustríssimo orientador e grande amigo Dr. Ivan de Godoy Maia, pelos ensinamentos de bancada e especialmente de vida. Foram 10 anos de trabalho em conjunto sem sequer uma discussão ou desentendimento;

À Dra. Miriam Perez Maluf, pela confiança depositada e pelo bom humor do dia-a-dia;

Ao Dr. Guerreiro de Oliveira Filho, pela amizade e conselhos dados na hora do café;

Aos Drs. Andrés Yunes e Edson Kamper, pela orientação de extrema importância no exame de qualificação;

Ao meu grande amigo Raul Andrés Cernadas, pelos conselhos, ajudas, amizade, vinhos e cervejas no final da tarde...

A minha querida esposa Fabiana, por aturar meu mau humor e impaciência, mas, sobretudo por cuidar de nosso filho Antônio, para que eu pudesse finalizar essa etapa de minha vida;

Ao LNLS, mais precisamente ao Dr. Celso Eduardo Benedetti, pela colaboração e abertura das portas do seu laboratório;

A todos os amigos do Centro de Café Alcides Carvalho; Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - UNICAMP (CBMEG) e Instituto de Biociências (UNESP);

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café.

Epígrafe

*“Tudo funciona,
até a hora que para de funcionar.”*

Marcos Brandalise

Resumo

Promotores são seqüências regulatórias capazes de direcionar a expressão gênica para órgãos e tecidos específicos. A busca por seqüências promotoras que regulam a expressão tecido-específica de genes é uma das prioridades para o setor biotecnológico vegetal. No presente trabalho foram realizadas análises *in silico* a partir das informações disponíveis no Banco de Dados do Projeto Genoma Café, visando identificar genes com expressão tecido-específica. Foram selecionadas 13 e 15 etiquetas de seqüências expressas (EST) com expressão específica em raiz e folha, respectivamente. A validação, via RT-PCR, dos candidatos selecionados revelou a expressão tecido-específica de dois destes, sendo um específico de folha e outro de raiz. As regiões imediatamente a montante dos ESTs validados foram isoladas via *genome walking* e fragmentos de 2,0 kb (raiz) e ~0,9 kb (folha) foram obtidos. Vários elementos regulatórios foram identificados em ambas seqüências amplificadas, incluindo elementos envolvidos no controle da expressão tecido-específica e resposta a estresses. Os promotores isolados foram fusionados ao gene repórter *uidA* e testados em experimentos de expressão transiente em plântulas de café. Análises histoquímicas confirmaram a funcionalidade e a órgão/tecido-especificidade da expressão modulada pelos promotores isolados. Plantas de tabaco transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* com os cassetes acima descritos foram obtidas e análises histoquímicas de gus revelaram que além de tecido-específicas, as seqüências regulatórias investigadas são altamente induzidas por estresse biótico e abiótico.

Abstract

Promoters are crucial regulatory sequences that enable genes to be transcribed in specific organs or tissues. Promoter sequences recovery, especially those leading to tissue-specific expression, is of great interest in plant biotechnology. In this study, an *in silico* analysis of the Brazilian Coffee Genome Project Database was accomplished to identify genes with organ-specific expression in coffee plant. Several ESTs showing root (13) and leaf-specific (15) expression patterns were selected, but only two of them, one in root and the other in leaf, were validated as being specific by RT-PCR experiments. The DNA regions immediately 5' to the validated ESTs were isolated by chromosome walking and amplified fragments of 2,0 kb (root) and 0,9 kb (leaf) in length were obtained. Several cis-regulatory elements were identified within the amplified sequences, including those involved in the control of tissue-specificity and stress response. The isolated promoters were transcriptionally fused to *uidA* reporter gene and tested in transient expression assays using coffee seedlings. Gus histochemical analyses confirmed the functionality and expected organ-specificity of the cloned promoters. Transgenic tobacco plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* bearing the corresponding cassettes were obtained and histochemical analyses confirmed that besides tissue-specific expression, the investigated regulatory sequences were also highly induced by biotic and abiotic stress.

Lista de Tabelas

Tabela. 1	Promotores isolados de café.	43
Tabela 2.	Listagem das bibliotecas, e seus respectivos tecidos/tratamentos, geradas e seqüenciadas pelo projeto Genoma Café.	46
Tabela 3.	Listagem dos candidatos identificados via análise de <i>northern</i> eletrônico, apresentado padrão de expressão específico em raiz	81
Tabela 4.	Listagem dos candidatos identificados via análise por <i>northern</i> eletrônico, apresentando padrão de expressão específico em folha.	82

Lista de Figuras

Figura 1.	Sintoma característico de folhas de <i>Coffea arabica</i> atacadas com Bicho Mineiro.	32
Figura 2.	Sintoma característico de folhas de <i>Coffea arabica</i> infectadas com a ferrugem alaranjada do cafeeiro (<i>Hemileia vastatrix</i>).	33
Figura 3.	Sintoma característico em raízes de <i>Coffea arabica</i> infectadas com nematóides causadores de galhas da espécie <i>Meloidogyne</i> spp.	36
Figura 4.	Representação esquemática do vetor pRT103-Gus (~5 Kb) que apresenta o gene repórter <i>uidA</i> (GUS) inserido entre os sítios <i>Bam</i> HI e <i>Nco</i> I sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S.	67
Figura 5.	Ensaio de digestão parcial do vetor pRT103-Gus visando a retirada do promotor constitutivo CaMV35S.	68
Figura 6.	Representação esquemática dos cassetes de expressão desenvolvidos para a análise funcional das regiões promotoras amplificadas via <i>genome walking</i> (os promotores não se encontram em escala).	69
Figura 7.	Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA 1381 (Cambia) utilizado na construção dos cassetes de expressão visando a posterior transformação estável de tabaco empregando <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	72

Figura 8. Amplificação por RT-PCR de um transcrito ubíquo codificando actina.	84
Figura 9. Análise de RT-PCR revelando amplificação de transcrito específico de raiz.	85
Figura 10. Análise de RT-PCR revelando a amplificação de transcrito específico de folha em <i>Coffea arabica</i> , variedade Mundo Novo.	87
Figura 11. Análise por northern blot da acumulação do transcrito específico de raiz em condições de estresse mecânico.	89
Figura 12. Gel de agarose contendo os produtos de amplificação obtidos para o candidato específico de raiz empregando a técnica de <i>genome walking</i> e a combinação dos oligos AP1/GSP1 e AP2/GSP2.	90
Figura 13. Gel de agarose contendo os produtos de amplificação obtidos para o candidato específico de folha empregando a técnica de <i>genome walking</i> e a combinação dos oligos AP1/GSP1 e AP2/GSP2.	91
Figura 14. Seqüência parcial de nucleotídeos do promotor específico de folha analisado com auxílio do banco de dados do PLACE.	94

Figura 15. Esquema de localização dos elementos regulatórios encontrados no promotor do gene com expressão específica em folha por análise comparativa com banco de dados do PLACE.	95
Figura 16. Localização dos elementos regulatórios encontrados no promotor do gene com expressão específica em raiz por análise comparativa com banco de dados do PLACE.	98
Figura 17. Ensaio de expressão transiente, via biobalística, em raiz e folha de <i>Coffea arabica</i> .	99
Figura 18. Ensaio enzimático de Gus em folha de <i>Coffea arabica</i> transformada via biobalística com o cassete de expressão contendo o promotor específico de folha.	100
Figura 19. Expressão transiente de Gus em folha de <i>Coffea arabica</i> transformada via biobalística com o cassete de expressão contendo o promotor específico de folha.	101
Figura 20. Expressão transiente de Gus em raiz de <i>Coffea arabica</i> transformada via biobalística com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz.	103
Figura 21. Ensaio histoquímico da atividade de β -glucuronidase em plântulas transgênicas de tabaco transformadas, respectivamente, com os cassetes de expressão contendo os promotores específicos de folha (A) e de raiz (B) isolados de <i>Coffea arabica</i> .	105

- Figura 22.** Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em discos foliares de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de folha. 107
- Figura 23.** Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em folhas de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de folha, em resposta a dano mecânico. 108
- Figura 24.** Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em raízes de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de raiz em resposta ao ataque de nematóides. 110
- Figura 25.** Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em raízes de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de raiz, em resposta ao ataque de nematóides. 112
- Figura 26.** Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em raízes de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de raiz, em resposta ao ataque de nematóides. 113

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Lista de Tabelas	11
Lista de Figuras	13
1. Introdução	24
1.1 Inovações tecnológicas	25
1.2 Café e a sua importância	27
1.3 Principais pragas e doenças do cafeeiro	31
1.3.1 Bicho Mineiro	31
1.3.2 Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro	32
1.3.3 Nematóides	34
1.4 Melhoramento genético clássico X biotecnologia	36
1.5 Promotores constitutivos X tecido- específicos	39
1.6 Projeto Genoma Café	44
2. Objetivos	47

3. Material e Métodos	49
3.1 Material Vegetal	50
3.2 Seleção <i>in silico</i> de ESTs com padrão de expressão órgão/tecido - específico	50
3.3 Extração de RNA total de café	51
3.4 Quantificação do RNA e síntese de cDNA	53
3.5 Validação dos cDNAs obtidos	53
3.6 Confirmação da especificidade de expressão	54
3.7 Análise da indução da expressão do gene específico de raiz por ferimento empregando <i>northern blot</i>	54
3.7.1 Marcação de sonda e hibridização da membrana	55
3.8 Isolamento e identificação das regiões promotoras	56
3.8.1 Isolamento de DNA total de folha de café	57
3.8.2 Amplificação das regiões promotoras por <i>genome walking</i> (GW)	58
3.8.3 Isolamento, purificação e clonagem das regiões promotoras	59
3.8.4 Minipreparação de DNA plasmidial e seqüenciamento dos insertos	61
3.8.5 Análise das seqüências e busca de domínios regulatórios	62
3.9 Análise funcional das regiões promotoras através de expressão transiente em raiz e folha de <i>Coffea arabica</i>	63
3.9.1 Preparação das micropartículas	64

3.9.2	Teste controle de biobalística e ensaio enzimático de Gus	65
3.9.3	Construção do cassete de expressão no vetor pRT103 – Gus	66
3.9.4	Ensaio de expressão transiente em folha e raiz de <i>Coffea arabica</i> via biobalística	70
3.10	Construção do cassete de expressão em pCAMBIA-1381 visando transformação estável em tabaco	71
3.11	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa LBA4404 por eletroporação e confirmação das células transformadas	73
3.12	Obtenção de plantas transgênicas de tabaco	74
3.13	Análise dos transformantes via PCR e ensaio enzimático de Gus	75
3.14	Análise da expressão do gene repórter <i>uidA</i> em plantas transgênicas transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor específico de folha em resposta a dano mecânico	77
3.15	Análise da expressão do gene repórter <i>uidA</i> em plantas transgênicas transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz em resposta ao ataque de nematóides	77

4. Resultados	79
4.1 Seleção <i>in silico</i> de ESTs órgão/tecido – específicos	80
4.2 Extração e quantificação de RNA total de diferentes órgãos/tecidos de <i>Coffea arabica</i> e de frutos em diferentes fases de amadurecimento. Síntese e validação da integridade dos cDNAs	83
4.3 Confirmação da especificidade de expressão dos candidatos selecionados <i>in silico</i>	84
4.4 Análise da expressão do gene raiz-específico frente à injúria mecânica	88
4.5 Isolamento e identificação de regiões promotoras	89
4.6 Seqüenciamento dos produtos de GW e obtenção dos consensos	91
4.7 Busca por elementos <i>cis</i> -regulatórios	92
4.7.1 Elementos <i>cis</i> -regulatórios presentes na região promotora do candidato com expressão específica em folha	93
4.7.2 Elementos <i>cis</i> -regulatórios presentes na região promotora do gene com expressão específica em raiz	96
4.8 Análise das regiões promotoras através de expressão transiente do gene repórter <i>uidA</i> em raiz e folha de <i>Coffea arabica</i>	98
4.9 Análise de plantas de tabaco transgênicas	104

4.10	Análise da indução da expressão do gene repórter <i>uidA</i> em plantas transgênicas transformadas com o cassete contendo o promotor específico de folha em resposta a dano mecânico	106
4.11	Análise da indução da expressão do gene repórter <i>uidA</i> em plantas transgênicas transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz em resposta ao ataque de nematóides	109
5.	Discussão	114
5.1	ESTs órgão/tecido-específicos e a análise <i>in silico</i>	115
5.2	Candidato com expressão em folha	116
5.2.1	Caracterização dos elementos regulatórios e análise funcional do promotor específico de folha	117
5.3	Candidato com expressão específica em raiz	120
5.3.1	Caracterização dos elementos regulatórios e análise funcional do promotor específico de raiz	121
6.	Conclusões e Perspectivas	125
7.	Bibliografia	128

1. Introdução

1.1 Inovações tecnológicas

A biotecnologia tem se destacado nos últimos anos como uma inovação tecnológica capaz de agregar riquezas a diferentes áreas do setor produtivo. No setor agrícola e florestal, a produção de plantas geneticamente modificadas com características específicas derivadas da biotecnologia é um processo altamente promissor cujos produtos finais apresentam alto valor agregado e podem ser aplicados diretamente na cadeia produtiva. Ciente de tais vantagens, algumas empresas de cunho biotecnológico pautadas na produção de novos produtos para a agricultura têm sido criadas no Brasil nos últimos anos. O desenvolvimento de uma indústria de base genética capaz de prover insumos à produção agrícola é não só imprescindível como altamente benéfico para o setor produtivo brasileiro.

Embora novas plantas derivadas da biotecnologia venham sendo adotadas em diversos países, estamos atingindo 12 anos de cultivo de produtos geneticamente modificados, a biotecnologia vegetal ainda é alvo de controvérsias e polêmicas. Para que essa inovação tenha maior alcance e aceitação, investimentos importantes em pesquisa básica precisam ser realizados a fim de gerar ferramentas necessárias para a aceleração de sua aplicação e sobretudo, para a superação de algumas de suas limitações técnicas. Esse desafio deve ser encarado pelos diferentes setores envolvidos, incluindo as universidades e institutos de pesquisa do setor público.

A presente tese está inserida nesse contexto e tem como principal meta identificar seqüências promotoras capazes de direcionar a expressão de genes, de

interesse agrônomo, para órgãos/tecidos específicos da planta. Para tal, foram utilizados os dados gerados no projeto de seqüenciamento de seqüências expressas do café que contou com financiamento de diferentes entidades. Trata-se, portanto de um trabalho de tese com enfoque acadêmico e aplicado.

Cabe ressaltar que por iniciativa do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, que financiou o presente projeto, e, sobretudo pelo potencial de utilização das seqüências promotoras aqui descritas e caracterizadas em programas biotecnológicos, as mesmas estarão sendo protegidas por uma patente. Como esse pedido está sendo processado, os dados relativos às seqüências promotoras e nome dos genes utilizados no presente trabalho estão sendo apresentados em confidencialidade.

1.2 Café e a sua importância

O café é uma planta perene de porte arbustivo nativa do continente africano. Sua chegada ao Brasil se deu em 1727 na cidade de Belém, sendo posteriormente cultivado no Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais em 1780. Até então o café era considerado o maior produto gerador de riquezas, destacando-se como o mais importante da história do Brasil.

Atualmente, a cafeicultura desempenha uma importante função na economia nacional exercendo um grande papel gerador de divisas da ordem de 2 bilhões de dólares anuais ou 26 milhões de sacas exportadas ao ano (Companhia Nacional do Abastecimento – Conab). Com um mercado ainda em expansão, o agronegócio do café gera, em todo mundo, recursos na ordem de 91 bilhões de dólares ao comercializar 115 milhões de sacas que, em média, são produzidas. A cafeicultura envolve ainda meio bilhão de pessoas desde a produção ao consumo final representando cerca 8% da população mundial (Embrapa Café).

No início do século, o Brasil se destacava dentre os países produtores de café, sendo responsável por 80% das exportações mundiais. Entretanto e infelizmente, a produção brasileira passou por um grande retrocesso até chegar aos dias atuais. Apesar da acentuada redução da área cafeeira nas últimas décadas e de diversos fatores que têm determinado oscilações na sua produção total, dentre estes, fatores abióticos como seca e geada e, bióticos como pragas e doenças (Gonçalves, 1999), o Brasil ainda ocupa uma posição dominante no

mercado internacional, se destacando como maior produtor (contribuição de 30% da produção mundial nas últimas safras) e exportador mundial de café, com participação média de 25%. O agronegócio do café representa mais de 2,5 % do valor total das exportações brasileiras além de gerar oito milhões de empregos diretos e indiretos, sobressaindo-se como o setor que mais emprega no Brasil.

Anuário Estatístico Oficial Conab 2005/2006 revela que a produção brasileira de café é de 40,62 milhões de sacas. Entretanto, quando essa é comparada com a produção estimada em levantamento anterior publicado em dezembro de 2005, que totalizou 43,58 milhões de sacas, uma redução de 6,8% pôde ser observada. Essa redução representa um prejuízo de cerca de 800 milhões de reais para os produtores, sendo a mesma causada pela estiagem que assolou as plantações de café nos períodos de floração e enchimento dos grãos.

O cafeeiro pertence ao subgênero *Coffea*, família Rubiaceae, formado por cerca de 100 espécies. Das espécies mais cultivadas no mundo, *Coffea arabica* L (café Arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (café Robusta) são as mais importantes economicamente. *Coffea arabica* L é uma espécie nativa do continente africano, tendo como local de origem o sudoeste da Etiópia e do Sudão e o norte do Quênia. Por apresentar uma qualidade da bebida superior quando comparada com outras espécies, *C. arabica* destaca-se como a espécie mais cultivada, representando cerca de 70% da produção mundial e 90% da produção na América Latina. *C. canephora* por sua vez, apresenta como locais de origem a República da Guiné, a Libéria, o Sudão e Uganda, respondendo por 30% do restante da

produção mundial (Carneiro, 1997). Apesar de somente *C. arabica* e *C. canephora* terem importância econômica ativa no mercado mundial, espécies selvagens apresentam uma grande importância do ponto de vista adaptativo, sendo potentes fontes de variabilidade genética. Tais espécies não cultivadas comercialmente possuem características altamente vantajosas como resistência a doenças e pragas, tolerância à seca e outras alterações ambientais (Fazuoli *et al.*, 1999). Um exemplo desta aplicação genética é a variedade Apoatã de *C. canephora* (IAC2258), utilizada como porta enxerto de *C. arabica* devido à resistência a nematóide (Fazuoli, 1981).

C. arabica é a única espécie alotetraplóide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) do gênero e predominantemente autofértil em aproximadamente 90% das flores, enquanto que *C. canephora* e as outras espécies conhecidas do gênero *Coffea* são diplóides ($2n = 2x = 22$ cromossomos) e autoincompatíveis, multiplicando-se exclusivamente por fecundação cruzada (Fazuoli *et al.*, 1999; Berthaud, 1980). Por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, o melhoramento genético do cafeeiro é lento, sendo necessária a implementação de técnicas que facilitem e acelerem a obtenção, seleção e avaliação de materiais superiores. A diversidade genética de cultivares de *Coffea arabica* L. é relativamente pequena e a sua ampliação torna-se importante para o futuro do melhoramento do cafeeiro. O potencial competitivo do país, no entanto, poderá crescer ainda mais com a redução de custos de produção e também através do aumento da produtividade.

Pragas e doenças são consideradas fatores limitantes para obtenção de uma boa produção. Dentre as inúmeras doenças e pragas do café, destaca-se a ferrugem alaranjada do cafeeiro causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* (Carvalho e Fazuoli, 1993) e a lagarta do Bicho Mineiro (*Leucoptera coffeella*) (Parra, 1985) afetando as folhas, e o nematóide *Meloidogyne exigua* sp. (Brown *et al.*, 1995) afetando as raízes.

Atualmente, a ferrugem e os nematóides atingem todas as regiões cafeeicultoras do Brasil e se não forem devidamente controladas podem causar queda de até 45% na produção. O controle químico desses agentes tem se mostrado eficiente, porém, além de representar cerca de 10 a 20% do custo total de produção (Matiello *et al.*, 1985; Vegro e Ferreira, 2000), pode levar ao agravamento de outras doenças e pragas do cafeeiro devido à baixa seletividade, e possibilitar por pressão de seleção, o surgimento de raças resistentes aos produtos aplicados. Um dos maiores desafios tem sido encontrar métodos eficientes de controle, com mínimo custo operacional e principalmente de baixo impacto ambiental.

1.3 Principais pragas e doenças do cafeeiro

1.3.1 Bicho Mineiro

O Bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella*), é um lepidóptero específico do gênero *Coffea*, afetando quase que todas as variedades comerciais de *Coffea arabica*, muitas vezes de forma devastadora (Figura 1). Esta é considerada uma das principais pragas da cultura no Brasil (Guerreiro *et al.*, 1990). No Estado de Minas Gerais, maior produtor brasileiro de café na atualidade (49,5% da produção do país), essa praga quando não controlada chega a causar danos de até 30% na produção.

A forma adulta do inseto realiza a postura na parte adaxial foliar e após a eclosão dos ovos, as larvas penetram na região axial das folhas. As larvas se alimentam exclusivamente do parênquima paliçádico, formando literalmente galerias e/ou minas no tecido afetado. A injúria desencadeia uma resposta “imune” inespecífica na planta, havendo aumento dos níveis de etileno, oxidação do tecido atacado e conseqüentemente queda das folhas (Souza *et al.*, 1998). Este desfolhamento inesperado chega a causar grande redução no desenvolvimento do sistema radicular e principalmente na atividade fotossintética da planta (Koronnova e Veja, 1985).

Grandes avanços têm sido obtidos pela indústria de defensivos agrícolas, entretanto a prevenção anual dessa praga chega a representar 15% do custo total

de produção. Além de agir de forma inespecífica, em outros organismos não alvos, o produto aplicado pode causar sérios danos ao meio ambiente.



Figura 1. Sintomas característicos em folhas de *Coffea arabica* atacadas pelo bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella*).

1.3.2 Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro

Uma das principais e a mais severa doença que afeta a cafeicultura brasileira e mundial na atualidade é a ferrugem alaranjada do cafeeiro (Figura 2). Esta é causada por um parasita biotrófico foliar obrigatório *Hemileia vastatrix* (Berkeley e Boome). No Brasil são encontradas ao redor oito raças virulentas, havendo, entretanto grande predominância de fungos da raça tipo II.

O primeiro sintoma da doença é observado normalmente no lado adaxial da folha, caracterizando-se como manchas amarelo-alaranjadas. Após esporulação e disseminação do fungo na planta, ocorre oxidação e conseqüentemente, morte

dos tecidos foliares, havendo uma desfolha prematura e muitas vezes seca dos ramos plagiotrópicos (ramos produtivos), prejudicando assim o crescimento, florescimento, e conseqüentemente a produção do ano seguinte.

Esta doença quando não controlada adequadamente pode causar perdas de até 40% da produção, enquanto que infestações mais severas podem provocar a morte das plantas infectadas (Fernandez *et al.*, 2004). Apesar de representar cerca de 15% do custo total da produção, métodos de controle químico da doença têm se mostrado eficiente. Entretanto, em alguns casos, o uso indiscriminado de fungicidas não específicos, pode acarretar o surgimento de novas raças, além de prejudicar de maneira drástica o meio ambiente. Mesmo com a ajuda dos programas de melhoramento que lançaram cultivares resistentes ao patógeno, novas raças fisiológicas do fungo têm ocasionado a quebra de resistência. Em função disso, a durabilidade da resistência dos cultivares atuais é difícil de ser prevista (Varzea *et al.*, 2002).



Figura 2. Sintoma característico de folhas de *Coffea arabica* infectadas com a ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*).

1.3.3 Nematóides

Os nematóides formadores de galhas do gênero *Meloidogyne* spp. são capazes de parasitar mais de 3000 espécies de plantas, sendo endoparasitas sedentários obrigatórios. Quando não controlados adequadamente chegam a causar grandes perdas à agricultura mundial (Abad *et al.*, 2003). Sasser e colaboradores, por exemplo, relatam que em 1987 esses microorganismos geraram prejuízos da ordem de 100 bilhões de dólares ao agronegócio mundial. Até então quinze espécies de *Meloidogyne* foram caracterizadas como parasitas de café (López e Salazar, 1989; Campos *et al.*, 1990; Eisenback e Triantaphyllou, 1991; Carneiro *et al.*, 1996), destacando-se dentre essas a espécie *M. Exigua*, considerada a mais importante e problemática para a cafeicultura de arábica, principalmente pela sua ampla distribuição na América do Sul e Central (Anthony *et al.*, 2005).

Os fitonematóides formadores de galhas penetram no sistema radicular do hospedeiro através do córtex, onde células parênquimatosas do xilema são selecionadas para ancoragem e formação das células gigantes. Por uma disfunção da maquinaria celular, gerada pelo parasitismo, as células gigantes são multinucleadas, se desenvolvem normalmente em números reduzidos (de 5 a 7), apresentando citoplasma denso e com grande concentração de organelas celulares e pequenos vacúolos. Concomitantemente à formação das células gigantes, ocorre hiperplasia e hipertrofia do tecido cortical, causando assim o

sintoma de galha ou nódulo que caracteriza a doença (Williamson e Hussey, 1996). O fenótipo desenvolvido pelo parasitismo gera deformação do sistema radicular bem como mau funcionamento no sistema de absorção e translocação de água e nutrientes.

Muitos dos processos fisiológicos da planta hospedeira como respiração, fotossíntese, absorção e translocação de água e nutrientes, balanço hormonal, assim como deformação morfológica e anatômica podem ser afetados direta ou indiretamente pelo parasitismo (Gonçalves e Silvarolla, 2001).

Estes parasitas de plantas são considerados uns dos maiores vilões da agricultura na atualidade. Em 1987, chegaram a causar danos na ordem de bilhões de dólares para o agronegócio de alimento e fibras (Christopher *et al.*, 1994). Nos E.U.A os nematóides causadores de galha chegam a causar perdas de 1 bilhão de dólares por ano ao agronegócio da soja (Alkharouf *et al.*, 2004).



Figura 3. Sintoma característico em raízes de *Coffea arabica* infectadas com nematóides causadores de galhas da espécie *Meloidogyne* spp.

1.4 Melhoramento genético clássico X biotecnologia

A crescente demanda mundial por alimentos de melhor qualidade e principalmente livres de defensivos agrícolas, é um desafio que tem promovido um avanço significativo em diversas áreas da produção vegetal. Dentre estas se destaca o melhoramento genético vegetal (Borém, 1998).

O melhoramento genético de plantas visando melhorias agronômicas vem sendo realizado pelo homem há milhares de anos utilizando-se de procedimentos clássicos, funcionais, de cruzamentos controlados entre espécies. Entretanto, com o advento da biologia molecular, somado ao desenvolvimento de técnicas biotecnológicas avançadas, o melhoramento genético de plantas via engenharia genética tornou-se uma ferramenta importante na obtenção de plantas genotipicamente superiores em um curto espaço de tempo, sendo portanto de grande interesse para o setor agrícola (Borém, 1998).

As novas tecnologias têm se destacado principalmente devido à possibilidade de obtenção de resultados uniformes e direcionados para características desejáveis. Dentre os inúmeros métodos biotecnológicos mundialmente utilizados para o melhoramento, destaca-se como um dos mais importantes, a produção de plantas geneticamente modificadas. A transgenia tem permitido o melhoramento de genótipos selecionados por métodos convencionais através da introdução de um ou poucos genes que, em muitos casos, são encontrados em espécies distantes e que não poderiam ser transferidos via

recombinação, o que acontece obrigatoriamente entre indivíduos sexualmente compatíveis. Por outro lado, se fossem transferidos levariam anos para obtenção do genótipo desejado.

Em se tratando do melhoramento de espécies perenes, mais precisamente da espécie investigada na presente tese (*Coffea arabica*), diversos programas de melhoramento vêm sendo conduzidos com intuito de introduzir características agronômicas desejáveis à cultura, tais como resistência a pragas e doenças, além de processos de aperfeiçoamento da qualidade de bebida, maturação de frutos, arquitetura da planta, ect... Entretanto, apesar do sucesso desses programas, o processo de melhoramento de café demanda muito tempo, espaço físico e gastos elevados, sobretudo se considerarmos que desde as primeiras hibridações até a obtenção de novos cultivares pode-se levar no mínimo 20 anos. Dois exemplos práticos desse delongado, porém funcional, processo são os cultivares Obatã e Catuaí, cujo programa de melhoramento estendeu-se de 1968 a 2000 e de 1950 a 1992, respectivamente.

Como relatado anteriormente, o gênero *Coffea* é composto por aproximadamente 100 espécies, destacando-se *Coffea arabica* L como a mais importante economicamente. Esta espécie é a única tetraplóide do gênero, sendo o restante diplóide e na sua maioria auto-incompatível. Em casos como o do café, a transferência de genes entre espécies de ploidia diferente requer uma série de processos delicados, como por exemplo, a duplicação de material genético nas células germinativas (tratamento com colchicina). Essa etapa pode ocasionar muitas vezes ploidias indesejadas, como triplicação, e também conduzir a uma

disfunção metabólica das células “injurizadas”. Além disso, a fase reprodutiva de *Coffea arabica* ocorre normalmente uma vez ao ano, o que faz com que a transferência de genes via melhoramento clássico fique restrita a esse período. Nesse caso, a simples ocorrência de intempéries na fase de floração pode causar abortamento das flores, fazendo com que o programa de melhoramento se prolongue por ainda mais tempo.

O melhoramento de espécies perenes através da obtenção de organismos geneticamente modificados tem sido apontado como uma alternativa ao melhoramento clássico. Nesse contexto, a introdução via transgenia de características desejáveis como a resistência a fatores bióticos e abióticos tende a ser facilitada, uma vez que um grande número de genes envolvidos nessas respostas ou induzidos por tais fatores em diferentes espécies tem sido identificado e caracterizado. A disponibilidade de tais genes tem ampliado ainda mais as possibilidades de manipulações por processos biotecnológicos.

Muitos destes genes têm sido identificados em projetos onde genomas inteiros foram seqüenciados, como nos casos de *Arabidopsis thaliana* (Kaul *et al.*, 2000) e do arroz (Yu *et al.*, 2002) ou em projetos nos quais foram seqüenciados milhares de cDNAs oriundos de bibliotecas construídas a partir de diferentes órgãos/tecidos e em diferentes condições de estresse, também conhecidos como projetos ESTs (*expressed sequence tags*). Como exemplo do último caso, na área vegetal destaca-se o projeto Café da Rede de Seqüenciamento financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, Embrapa, CNPq e FAPESP.

Os projetos de seqüenciamento acima citados são de extrema importância, entretanto sabe-se que a simples identificação de um gene não é garantia para a sua utilização na obtenção de transgênicos. A produção eficiente de uma proteína heteróloga em uma planta depende, por exemplo, da obtenção de altos níveis de transcrição do gene introduzido e para isso promotores altamente ativos são necessários (Rance *et al.*, 2002).

1.5 Promotores constitutivos X tecido- específicos

O promotor é o processador central da regulação de um gene uma vez que contém os sítios de ligação para os fatores de transcrição (TFs) e para a RNA polimerase responsável pela transcrição gênica. Compreende por definição a região 5' da seqüência a ser transcrita podendo se estender por algumas centenas de pares de base (pb).

A região promotora de um gene eucarioto, em geral, possui uma seqüência conservada (T/A)A(A/T) a aproximadamente 30 pb do ponto de início da transcrição, a qual é comumente denominada TATA Box, e elementos promotores proximais que estão localizados a aproximadamente 100 (CCAAT Box) e 200 pb (GC Box) acima do ponto de início da transcrição (Stephen *et al.*, 2003) Os elementos contidos em tais seqüências normalmente determinam o ponto correto de início da transcrição, bem como o local e o momento em que esse processo biológico deverá ocorrer. Nesse contexto, a região mínima de seqüência contínua

de DNA necessária para dirigir corretamente o início da transcrição de um gene pela maquinaria de transcrição, que inclui o próprio ponto de início de transcrição (+1) bem como cerca de 35 nucleotídeos acima e abaixo do mesmo, é denominada promotor principal ou *core promoter* (Butler e Kadonaga, 2002).

Os processos que proporcionam a modulação transcricional são extremamente complexos e ocorrem através de uma intrincada rede de interações envolvendo os elementos já citados e outros elementos localizados em regiões mais distantes da região *core* (“enhancers” e “silencers”). Promotores apresentam inúmeros sítios de ligação para fatores de transcrição específicos, que por sua vez são ativados sob as mais diversas situações, tais como, estímulos endógenos (auxinas, giberilinas, ácido salicílico, ácido jasmônico, etc...) e estímulos exógenos (luz, pressão, umidade, temperatura, etc...). A ação combinatória dos mesmos determina a ativação ou repressão da expressão gênica.

Os promotores constituem, portanto, uma ferramenta chave em processos biotecnológicos a fim de garantir que a expressão de um gene de interesse seja efetiva e regulada. Dentre os promotores usualmente empregados na produção de plantas geneticamente modificadas destacam-se o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV 35S), os promotores dos genes que codificam respectivamente a nopalina sintetase (*NOS*) e octopina sintetase (*OCS*) de *Agrobacterium tumefaciens* e o promotor do gene que codifica a ubiquitina (*Ubi-1*) de milho. Apesar dos grandes avanços obtidos com o emprego desses promotores, os padrões de expressão dos transgenes submetidos à regulação dos mesmos são variados e baixos em alguns casos (Zheng e Murai, 1997; Green *et*

al., 2002), não havendo garantia de expressão no órgão/tecido adequado (Neuteboom *et al.*, 2002).

O uso de promotores ubíquos, como os citados, determina a expressão do produto gênico em todos os órgãos da planta, o que nem sempre é desejável. Promotores como o CaMV 35S quando associados, por exemplo, a genes utilizados para seleção de transformantes (tais como os que conferem resistência a antibióticos) determinam, em geral, a expressão do produto gênico em todos os tecidos da planta. Tal característica, desnecessária e indesejável em plantas geneticamente modificadas destinadas, por exemplo, à alimentação animal e principalmente humana, tende a diminuir a aceitação do produto final, ou de seus derivados, pelos consumidores. Portanto, promotores tecido-específicos seriam de grande importância nestes casos, e alguns estudos já vem sendo conduzidos com esse propósito. Como exemplo podemos citar o trabalho realizado por Huang *et al.* (2001) que desenvolveram em arroz, a partir da identificação de um promotor calo-específico, um método de seleção de plantas transformadas que inviabiliza a expressão do gene de resistência ao agente de seleção em outros órgãos/tecidos, como por exemplo, no grão. Promotores com tais características permitem o correto direcionamento da expressão dos genes de interesse evitando os efeitos indesejáveis possivelmente derivados da expressão constitutiva em toda a planta.

Outro motivo de preocupação relativo ao uso de plantas geneticamente modificadas refere-se à expressão de proteínas tóxicas como as utilizadas para o controle de determinados insetos pragas. Muitos trabalhos relatam a eficiente utilização da toxina Bt (de *Bacillus thuringiensis*) em plantas transgênicas no

controle de pragas (Shu *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2000, Nester *et al.*, 2002). Entretanto, tal metodologia pode fazer com que os insetos alvo adquiriram resistência quando mantidos sob constante pressão de seleção (Meng *et al.*, 2004), o que normalmente acontece quando promotores constitutivos são utilizados para expressão das proteínas heterólogas. Adicionalmente, a presença da toxina em todas as partes da planta pode causar a insatisfação e até mesmo repulsão do produto pelo consumidor.

Esses efeitos indesejados poderiam ser minimizados através do uso de promotores órgão/tecido-específicos que, se possível, fossem responsivos a determinados estímulos como, por exemplo, a um determinado estresse biótico. Neste caso, a expressão do transgene seria limitada ao período de duração do estímulo e principalmente direcionada para o local onde o estímulo foi produzido. Promotores com tais características já têm sido isolados em diferentes espécies vegetais (Park *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002) e até mesmo sinteticamente construídos para este fim (Rushton *et al.*, 2002). Um aspecto limitante, nesses casos, refere-se às questões de propriedade intelectual que restringem a utilização dos mesmos. Por outro lado, a disponibilidade de promotores com padrões de expressão conhecidos e restritos a determinados órgãos/tecidos é praticamente inexistente em café (Tabela 1).

Tabela 1. Promotores isolados de café

Promotor	Produto do gene intacto	Órgão/tecido	Referência
11S**	Proteína de reserva 11S	Fruto/Sementes	Marraccini <i>et al.</i> , 1999
NMT*	N-metiltransferase	Folha	Satyanarayana <i>et al.</i> , 2005
CcDH2*	Dehidrina	Fruto/Sementes	Hinniger <i>et al.</i> , 2006
rbcS1**	Rubisco – subunidade menor	Folha	US Patent 7153953
Tub**	Alfa-tubulina	Ubíquo	US Patent 6903247
OLE**	Oleosina	Fruto/Sementes	WO/2007/005928
PAL**	Fenilalanina amônia-liase	Ubíquo	US Patent 6441273

**Coffea canephora*

***Coffea arabica*

A obtenção de plantas geneticamente modificadas com genes de interesse agronômico (relacionados com resistência a pragas, doenças, seca, geadas, etc...) isolados de espécies selvagens de *Coffea* representa um avanço significativo, pois permite acelerar drasticamente o processo de obtenção de novos cultivares. Nesse contexto, o direcionamento da expressão dos genes de interesse para determinados órgãos específicos da planta utilizando-se de promotores tecido/órgão-específicos provenientes da própria espécie, constitui uma importante ferramenta biotecnológica. Tal inovação viabiliza não só a construção de cassetes de expressão compostos de subunidades (promotor e gene) pertencentes ao gênero *Coffea*, mas também a obtenção de um padrão de expressão tecido-específico altamente desejável tanto do ponto de vista de biossegurança como de opinião pública. A busca por promotores com tais características tem sido uma

prioridade em programas biotecnológicos que visam a produção e liberação comercial de organismos geneticamente modificados.

1.6 Projeto Genoma Café

Em fevereiro de 2002, por iniciativa do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café) (coordenado pela Embrapa Café), em colaboração com a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, teve início o Projeto Genoma Café. O banco de dados gerado é composto por aproximadamente 37 diferentes bibliotecas de ESTs (Tabela 2) oriundas de diversos órgãos/tecidos (folhas, raízes, frutos, flores e ramos) de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e *Coffea racemosa*, órgãos/tecidos estes sadios ou submetidos a condições de estresse biótico e/ou abiótico (pragas, doenças, frio, calor, seca) em diversos estágios de desenvolvimento. Foram seqüenciados 214964 ESTs sendo 130792 de *C. arabica*, 12381 de *C. canephora* e 10566 de *C. racemosa*. Após a clusterização dos mesmos chegou-se a um valor total de 17982 contigs e 32155 *singletons*, resultando em aproximadamente 33000 diferentes seqüências (Vieira *et al.*, 2006). Buscas empregando a ferramenta Blast no Genbank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) revelou que cerca de 22% das seqüências geradas não apresentaram similaridade significativa com seqüências depositadas no banco (Vieira *et al.*, 2006).

Espera-se que as informações geradas a partir do projeto Genoma Café possam viabilizar, com maior rapidez e eficiência, o desenvolvimento de variedades tolerantes a estresse abióticos e principalmente resistentes ao ataque de pragas e doenças.

Tabela 2. Listagem das bibliotecas, e seus respectivos tecidos/tratamentos, geradas e seqüenciadas pelo projeto Genoma Café. À direita encontram-se os valores numéricos de *reads* seqüenciados por biblioteca.

Bibliotecas	Características	Números de <i>reads</i> válidos
AR1,LP1	Plântulas e folhas tratadas com ácido araquidônico	5664
BP1	Suspensão celular tratada com acibenzolar-S-methyl	12379
CB1	Suspensão celular tratada com acibenzolar-S-methyl e brassinosteróides	10311
CL2	Hipocótilos tratados com acibenzolar-S-methyl	11615
CS1	Suspensão celular tratada com NaCl	10803
EA1,IA1,IA2	Calos embriogênicos	9191
EB1	Embrião zigótico (fruto imaturo)	192
EC1	Calos embriogênicos de <i>Coffea canephora</i>	8050
EM1,S13	Sementes em germinação	9201
FB1,FB2,FB4	Botão floral em diferentes estágios de desenvolvimento	23036
FR1,FR2	Botão floral + chumbinho + frutos em diferentes estágios de maturação	14779
FR4	Frutos (<i>Coffea racemosa</i>)	7967
FV2	Frutos estágios 1,2 e 3 (<i>Coffea racemosa</i>)	7195
CA1,IC1,PC1	Calo não embriogênico com e sem 2,4 D	12135
LV4,LV5	Folhas jovens dos ramos plagiotrópicos	15067
LV8,LV9	Folhas adultas dos ramos plagiotrópicos	11864
NS1	Raízes infectadas com nematóides	569
PA1	Calo embriogênico primário	2483
RM1	Folhas infectadas com bicho-mineiro e ferrugem	5567
RT3	Raízes	560
RT5	Raízes com acibenzolar-S-methyl	2311
RT8	Células em suspensão estressadas com alumínio	9119
RX1	Ramos infectados com <i>Xylella spp.</i>	9563
SH1	Folhas de plantas em estresse hídrico (<i>Coffea canephora</i>)	368
SH2	Plantas em estresse hídrico (vários tecidos)	6824

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar promotores específicos de raiz e folha de *Coffea arabica*, ativados ou não sob condições de estresse biótico (nematóide e ferrugem), empregando-se para tal as informações do Banco de Dados do Projeto EST Genoma Café.

3. Material e Métodos

3.1 Material Vegetal

Em todos os experimentos descritos no presente trabalho foram utilizados órgãos/tecidos vegetais da espécie *Coffea arabica*, variedade Mundo Novo, material este susceptível a ferrugem, bicho mineiro e nematóide, variedade esta pertencente ao Programa de Melhoramento do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Os materiais vegetais foram mantidos no Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café "Alcides Carvalho" situado no IAC, onde também foram realizadas todas as análises empregando os mesmos.

3.2 Seleção *in silico* de ESTs com padrão de expressão órgão/tecido – específico

Os ESTs com padrão de expressão órgão/tecido-específico foram selecionados *in silico* empregando-se o banco de dados do Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Para tal foram utilizadas as ferramentas de *northern* eletrônico disponíveis no *site*.

A identificação dos ESTs órgão/tecido-específicos foi feita comparando-se os contigs presentes em dada biblioteca tecido-especifica com os contigs presentes nas demais bibliotecas. Os contigs formados por *reads* provenientes unicamente de uma determinada biblioteca e representado um determinado tecido ou órgão foram considerados tecido-específicos. Tais contigs foram então

analisados quanto à presença dos mesmos em bibliotecas oriundas de tecidos submetidos a determinados estresses. Todos os ESTs selecionados e tidos como tecido-específicos foram submetidos a análises de Blast no banco do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.br>) visando confirmação da identidade dos mesmos. Após a fase de seleção *in silico*, a especificidade a um dado tecido foi confirmada por meio da técnica de Transcrição Reversa (RT)-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos.

3.3 Extração de RNA total de café

Visando confirmar *in vivo*, via RT-PCR, a especificidade da expressão dos ESTs selecionados nas análises *in silico*, o RNA total de diferentes órgãos/tecidos de café foi extraído utilizando protocolo desenvolvido em nosso laboratório.

Amostras de flor, frutos em diferentes fases de desenvolvimento (chumbinho, chumbão, verde, verde cana e maduro), folha sadia, folha atacada com bicho mineiro, folha infectada com ferrugem, raiz sadia, raiz infectada com nematóides, foram coletadas e mantidas à -80°C até o processo de extração ser iniciado.

Aproximadamente 500 mg do tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, com auxílio de um almofariz, juntamente com 5 ml de tampão de extração (8 M Guanidina-HCl; 50 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA pH 8; 2% PVP PM 40000 e 50 mM de β -mercaptoetanol) até a obtenção de um pó fino e

homogêneo. O macerado foi então transferido para um tubo de centrifuga de 15 ml e mantido no gelo até o completo descongelamento do mesmo. Em seguida foram adicionados 5 ml de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1(v/v), homogeneizando a solução por inversão por aproximadamente 30 segundos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10000g por 15 minutos a 4°C (todas centrifugações desse protocolo foram realizadas a 4°C). Após centrifugação a fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo de 15 ml e a extração repetida com a adição de 5 ml de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v) com subsequente centrifugação a 10000g por 15 minutos. A fase superior foi novamente coletada e lavada com 1 volume de clorofórmio: isoamílico (24:1, v/v) até o completo desaparecimento de fase orgânica, sendo que entre as lavagens o material foi centrifugado por 10000g por 15 minutos e a fase superior coletada.

Com a fase aquosa livre de impurezas, o RNA foi precipitado com 0,2 volumes de acetato de sódio 1M e 1 volume de etanol absoluto gelado por 12 horas a 4°C. A amostra foi então centrifugada a 13000g por 30 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com 300 µl de acetato de sódio 3M e uma vez com 1 ml de etanol 70% gelado. O precipitado foi mantido à temperatura ambiente visando a completa evaporação do etanol, e logo após, este foi ressuscitado em 100 µl de água estéril ultra pura.

3.4 Quantificação do RNA e síntese de cDNA

Após extração, o RNA total foi analisado por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1% contendo formaldeído como agente desnaturante. O gel foi corado com brometo de etídeo 0,1 µg/ml. Após verificação da integridade, os RNAs foram quantificados em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm, assumindo que $A_{260}=1,0$ corresponde a 40 µg/ml de RNA. Após quantificação, 1 µg de RNA total foi tratado com DNase I e utilizado para síntese dos cDNAs.

Os cDNAs foram sintetizados utilizando-se o kit *ThermoScript™ RT-PCR System* (Invitrogen Life Technologies) conforme protocolo descrito pelo fabricante.

3.5 Validação dos cDNAs obtidos

Os cDNAs foram validados via RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (actin-F: GACCTCACAGATCACCTCAT, actin-R: GTAGTCTCGTGGATACCAGC) cujo alvo de amplificação é o gene ubíquo que codifica actina em café. As reações foram realizadas empregando 0.5 µl de cDNA em tampão de reação 1X contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 µM de cada oligonucleotídeo e 5 unidades (u) da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 40 segundos de polimerização a 72°C por 1 minuto.

3.6 Confirmação da especificidade de expressão

A especificidade de expressão dos ESTs selecionados nas análises *in silico* foi validada por PCR empregando-se alíquotas de cDNA dos diferentes órgãos/tecidos de café. Para tal, pares de oligonucleotídeos (*forward* e *reverso*) específicos para cada EST identificado no banco foram sintetizados (Tabelas 3 e 4) e utilizados nas reações de amplificação. Nesse caso, a seqüência de nucleotídeos do *read* mais conservado do contig selecionado foi utilizada para desenho dos oligos. As reações foram realizadas como descrito no item 3.5 (0.5 µl de cDNA, 1X PCR Buffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP mix; 0,1 µM de oligos forward e reverso; e 5 u de Taq DNA polimerase) e as condições de ciclagem estabelecidas levando-se em consideração o tamanho do fragmento amplificado e a temperatura de anelamento dos oligos gene-específicos.

3.7 Análise da indução da expressão do gene específico de raiz por fermento empregando *northern blot*

Com o intuito de verificar a possível indução da expressão do gene raiz-específico por lesão mecânica, sementes de *C. arabica* var. Mundo Novo, foram germinadas em papel de filtro umedecido com água destilada. As plântulas foram mantidas em câmara de crescimento a 28°C sob fotoperíodo de 16 horas de luz entre 30 á 40 dias, até que atingissem o grau de desenvolvimento radicular

desejado (~10 centímetros). Pequenas lesões radiculares foram induzidas artificialmente com auxílio de bisturi estéril. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 24, 48, 72 horas pós-ferimento para posterior extração de RNA total e análise por *northern blot* utilizando uma sonda específica.

O RNA total (25 µg) extraído das raízes nos tempos amostrados foi separado em procedimento padrão de eletroforese em gel desnaturante 1,2% agarose em tampão MOPS 1X. Após a eletroforese, o RNA total foi transferido por capilaridade, durante 16 horas, em solução 10X SSC para uma membrana de nylon (Hybond N+; Amersham, Buckinghamshire, UK). Após a transferência, a membrana foi levada ao forno a uma temperatura de 80°C, por cerca de 10 minutos (secagem da membrana), e em seguida, o RNA foi fixado por exposição da membrana à luz ultravioleta durante 10 segundos.

3.7.1 Marcação de sonda e hibridização da membrana

A sonda foi marcada a partir de um molde correspondente a um fragmento de 400 pb amplificado por PCR e purificado um gel de agarose. Este fragmento correspondente a uma região interna do EST específico de raiz selecionado no banco do Genoma Café, região esta, única ao EST em questão quando comparada em análise empregando a ferramenta Blast no NCBI.

Aproximadamente 50 ng de DNA foram marcados com dATP³² utilizando-se o kit *Ready-To-Go*[™] *DNA Labelling Beads* (Amersham Pharmacia Biotec). O

procedimento de marcação e purificação da sonda foi realizado conforme descrito pelo fabricante. A pré-hibridização da membrana foi realizada em solução de hibridização (50% formamida deionizada; 5X SSPE, 5X Solução Denhardts; 1% SDS) durante 4 horas a temperatura de 42°C. Após a pré-hibridização, a sonda previamente marcada com ^{32}P e desnaturada por 5 minutos a temperatura de 100°C foi cuidadosamente adicionada à solução de hibridação (50% formamida deionizada; 5X SSPE, 5X Solução Denhardts; 1% SDS), sendo a membrana incubada por 16 horas a 42°C. Após esse período, a membrana foi lavada por três vezes durante 15 minutos em solução de lavagem (2X SSC + 0,1% SDS) à temperatura de 42°C. Em seguida, a membrana foi exposta a um filme de autoradiografia por 72 horas a temperatura de -70°C sendo o mesmo posteriormente revelado.

3.8 Isolamento e identificação das regiões promotoras

A região do DNA localizada a montante (5') dos ESTs validados por RT-PCR, correspondente portanto a região regulatória dos genes em análise, foi amplificada empregando a técnica de *genome walking* e DNA genômico de café. Para tal os seguintes procedimentos foram realizados.

3.8.1 Isolamento de DNA total de folha de café

As amostras de folha foram coletadas no início da manhã, sendo selecionadas preferencialmente folhas jovens, pertencentes ao segundo par dos ramos plagiotrópicos. Após a coleta, as folhas foram lavadas com etanol 70% e água Milli-Q estéril e mantidas em nitrogênio líquido.

Aproximadamente 1 g do tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, com auxílio de um almofariz, juntamente com 7 ml de tampão de extração (350 mM de Sorbitol; 100 mM Tris-HCl pH8; 50 mM EDTA pH 8; 0,5% Bisulfito de sódio ou 50 mM de β -mercaptoetanol) até a obtenção de um pó fino e homogêneo. O macerado foi então transferido para um tubo de centrífuga de 50 ml e mantido no gelo até o completo descongelamento da amostra. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10000g por 20 minutos a 4°C. Após essa etapa o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 2,5 ml de tampão de extração. Acrescentou-se 3,5 ml de tampão de lise (200 mM Tris-HCl pH8; 50 mM EDTA pH 8; 2 M NaCl; 2% MATAB), sendo a amostra homogeneizada por inversão. Adicionou-se 700 μ l de SDS 10%, procedendo-se novas inversões até a solução ficar translúcida. Posteriormente a amostra foi incubada em banho-maria a 65°C por 30 minutos, misturando-a ocasionalmente. Após esse período os tubos foram retirados do banho e mantidos na capela até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 1 volume (~7 ml) de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v) e procedeu-se uma nova homogeneização por inversão. A emulsão foi então

submetida a centrifugação a 10000g por 20 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida cuidadosamente para um novo tubo e o DNA precipitado com 500 µl de acetato de sódio 3 M e 5 ml de isopropanol absoluto gelado, sendo mantida a -20°C por no mínimo 4 horas. Após o período de incubação a amostra foi centrifugada a 10000g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% gelado e mantido à temperatura ambiente até a completa evaporação do mesmo. O DNA foi então ressuspenso em 200 µl de solução TRIS-EDTA pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 1 mM EDTA, pH 8.0) sendo mantido acondicionado em freezer -20°C.

3.8.2 Amplificação das regiões promotoras por *genome walking* (GW)

As regiões promotoras putativas foram amplificadas utilizando-se o kit *Universal Genome Walker* (Clontech), seguindo-se a rigor o protocolo fornecido pelo fabricante.

Foram sintetizados dois oligonucleotídeos gene-específicos reversos (GSP1 e GPS2), dispostos em seqüência, para cada seqüência alvo (*read* depositado no banco). No desenho dos referidos oligos alguns parâmetros importantes foram estabelecidos: tamanho (de 25 a 28 nucleotídeos); temperatura de *melting* (~67°C) e conteúdo em G/C (de 40 a 60%). Para ambos genes com expressão tecido-

específica em análise, os GSPs foram posicionados o mais próximo da região 5' do EST cuja sequência estava disponível no banco.

Para a construção das bibliotecas de GW, quatro alíquotas de DNA genômico de café (20 µg/cada) foram digeridas separadamente com as enzimas de restrição *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, durante 18 horas, sendo a digestão monitorada periodicamente em gel de agarose. As amostras digeridas com as enzimas *EcoRV* e *PvuII* não ficaram boas, sendo as mesmas descartadas.

Após digestão do DNA genômico com as enzimas *DraI* e *StuI*, adaptadores foram ligados à porção terminal dos fragmentos originados para a montagem das bibliotecas. Visando a amplificação das regiões promotoras, alíquotas de DNA das bibliotecas foram submetidas a *rounds* de amplificação por PCR (de acordo com o protocolo do fabricante) utilizando-se dos oligos GSP1/GPS2 e oligonucleotídeos complementares aos adaptadores (AP1/AP2). Amostras foram analisadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.8.3 Isolamento, purificação e clonagem das regiões promotoras

Os fragmentos únicos amplificados na etapa de GW foram retirados do gel de agarose com auxílio de uma lâmina descartável, e purificados utilizando-se o kit *QIAEX II Gel Extraction* (Quiagen) de acordo com especificações fornecidas pelo fabricante. O DNA foi eluído da coluna utilizando-se água ultrapura a 70°C e não

com solução TRIS-EDTA (TE), a fim de eliminar possível interferência do EDTA em futuras ligações do inserto ao vetor.

Os produtos de amplificação purificados foram em seguida inseridos no vetor pGEM® -T Easy (Promega). Alíquotas de aproximadamente 150 ng de DNA foram dispostas em microtubo de 1 ml juntamente com 50% de Tampão de Ligação 2X, 50 ng de vetor e 5 u de T4 DNA ligase. A reação de ligação permaneceu por 16 horas à 14°C. Após esse período, uma alíquota do produto de ligação foi inserida em *Escherichia coli* cepa DH5α por eletroporação.

Antes da eletroporação propriamente dita, células competentes de *E. coli* cepa DH5α foram preparadas conforme descrito por Sambrook & Russel (2001), e alíquotadas em tubos de 1ml e acondicionadas a -80°C.

No processo de eletroporação foram utilizados o equipamento BioRad modelo Gene Pulser II e cubetas estéreis do mesmo fabricante. Foram aplicados pulsos de 2.200-volts em 38 µl de células competentes adicionadas de 2 µl (~40 ng) do produto da ligação, totalizando um volume de reação 40 µl. Vale a pena ressaltar que antes de efetuar os pulsos tanto a cubeta quanto as amostras foram mantidas no gelo.

Imediatamente após o pulso, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio Luria-Bertani (LB) líquido (10 g triptono; 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl), transferidas para tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e mantidas sob agitação constante de 300 rpm a 37°C durante 1 hora. Em seguida 300 µl da cultura foram plaqueados em placas de Petri contendo meio LB sólido acrescido do antibiótico apropriado, no caso ampicilina (100 mg/l) e contendo IPTG (24 mg/l) (isopropyl-β-

D-thiogalactopyranoside) e X-Gal (20 mg/l). As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 16 horas.

3.8.4 Minipreparação de DNA plasmidial e seqüenciamento dos insertos

Foram selecionados três clones de cada evento de transformação para validação quanto à presença do plasmídeo recombinante. Prováveis colônias recombinantes (brancas) foram repicadas em 3 ml de meio LB líquido acrescido de ampicilina 100 mg/l e mantidas sob agitação constante de 300 rpm a 37°C durante 16 horas. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas e sucessivas minipreparações de DNA plasmidial foram realizadas, utilizando-se o *QIAGEN Kit Miniprep* (Quiagen), conforme descrito pelo fabricante.

Os plasmídeos foram analisados via padrão de digestão com *EcoRI* e visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As digestões foram realizadas a 37°C na presença de tampão de reação 1X, 30 ng de DNA plasmidial e água. Confirmada a presença do inserto, o DNA plasmidial (200 ng) foi submetido a uma reação de seqüenciamento empregando o *ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing* kit (Applied Biosystems). Foram seqüenciados 3 clones de cada evento utilizando um equipamento automático modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

As seqüências foram analisadas utilizando-se o programa Chromas 2.30 e um consenso a partir dos três clones seqüenciados foi obtido. Um PCR de validação foi realizado a fim de confirmar a sobreposição das regiões amplificadas em relação aos seus respectivos ESTs. Para tal foram utilizados oligos *forward* desenhados com base nas seqüências promotoras putativas obtidas e os oligos reversos gene-específicos GSP1 e GSP2. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.8.5 Análise das seqüências e busca de domínios regulatórios

As seqüências obtidas foram submetidas a análises comparativas com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI usando Blastn. Ao mesmo tempo foram realizadas buscas por motivos regulatórios normalmente presentes em regiões promotoras de genes de plantas utilizando o banco do *PLACE database* (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) (Higo *et al.*, 1999).

3.9 Análise funcional das regiões promotoras através de expressão transiente em raiz e folha de *Coffea arabica*

Antes de darmos início às análises funcionais através de transformação estável em tabaco, a funcionalidade das regiões promotoras isoladas foi testada em experimentos de expressão transiente via biobalística, utilizando-se para tal, plântulas de *Coffea arabica* variedade Mundo Novo.

Cerca de cem sementes foram esterilizadas em hipoclorito de sódio, na concentração de 1% de cloro ativo, durante 30 minutos. As sementes foram então lavadas em abundância com água Milli-Q estéril, depositadas em papel de germinação e mantidas em câmara de crescimento a uma temperatura de 30°C durante aproximadamente 40 dias, até atingirem o tamanho desejado (denominado de orelha de onça).

A fim de testar a viabilidade do processo de expressão transiente via biobalística em café (dados não disponíveis na literatura), utilizou-se inicialmente o vetor pRT103-Gus (pRT103 modificado; Töpfer *et al.*, 1987) como controle. Este vetor apresenta o gene repórter *uidA* (que codifica a β -glucuronidase - Gus) sob o controle do promotor constitutivo 35S de CaMV (Figura 4).

Foram realizados testes de biobalística com dois diferentes tipos de micropartícula, sendo testados ouro e tungstênio. Realizamos também testes com pressão de disparo de 1100 e 600 psi, respectivamente.

3.9.1 Preparação das micropartículas

Ambas micropartículas foram preparadas em paralelo (ouro *BioRad* 1.0 micron e tungstênio M25 *BioRad*), seguindo protocolo descrito por pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas (Manual de Transformação Genética de Plantas).

Trinta miligramas de cada micropartícula foram transferidos para tubos de microcentrifuga e tratados com 1 ml de etanol 70% durante 15 minutos sob agitação baixa constante. Amostras foram centrifugadas a 15000g durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet lavado 3 vezes com água Milli-Q estéril, com sucessivas centrifugações (5 minutos a 15000g) entre as lavagens. Após a última lavagem descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 500 µl de glicerol 50% estéril, distribuindo-se em alíquotas de 50 µl (~ 60 mg/ml) e estocando-as a -20°C.

Às alíquotas de micropartículas foram adicionados cerca de 10 µg de DNA plasmidial (na concentração de 1 µg/µl), 50 µl de CaCl₂ 2,5 mM, 20 µl de espermidina 100 mM, homogeneizando-as imediatamente e mantendo-as sob agitação lenta durante 10 minutos. Uma centrifugação por 10 segundos a 8000g visando uma leve sedimentação das micropartículas foi então realizada. O sobrenadante foi descartado e o pellet cuidadosamente lavado duas vezes com 150 µl de etanol 70% e uma vez com etanol absoluto. As amostras foram

ressuspensas em 60 µl de etanol absoluto, e dispostas em alíquotas de 10 µl por membrana de disparo (capton 50 micra).

3.9.2 Teste controle de biobalística e ensaio enzimático de Gus

Nos experimentos de biobalística foi utilizado um acelerador de partículas (Biomics) desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos. Foram utilizadas plântulas de café (variedade Mundo Novo) com aproximadamente 45 dias pós-germinação em estágio de orelha de onça.

Durante os experimentos quase todos os parâmetros físicos variáveis de bombardeio foram mantidos constantes. Apenas o tipo de micropartícula (ouro ou tungstênio) e a pressão de disparo (1100 ou 600 psi de gás hélio) foram modificados.

Foram realizados quatro disparos controle (pRT103 - Gus) por lote de seis plântulas, sendo dois disparos na região epicotiledonar e dois na região hipocotiledonar, alterando os parâmetros acima descritos (micropartícula/pressão), a fim de verificar a melhor forma de obtenção de expressão transiente de Gus em folhas e raízes de café.

O ensaio enzimático de revelação de Gus foi feito após 48 horas. O material bombardeado foi submerso em solução de 50 mM de fosfato de sódio pH 7.5, 10 mM Na₂EDTA, 0.1% Sarcosil, 0.1% Triton X-100, 5 mM Ferrocianato de potássio,

5 mM Ferrocianeto de potássio, 10 mM β -mercaptoetanol e 1 mM do substrato X-Gluc. As amostras foram mantidas no escuro a temperatura de 30°C durante 16 horas. Após esse período o material foi lavado com etanol 70%, visando o bloqueio da atividade de Gus e a completa retirada da clorofila (no caso das folhas), e então fixado em glicerol 50%.

3.9.3 Construção do cassete de expressão no vetor pRT103

– Gus

Para viabilizar a clonagem dos fragmentos obtidos por GW (putativas regiões promotoras) no vetor pRT103-Gus, oligonucleotídeos específicos foram desenhados visando a amplificação completa das seqüências regulatórias em estudo. Sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *HindIII* na região 5' (oligo forward) e *NcoI* na região 3' (oligo reverso) foram adicionados aos mesmos para viabilizar a clonagem dos produtos amplificados no vetor pRT103-Gus igualmente digerido. Assim procedendo, o promotor 35S do vetor é substituído pela seqüência promotora em análise de tal forma que o códon de iniciação do gene *gus* fique em fase como o primeiro nucleotídeo da região regulatória a ser testada. Cabe citar que foram escolhidas as enzimas *HindIII* e *NcoI*, pois em testes de digestão estas não clivavam os fragmentos amplificados por GW.

Como o vetor pRT103-Gus (Figura 4) apresenta dois sítios de restrição para a enzima *Hind*III (circulado em vermelho), foi necessário realizar digestão parcial do vetor para a retirada do promotor 35S (Figura 5).

Quatro alíquotas de aproximadamente 500 ng de pRT103-Gus foram digeridas com 10 unidades (u) da enzima de *Nco*I a 37°C durante 3 horas. Depois de monitorada, via gel de agarose, a linearização completa do vetor (Figura 5A), este foi submetido a diferentes digestões com 5 u de *Hind*III em tempos de 5, 7, 10 e 15 minutos (Figura 5B). Verificou-se que a interrupção da reação após 10 minutos gerava produtos de digestão parcial que continham o fragmento desejado (pRT103-Gus sem o promotor 35S). Repetiu-se então o processo de digestão no tempo acima citado, e um fragmento de aproximadamente 4.3 kb, correspondente ao vetor pRT103-Gus sem o promotor 35S, foi isolado e purificado do gel de agarose utilizando-se o kit *QIAEX II Gel Extraction* (QIAGEN).

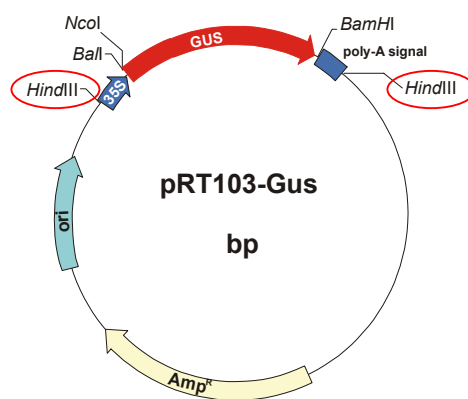


Figura 4. Representação esquemática do vetor pRT103-Gus (~5 Kb) que apresenta o gene repórter *uidA* (GUS) inserido entre os sítios *Bam*HI e *Nco*I sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S. As posições dos sítios *Hind*III estão indicadas por um círculo vermelho. Adaptado de Töpfer *et al.* (1987).

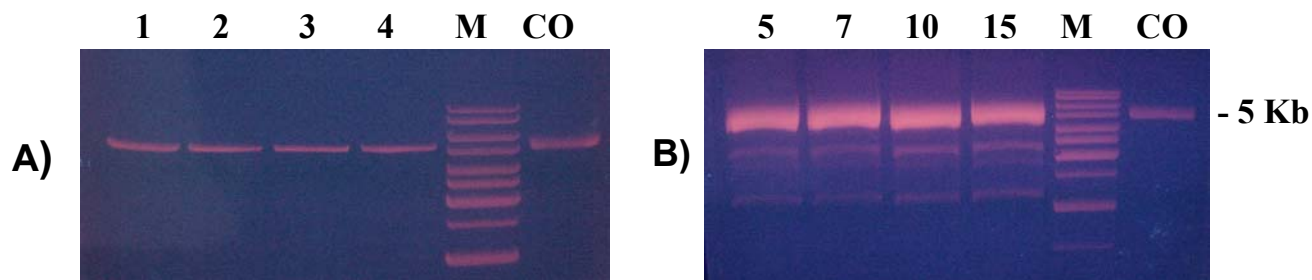


Figura 5. Ensaio de digestão parcial do vetor pRT103-Gus visando a retirada do promotor constitutivo CaMV35S. Quatro amostras de 500 ng de pRT103-Gus foram linearizadas com 10 u *NcoI* a 37°C durante 3 horas e analisadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (A). Digestões parciais posteriores com *HindIII* com duração de 5, 7, 10 e 15 minutos (B) revelaram que o melhor tempo para o isolamento do fragmento correspondente ao vetor sem o promotor CaMV35S encontra-se no tempo de 10 minutos. M, marcador de peso molecular; CO, controle plasmídeo linearizado.

As ligações foram realizadas na proporção de 3:1 (inserto : vetor) durante 18 horas a 16°C, sendo os produtos de ligação posteriormente utilizados para transformação de *E. coli* eletrocompetente, cepa DH5 α . As transformações foram realizadas em eletroporador (*BioRad*) como descrito, plaqueadas em meio LB seletivo contendo antibiótico apropriado (ampicilina 100 μ g/ml) e colocadas para crescer em estufa a 37°C durante 18 horas.

Cinco clones de cada construção foram repicados e colocados para crescer em meio LB líquido seletivo a 37°C durante 16 horas sob agitação constante (200 rpm). Minipreparações de DNA plasmidial dos clones obtidos e ensaios de digestão com enzimas de restrição foram realizados para confirmar a correta

inserção dos fragmentos promotores no vetor. As seguintes construções foram então obtidas: promotor do gene com expressão específica em raiz fusionado transcricionalmente ao gene da *uidA* (Figura 6A) e promotor do gene com expressão específica em folha fusionado transcricionalmente ao gene da *uidA* (Figura 6B).

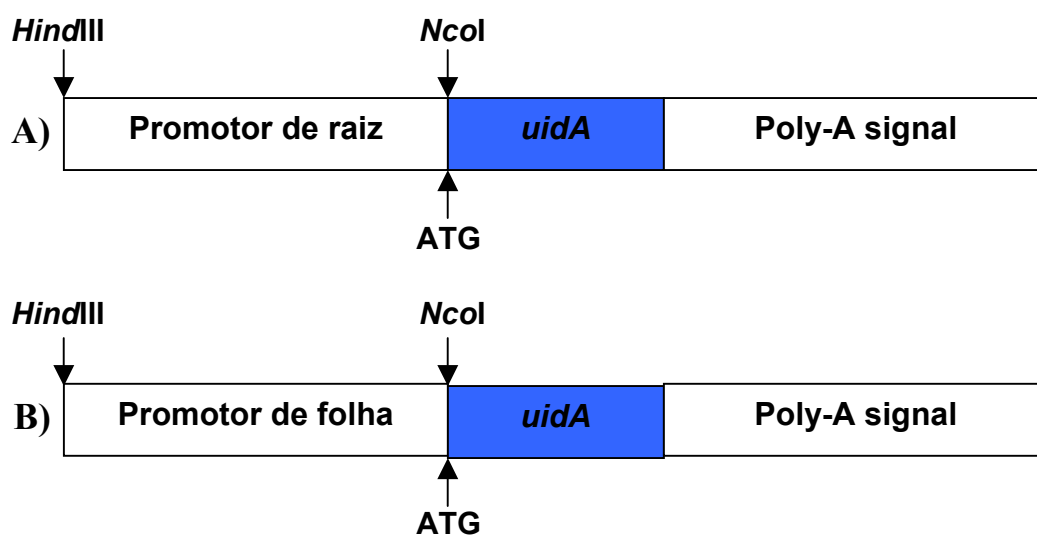


Figura 6. Representação esquemática dos cassetes de expressão desenvolvidos para a análise funcional das regiões promotoras amplificadas via *genome walking* (os promotores não se encontram em escala). A) Promotor do gene com expressão específica em raiz fusionado ao gene repórter *uidA* e B) Promotor do gene com expressão específica em folha fusionado ao gene repórter *uidA*. Os cassetes foram inseridos em vetor pRT103-Gus desprovido do promotor CaMV35S.

3.9.4 Ensaio de expressão transiente em folha e raiz de *Coffea arabica* via biobalística

Os plasmídeos contendo os cassetes de expressão usados nos ensaios de expressão transiente (Figura 6) foram purificados empregando-se o *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Após as preparações, alíquotas do DNA plasmidial foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm e as amostras ajustadas para a concentração final desejada (1 µg/µl).

Para os ensaios de biobalística foram utilizadas as construções abaixo relacionadas e como controle positivo o vetor pRT103-Gus fechado, isto é, contendo o gene *uidA* sob controle do promotor CaMV35S. Os tratamentos foram:

- Construção 1 - Controle positivo CaMV35S + Gus
- Construção 2 - Promotor específico de folha + Gus
- Construção 3 - Promotor específico de raiz + Gus

Todas construções foram bombardeadas tanto na região hipocotiledonar como na epicotiledonar adotando os procedimentos descritos no protocolo do Manual de Transformação Genética de Plantas, produzido pela Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas, com algumas modificações. Foram realizados 8 disparos por planta, sendo quatro na região hipocotiledonar (1100 psi), dois disparos de cada

lado da plântula e quatro na região epicotiledonar (600 psi), sendo repetida as inversões.

Após os ensaios de biobalística, o material vegetal foi mantido em papel de germinação umedecido com água Milli-Q em câmara de crescimento a 30°C durante 48 horas, tempo após o qual foi iniciado o ensaio enzimático de revelação. A revelação foi realizada como descrito anteriormente (item 3.9.2) e o material analisado em lupa e em microscópio óptico.

3.10 Construção do cassete de expressão em pCAMBIA-1381 visando transformação estável em tabaco

Cerca de 1 µg dos plasmídeos pRT103 contendo os cassetes de expressão em análise, utilizados e principalmente funcionais em experimentos de expressão transiente, foram digeridos a 37°C durante 3 horas com as enzimas de restrição *HindIII* e *NcoI* para a excisão das regiões promotoras. O vetor de transformação pCAMBIA-1381 (Figura 7) foi igualmente digerido com *HindIII* e *NcoI*.

As ligações foram realizadas na proporção de 3:1 (inserto : vetor) durante 18 horas a 16°C, sendo os produtos de ligação posteriormente utilizados para transformação de *E. coli* eletrocompetente, cepa DH5α. As bactérias foram então plaqueadas em meio LB seletivo contendo antibiótico apropriado (canamicina 100 µg/ml) e incubadas em estufa a 37°C durante 18 horas.

Três clones de cada construção foram repicados em meio LB líquido seletivo e colocados para crescer a 37 °C durante 16 horas sob agitação constante (200 rpm). Após a obtenção do DNA plasmidial, estes foram seqüenciados em seqüenciador automático visando analisar se as regiões promotoras aqui identificadas encontravam-se corretamente fusionadas ao gene *uidA* do vetor pCAMBIA-1381.

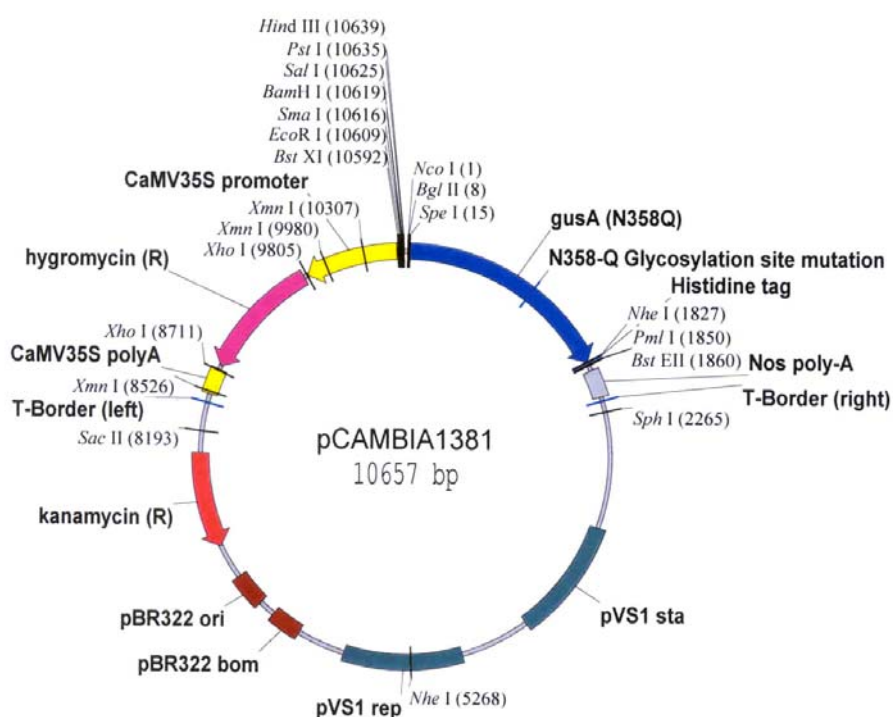


Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA-1381 (Cambia) utilizado na construção dos cassetes de expressão visando a posterior transformação estável de tabaco empregando *Agrobacterium tumefaciens*. Os promotores identificados nesse trabalho foram clonados entre os sítios *Hind*III e *Nco*I em fusão com o gene repórter *uidA* (Fonte: <http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.html>).

3.11 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 por eletroporação e confirmação das células transformadas

Células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 foram transformadas com as referidas construções conforme descrito no item 3.9.3, entretanto com algumas modificações. No processo de eletroporação foram aplicados pulsos de 2.200-Volts em 38 µl de células competentes contendo 2 µl (~40 ng) da ligação. Imediatamente após o pulso, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio YEP líquido (10 g triptona; 10 g extrato de levedura, 10 g NaCl), transferidas para tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e mantidas sob agitação constante de 300 rpm a 28°C durante 4 horas. Após esse período, 300 µl foram plaqueados em meio YEP sólido acrescido de antibiótico apropriado, no caso canamicina 100 µg/ml, estreptomocina 300 µg/ml e rifampicina 100 µg/ml. As placas foram mantidas em estufa a 28°C durante 48 horas.

Após esse período, três clones de cada construção foram repicados em 3 ml de meio YEP líquido seletivo (contendo canamicina 100 µg/ml, estreptomocina 300 µg/ml e rifampicina 100 µg/ml) e a cultura permaneceu em estufa a 28°C durante 48 horas sob agitação constante de 200 rpm. Minipreparações de DNA plasmidial (*QIAGEN Kit Miniprep*) e análises de PCR utilizando-se de oligos

específicos foram realizadas a fim de confirmar a transformação das agrobactérias.

3.12 Obtenção de plantas transgênicas de tabaco

As agrobactérias transformadas com os cassetes de expressão contendo os promotores de raiz e folha, respectivamente, foram incubadas em 5 ml de meio YEP líquido seletivo com agitação entre 100-150 rpm a 28°C, até atingirem uma absorbância (600 nm) entre 0.5 e 1. Posteriormente, 1 ml do inóculo de cada construção foi transferido para um tubo de centrifuga de 50 ml, ao qual foi adicionado 4 ml de meio YEP líquido. Tais amostras foram mantidas à temperatura ambiente até a utilização.

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) cultivadas *in vitro* foram utilizadas no processo de transformação. Discos foliares de 1 cm² foram retirados com auxílio de um vazador de ferro previamente esterilizado, e mantidos em placa de Petri até o processo de transformação. Para cada construção foram utilizadas cinco placas de Petri com dez discos foliares cada. Os discos foram imersos por 15 minutos no meio YEP contendo as agrobactérias sendo posteriormente secos em papel de filtro estéril e transferidos para placas contendo meio MS sólido (Murashige & Skoog, 1962). Essas placas foram mantidas no escuro durante 48 horas em sala de crescimento a 28°C. Após esse período, os discos foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS sólido adicionado de 100

$\mu\text{g/ml}$ de higromicina, 500 $\mu\text{g/ml}$ de cefotaxima, 1 $\mu\text{g/ml}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 100 $\mu\text{g/ml}$ ácido naftalenoacético (ANA). As placas foram mantidas por aproximadamente 30 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz até o surgimento de calos. Como controle positivo foram utilizados discos foliares não transformados mantidos no meio seletivo acima citado. Posteriormente as pequenas plântulas formadas a partir desses calos foram individualizadas em potes de vidro contendo meio de enraizamento (meio MS descrito acima, porém desprovido do hormônio 6-benzilaminopurina) para indução da formação de raízes.

3.13 Análise dos transformantes via PCR e ensaio enzimático de Gus

Foram regeneradas 17 plantas transformadas com a construção contendo o promotor específico de folha e 27 com a construção contendo o promotor específico de raiz, respectivamente. A fim de confirmar a inserção dos cassete de expressão, DNA genômico das prováveis plantas transgênicas foi extraído a partir de tecido foliar, utilizando o protocolo descrito por Konieczny e Ausubel (1993), com algumas modificações.

Cerca de 100 mg de tecido foliar de tabaco, previamente macerado em nitrogênio líquido, foram transferidos para tubo de microcentrífuga e a este adicionado 500 μl de tampão de extração, contendo 100 mM Tris pH 8, 50 mM

EDTA pH8, 500 mM NaCl, 10 mM de β -mercaptoetanol e 35 μ l de SDS 20%. As amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos e após esse período foi adicionado 130 μ l de acetato de potássio 5 M. Em seguida as amostras foram mantidas durante 5 minutos no gelo e posteriormente centrifugadas durante 15 minutos a 15000g. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo, e o DNA precipitado com 640 μ l de isopropanol e 60 μ l de acetato de sódio 3 M, permanecendo durante 30 minutos a -20°C. As amostras foram então centrifugadas a 15000g durante 15 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento (DNA) lavado com 500 μ l de etanol 70% gelado. Após a completa secagem do mesmo, o DNA foi ressuspensão em 50 μ l de água Milli-Q.

A inserção dos cassetes de expressão nas plantas regeneradas foi confirmada em reações de PCR empregando 2 μ l de DNA genômico em tampão de reação 1X, contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 μ M oligonucleotídeo específicos *forward* e *reverso*, e 5 u de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As plantas tidas como positivas na reação de PCR foram submetidas a ensaio histoquímico de Gus como descrito no item 3.9.2.

3.14 Análise da expressão do gene repórter *uidA* em plantas transgênicas transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor específico de folha em resposta a dano mecânico

Para tal foram analisadas aleatoriamente cinco plantas da geração F1 de cinco diferentes eventos de transformação (sendo amostrado portanto um total de vinte e cinco plantas), todas positivas em análise de PCR e em ensaio histoquímico de Gus. Plântulas de aproximadamente 30 d.a.g (dias após germinação) tiveram parte de suas folhas lesionadas, com auxílio de uma pinça estéril e 4 horas após tratamento, as mesmas foram submetidas a ensaio histoquímico de Gus como descrito no item 3.9.2.

3.15 Análise da expressão do gene repórter *uidA* em plantas transgênicas transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz em resposta ao ataque de nematóides

Neste experimento foram utilizados nematóides da espécie *Meloidogyne javanica* reproduzidos e isolados de tomateiros. Aproximadamente 300 gramas de

tecido radicular infectado com *M. javanica* foram triturados durante 30 segundos, com auxílio de um liquidificador comercial, em 200 ml de hipoclorito de sódio a 0,05%. A solução foi então peneirada em telas de nylon de 250 e 25 μ M, respectivamente. O material depositado na peneira de 250 μ M foi descartado (restos de tecido radicular) e o retido na peneira de 25 μ M (ovos e nematóides em estágio juvenil) foi enxaguado com água em abundância, visando a completa retirada do hipoclorito de sódio. Posteriormente o material foi coletado, diluído em 200 ml de água potável e transferido para um Becker de vidro. Esta solução foi mantida sob aeração constante, com auxílio de uma bomba de aquário, e mantida em banho-maria a 28°C durante 72 horas no escuro. Esta etapa é de extrema importância a fim de obter um inoculo homogêneo, com grande quantidade de nematóides em estágio juvenil. Após esse período, uma amostra de 1 ml da solução foi analisada em microscópio óptico e uma contagem estimada do número de nematóides foi realizada. Foram inoculadas 60 plantas, sendo amostradas aleatoriamente 12 plantas de 5 diferentes eventos de transformação, todas positivas em ensaio de PCR, utilizando-se para tal, aproximadamente 4.000 nematóides em estágio juvenil por planta. As plantas inoculadas foram submetidas a ensaio histoquímico de Gus, como descrito no item 3.9.2, após 24, 72 e 336 (14 dias) horas de tratamento.

4. Resultados

4.1 Seleção *in silico* de ESTs órgão/tecido-específicos

As análises *in silico* dos genes com expressão órgão/tecido-específica foram realizadas utilizando-se as informações e ferramentas disponíveis no Banco de Dados do projeto EST Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Para tal, critérios mencionados no item 3.2 foram seguidos.

Durante as análises foram identificadas treze seqüências com provável expressão específica em raiz, isto é, contigs formados unicamente por *reads* oriundos de bibliotecas de tecido radicular (Tabela 3) e quinze seqüências com provável expressão específica em folha, ou seja, contigs formados unicamente por *reads* provenientes de bibliotecas de folha (Tabela 4). A fim de confirmar a identidade dos candidatos selecionados, as seqüências de nucleotídeos dos ESTs correspondentes foram anotadas manualmente e comparadas com as seqüências depositadas no Genbank (NCBI). Pares de oligos específicos aos candidatos selecionados foram sintetizados (Tabela 3 e 4) e utilizados em experimentos de validação por RT-PCR empregando RNA total extraído de diferentes órgãos/tecidos de café.

Tabela 3. Listagem dos candidatos identificados via análise de *northern* eletrônico, apresentado padrão de expressão específico em raiz. As seqüências dos oligonucleotídeos empregados para validação da especificidade dos ESTs selecionados *in silico* estão disponibilizadas.

<i>Cluster</i>	<i>Blast</i>	RT-PCR	Oligos (5' - 3')
CART8-061-D05	Glutathione S-Tranferase Peroxidase	N	F-ATTGATGAGGTTTGGCATGA R-CCTTTTCAGGATCAGCAAGG
CART5-010-E02	Peroxidase (EC 1.11.1.7) Isozyme 40K Precursor	R, L	F-AAGCAGGCTTTCGTTTCTCA R-CCCTTGGAAGAACTCACTGC
Contig 126944	Disease Resistance Protein (CC-NBS class)	Todos	F-CAAGGGCTTCTCTCCTCCTT R-TTTGGTGACGAGTCCCCTTGT
Contig 13823	Phosphomannose Isomerase	R, L	F-GTAGGCTGCCGTTTTTGTCT R-AGAACGTACGTAGCGCCTTG
Contig 13619	Alcohol Dehydrogenase	R, L, F	F-TGTTCTCGTTGTGTCGATCAG R-GTACCATCGAAGGCATGAGC
Contig 13952	Putative Regulatory Protein	Todos	F-TGTTCTCGTTGTGTCGATCAG R-TGGATCATCGGGATCAATTT
Contig 219558	Putative Peroxidase	R, F	F-GGCACCTTTTCTGATTCAA R-GTGCCTCCTTTTCTCCTTGG
Contig 3887	PRUAR Major allergen Pru ar 1	Todos	F-GTTGGTATTGCGCTTGAGGT R-TTACCAAGATGCTGCCACAG
Contig 6221	Pectin Methylesterase	Todos	F-GCAATTGCACCAAGTGAAGA R-TTGGGAATGCATCAATCTTGC
Contig 2507	Putative Germin-like Protein	R, F	F-TTGCAGGATTTTTGTGTTGC R-AAGAACGCCCTCTAACACGA
Contig 5896	Pathogen-Inducible Alpha-Dioxygenase	R, F	F-TGAGCCCACTAACAAATCC R-TATCAATGGGTCACCAAGCA
Contig118723	Glutathione S-Transferase	R, L, F	F-TTTGCAAAGCCCGTAAGAAT R-GCCCAGAACTTTGAGTGAGC

R – Raiz; L – Folha; F – Fruto; N – Não houve amplificação; Todos – Houve amplificação em todos os órgãos/tecidos analisados.

Tabela 4. Listagem dos candidatos identificados via análise por *northern* eletrônico, apresentando padrão de expressão específico em folha. As seqüências dos oligonucleotídeos empregados para validação da especificidade dos ESTs selecionado *in silico* estão disponibilizadas.

Cluster	Blast	RT-PCR	Oligos (5'- 3')
CALV5-050-G01	NBS-LRR- Similar Type Resistance Gene	L,F,R	F-GGGAACAAAGCATGATCACA R-TAGGATTTGCGCAGGTAGGT
Contig 13074	Disease Resistance-like Protein	Todos	F-AAGCAGACCGACCGACTCTA R-AGAACGTACGTAGCGCCTTG
Contig 619	Hypothetical Protein	L,F	F-GCGAAAATACCACCAGCAG R-CTGCTGTTGCACGAAACCGC
Contig 13743	Hypothetical Protein	Todos	F-GGCACCTTTTCTGATTCAA R-GTGCCTCCTTTTCTCCTTGG
Contig 12440	Oxidoreductase - Zinc-binding Dehydrogenase Family	L,R	F-GAAAGCCTGACGCTGGTAGA R-GCAATACGACGGCTCACAC
Contig 1117	Sensory Box Histidine Kinase-Response Regulator	N	F-AAGGCTTCCTTGGCTTCTTC R-GCAACTCGATGGTGTGATCT
Contig 12571	Thioredoxin-like Protein CDSP32	L,F,R	F-TGAAGCTGCTGCCTTAACAA R-TGAAGCATCTGCACCATCTC
Contig 142	Carbonic Anhydrase	Todos	F-TTCTCCACCTTGAGATGCAA R-TCGATGCAGTCGAGAAGTTG
Contig 12073	CITLA Malate Dehydrogenase	L, F	F-GATCAGCAATCCCGTGAAC R-ACACCAGCATCACCCCTAAG
Contig 11772	Cytochrome B6-F Complex Iron-Sulfur Subunit 1	N	F-AAGTCGCCAGTGCCTGTCT R-CAAGTGTGCCTGCTGATGAT
Contig 12251	GOSHI Catalase Isozyme 1	Todos	F-TACTCCACAAGTGGGCTTCC R-TTGATCTGGTGGGGAACAAT
Contig 12440	Chloroplast Ferredoxin Oxidoreductase precursor	L,F	F-TGTCATCGATTCCCTTCTCC R-CGGGAAAGAAATGCTAATGC
Contig 12327	Fructose-Bisphosphate Aldolase	L,F,R	F-AGCTCCTCTTCACCTCACCA R-GCTCCGATGGTTTCAGTAGGA
Contig 12717	Photosystem I Subunit XI	L,F	F-TCTCTGCAGCTCCATTGAGA R-TTGATGTCGGTGTTCCTCAA

R – Raiz; L – Folha; F – Fruto; N – Não houve amplificação; Todos – Houve amplificação em todos os órgãos/tecidos analisados.

4.2 Extração e quantificação de RNA total de diferentes órgãos de *Coffea arabica* e de frutos em diferentes fases de amadurecimento. Síntese e validação da integridade dos cDNAs

Amostras de RNA total de diferentes órgãos de *C. arabica*, com ou sem estresse, e de frutos em diferentes fases de maturação, foram extraídas e os respectivos cDNAs sintetizados empregando a enzima *Superscript III* e oligo-dT (Invitrogen). A fim de avaliar a integridade e a qualidade dos cDNAs sintetizados na RT, uma amplificação prévia foi realizada empregando-se oligos específicos para o gene que codifica actina em café. Conforme pode ser constatado na Figura 8, uma banda de tamanho esperado foi amplificada em todas as amostras analisadas, indicando haver uma concentração similar de cDNA entre os diferentes órgãos analisados.

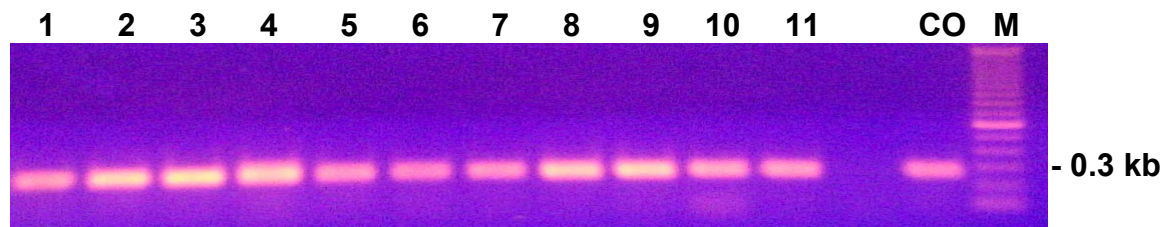


Figura 8. Amplificação por RT-PCR de um transcrito ubíquo codificando actina. O produto esperado de 300 pb foi observado em todas as amostras analisadas (1- chumbinho, 2- chumbão, 3- fruto verde, 4- fruto verde-cana, 5- fruto maduro, 6- folha sadia, 7- folha infectada com bicho mineiro (6 dias), 8- folha infectada com bicho mineiro (11 dias), 9- raiz sadia, 10- raiz infectada com nematóide (24 horas), 11- raiz infectada com nematóide (72 horas), CO - controle positivo, M- marcador de peso molecular. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo.

4.3 Confirmação da especificidade de expressão dos candidatos selecionados *in silico*

Treze candidatos com provável expressão em raízes (Tabela 3) e quinze com provável expressão em folha (Tabela 4) foram selecionados nas análises *in silico*. A verificação da especificidade de expressão foi realizada através de PCR utilizando todos os cDNAs sintetizados e testados anteriormente e oligonucleotídeos desenhados para cada um dos candidatos em análise. Esses experimentos confirmaram a expressão órgão-específica de dois desses

candidatos sendo um expresso exclusivamente em raiz (Figura 9) e outro em folha (Figura 10).

O EST validado como sendo específico de raiz foi identificado no banco de dados do projeto Genoma Café como uma seqüência única (*singleton*), presente em biblioteca de raiz induzida com benzothiadiazole (acibenzolar-S-methyl) (BHT), análogo do ácido salicílico. Essa seqüência quando submetida ao banco de ESTs do café não se alinha com nenhuma outra seqüência, representando portanto um transcrito único. Já o EST cujo padrão de expressão foi validado como sendo específico de folha é formado por um contig composto por *reads* provenientes das bibliotecas de folhas infectadas com ferrugem e folhas sadias (Tabela 2), respectivamente.

Uma análise detalhada dos resultados de RT-PCR obtidos para o candidato com expressão em raiz demonstra a amplificação de um fragmento de tamanho esperado (500 pb) na amostra de cDNA proveniente de tecido radicular (Figura 9; linha 8). Nenhum produto de amplificação foi observado nos demais órgãos/tecidos analisados. Adicionalmente, uma banda de maior intensidade, provavelmente refletindo um maior acúmulo do transcrito em questão, foi observada em tecido radicular infectado com nematóides (Figura 9; linhas 9, 10 e 11), sugerindo que o gene em questão é induzido pelo ataque de nematóides.

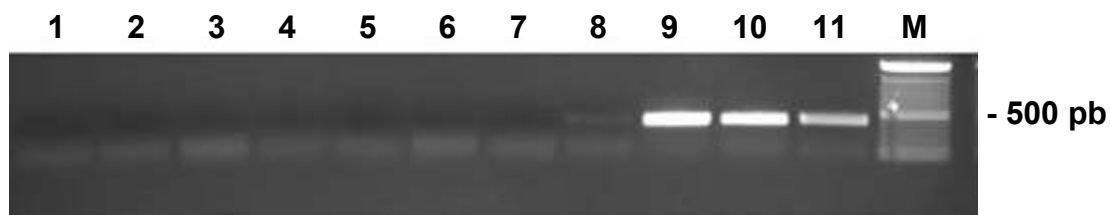


Figura 9. Análise de RT-PCR revelando amplificação de transcrito específico de raiz em *Coffea arabica*, variedade Mundo Novo. A amplificação de um fragmento de tamanho esperado (500 pb) em amostras provenientes de RNA total de raiz demonstra que o gene é somente expresso nesse órgão. Um aumento de expressão desse gene em raízes infectadas por nematóides pode ser observada (comparar linhas 8, 9, 10 e 11). As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo. Amostras: 1- chumbinho, 2- chumbão, 3- fruto verde, 4- fruto verde-cana, 5- fruto maduro, 6- folha sadia, 7- folha atacada por bicho mineiro, 8- raiz sadia, 9- raiz infectada com nematóide (24 horas), 10- raiz infectada com nematóide (72 horas), 11- raiz infectada com nematóide (240 horas), M- marcador de peso molecular.

Ao analisarmos os resultados obtidos nos experimentos de RT-PCR para o gene com expressão específica em folha, verificamos a amplificação de um fragmento de tamanho esperado (300 pb) em amostras de cDNA provenientes de tecido foliar sadio e em folhas infectadas com bicho mineiro e ferrugem (Figura 10; linhas 7, 8 e 10). Entretanto, o transcrito estudado não foi amplificado em amostras provenientes de plantas de *C. arabica* (Catuaí) resistentes à ferrugem, sugerindo que em tais plantas a via de ativação do gene em questão está desligada.

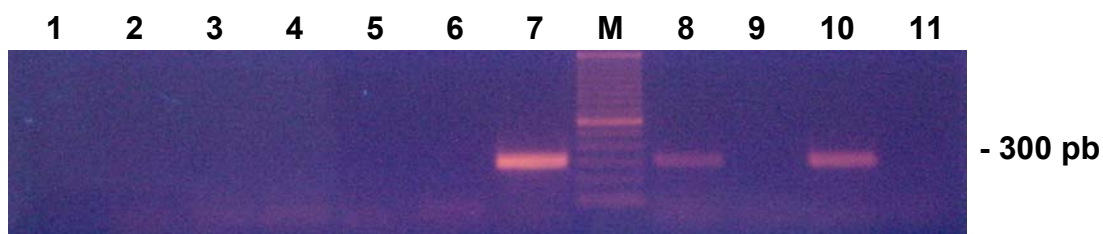


Figura 10. Análise de RT-PCR revelando a amplificação de transcrito específico de folha em *Coffea arabica*, variedade Mundo Novo. A amplificação de um fragmento de tamanho esperado (300 pb) em amostras provenientes de RNA total de folha demonstra que o gene é somente expresso nesse tecido, mesmo quando atacado por bicho mineiro. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo. Amostras: 1-chumbinho, 2-chumbão, 3-fruto verde, 4-fruto verde-cana, 5-fruto maduro, 6-raiz, 7-folha sadia, 8-folha atacada por bicho mineiro e ferrugem (6 dias), 9- folha de híbrido resistente (*Coffea arabica* com *Coffea racemosa*) atacada por bicho mineiro e ferrugem (6 dias), 10- folha atacada por bicho mineiro e ferrugem (11 dias), 11- folha de híbrido resistente (*Coffea arabica* com *Coffea racemosa*) atacada com bicho mineiro e ferrugem (11 dias), M-marcador de peso molecular.

A falta de material vegetal na época do ano em que os experimentos de validação foram realizados inviabilizou a inclusão de amostras de flor em tais análises. Entretanto, experimentos posteriores realizados pela doutoranda Carla Barsalobres, utilizando os oligonucleotídeos específicos aqui obtidos e amostras de cDNA de flor e caule de *C. arabica*, indicaram que os genes validados não são expressos nesses órgãos.

4.4 Análise da expressão do gene com expressão em raiz frente à injúria mecânica

Como observado nos experimentos de validação do candidato com expressão específica em raiz (Figura 9), um maior acúmulo do transcrito estudado em raízes infectadas por nematóide foi observado, sugerindo que além de órgão/tecido-específico, este gene tem seu padrão de expressão aumentado quando induzido pelo ataque do parasita. Visando descartar a hipótese de que o aumento de expressão observado ocorreu devido ao dano mecânico (machucado), novos experimentos foram elaborados.

Nesse caso, lesões radiculares foram induzidas artificialmente e amostras foram coletadas em diferentes tempos visando a extração de RNA total e análise de expressão via *northern blot* empregando sonda específica. Os resultados obtidos (Figura 11) indicam que não existe uma correlação entre a lesão induzida e o aumento da expressão do gene em estudo. Tal fato sugere uma indução específica pelo ataque do parasita e não pela injúria mecânica.

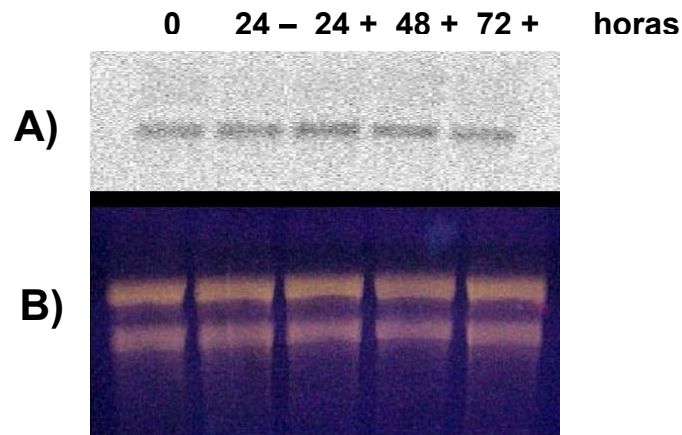


Figura 11. Análise por *northern blot* da acumulação do transcrito específico de raiz em condições de estresse mecânico. Amostras de RNA total (20 µg) de raízes lesionadas artificialmente foram coletadas em diferentes tempos, separadas em gel de agarose desnaturante e transferidas para membrana Hybond N⁺. Esta foi hibridizada com sonda específica ao transcrito, marcada com ³²P. A) tempo 0; 24-24 h sem ferimento; 24+ 24 h pós-ferimento; 48+ 48 h pós-ferimento; 72+ 72 h pós-ferimento; B) Padrão de carregamento corado com brometo de etídeo.

4.5 Isolamento e identificação das regiões promotoras

Confirmada a especificidade da expressão gênica via RT-PCR, iniciou-se o isolamento da região posicionada a montante (5') da seqüência do EST depositada no banco (provável região promotora) empregando o kit *Universal Genome Walker* (Clontech).

Após alguns *rounds* de PCR utilizando ciclos particulares e uma combinação dos oligonucleotídeos específicos (AP1-GSP1), um produto de

amplificação único de aproximadamente 2 kb para o gene com expressão específica em raiz foi amplificado (Figura 12 – biblioteca *StuI*). Da mesma maneira, quando a combinação AP1-GSP1 foi utilizada para isolar a região promotora do gene com expressão específica em folha, um produto também único de 850 pb foi amplificado (Figura 13 – biblioteca *DraI*). Ambos os fragmentos amplificados confirmaram a especificidade quando reamplificados com oligos internos (combinação AP2-GSP2) (Figura 12B e 13B). Os fragmentos em questão foram purificados em gel de agarose, clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega) e inseridos em *E. coli* cepa DH5 α .

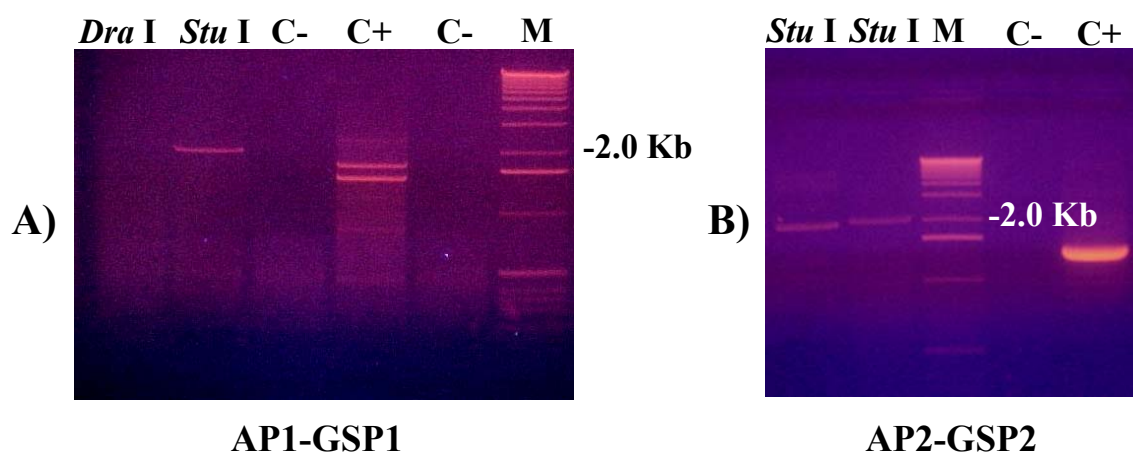


Figura 12. Gel de agarose contendo os produtos de amplificação obtidos para o candidato com expressão específica em raiz empregando a técnica de *genome walking* e a combinação dos oligos AP1/GSP1 e AP2/GSP2. A) produto único de amplificação, de aproximadamente 2 kb, obtido a partir da biblioteca *StuI* utilizando-se AP1/GSP1. B) Produto obtido a partir de um segundo *round* de amplificação utilizando os oligos AP2/GSP2 (canaleta 1 - *Stu I*) confirmando a especificidade da amplificação. C+, controle positivo; C-, controle negativo; M, marcador de peso molecular.

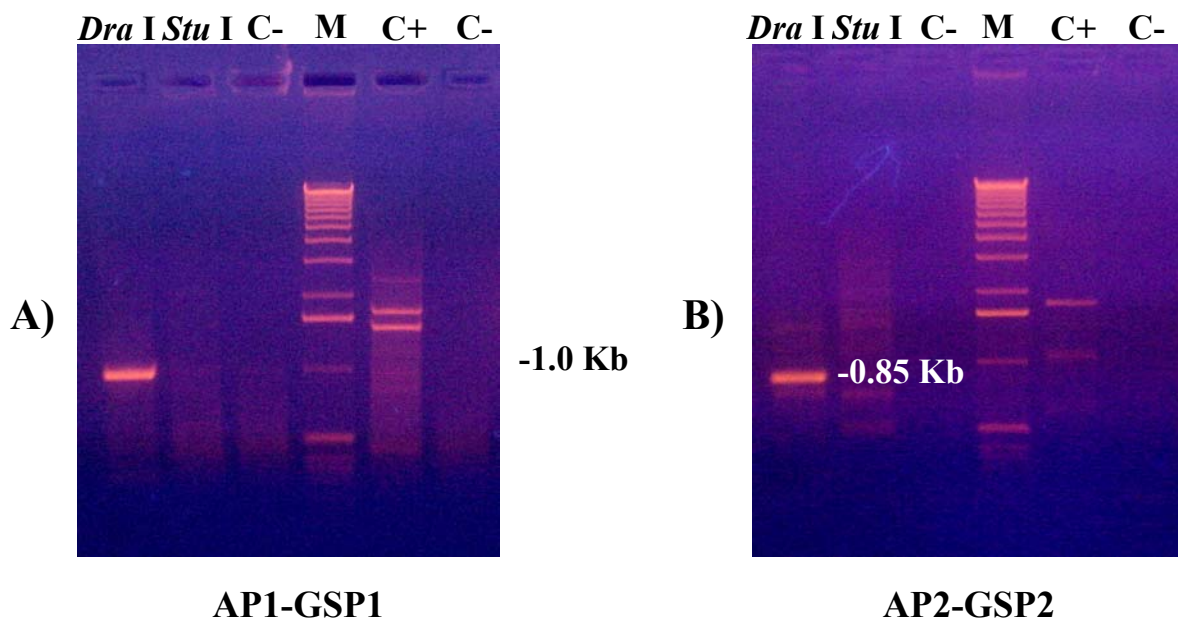


Figura 13. Gel de agarose contendo os produtos de amplificação obtidos para o candidato com expressão específica em folha empregando a técnica de *genome walking* e a combinação dos oligos AP1/GSP1 e AP2/GSP2. A) produto único de amplificação, de aproximadamente 850 pb, obtido a partir da biblioteca *DraI* utilizando os oligos AP1/GSP1. B) Produto obtido a partir de um segundo *round* de amplificação utilizando os oligos AP2/GSP2 (canaleta 1 - *DraI*) confirmando a especificidade da amplificação. C+, controle positivo; C-, controle negativo; M, marcador de peso molecular.

4.6 Seqüenciamento dos produtos de GW e obtenção dos consensos

Três clones que continham o inserto de 850 pb foram seqüenciados e um consenso foi formado a partir das seqüências obtidas, sendo este denominado região promotora específica de folha. O mesmo foi realizado com o fragmento de 2 kb, mas devido ao tamanho do produto amplificado, não foi possível finalizar a

seqüência do mesmo numa única tentativa. Novos oligos, internos à região seqüenciada, foram sintetizados e novas reações de seqüenciamento permitiram a obtenção de uma seqüência consenso de 2097 pb.

Visando verificar se as seqüências amplificadas estavam realmente situadas a montante dos ESTs validados, reações de PCR empregando DNA genômico de café e oligos específicos (F - dentro da região promotora e R - situado na região 5' do EST) resultaram na amplificação de produtos específicos (não apresentado), demonstrando que a seqüência amplificada por GW estava correta e apresentava uma sobreposição com a porção 5' do candidato selecionado. Esse resultado confirma que as seqüências amplificadas estão realmente situadas a montante dos ESTs depositados no banco.

A submissão das seqüências amplificadas por GW no Genbank empregando a ferramenta Blastn revelou a ausência de qualquer identidade ou similaridade com seqüências depositadas, indicando tratar-se de seqüências até então desconhecidas.

4.7 Busca por elementos *cis*- regulatórios nos promotores

Foram realizadas buscas por elementos regulatórios nas seqüências amplificadas por GW utilizando-se o banco de dados PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) (Higo *et al.*, 1999).

4.7.1 Elementos *cis*-regulatórios presentes na região promotora do candidato com expressão específica em folha

Uma comparação da seqüência amplificada por GW com o EST depositado no banco do Genoma Café revelou a existência de uma região 5' não traduzida (UTR) de aproximadamente 280 pb, indicando portanto que o fragmento amplificado (875 pb) continha 280 pb de região 5' UTR e 595 pb de provável região promotora. Os resultados obtidos nas análises computacionais desse fragmento, utilizando informações do banco de dados do PLACE, revelaram a presença de elementos regulatórios específicos (Figura 14 e 15) que corroboram a provável função fisiológica desempenhada pelo gene em estudo na planta.

Além da presença de motivos típicos de regiões promotoras de eucariotos, como o TATA-box, normalmente presente a 30 pb do ponto de início da transcrição (+1), e elementos proximais tipicamente localizados a aproximadamente 100 (CCAAT-box) e 200 pb (GC-box) acima do ponto de início da transcrição (Stephen e James, 2003), outros elementos chaves foram encontrados, especialmente aqueles relacionados com a indução por fatores abióticos e principalmente bióticos (Figura 15).

Um desses elementos regulatórios corresponde à seqüência TGTCA, motivo característico de ligação a fatores de transcrição associados à resposta de resistência em plantas.

Um outro elemento encontrado na região amplificada foi o motivo W Box composto por seqüências do tipo [(T)TGAC(C)] ou TGAC (Eugem *et al.*, 1999). No fragmento em análise, a seqüência TGAC encontra-se repetida *in tandem* e separada por um elemento GATA-box (Figura 14). Dezesete nucleotídeos pós a seqüência acima, mais três repetições de motivos W Box (TAATTTCTGACCTTA) com a mesma disposição são encontradas.

-444 CTAATTTCTGACCTTACAAGATAATACTAATTTCTGACCTTACAA -399

TAATTTCTGACCTTACCTTAGAAGATATTATCTTACTAGATAATTTCTGACCTTAATTTCTAATTTCTAACCTTACAAGATATTATCTTACAAGATAATTTCTGACCTTAC

- 382 - 272

Figura 14. Seqüência parcial de nucleotídeos do promotor específico de folha analisado com auxílio do banco de dados do PLACE. As seqüências sublinhadas representam sítios conservados do tipo W Box, elementos caracterizados por serem regiões de reconhecimento de fatores de transcrição do tipo WRKY.

A aproximadamente -215 pb, uma seqüência de ativação induzida por giberilina e ácido abscísico (GARE – TTTTTTCC) pode ser observada. Um sítio MYC (CATGTG), que possui um importante papel no processo de indução do gene *ERD1* (*Early Responsive to Dehydration Stress 1*) em resposta a estresse hídrico em *A. thaliana* (Tran *et al.*, 2004), também foi constatado.

Mais adiante, chegando próximo ao provável ponto de início de transcrição, identificou-se um novo sítio W-box contendo a seqüência TTGACC, que é encontrado nos elementos W1 e W2 dos promotores dos

genes *PR1-1* e *PR1-2* de salsa (*Petroselinum crispum*), sendo *PR1* um gene induzido por patógenos. Os *boxes* W1 e W2 são sítios de ligação para os fatores WRKY1 e WRKY2, respectivamente.

Dois motivos característicos de promotores de genes induzidos por luz e principalmente envolvidos na biosíntese de flavonóides, denominados ACE (ACGT) e MRE (MYB) (Hartmann *et al.*, 2005) também estão presentes e localizados próximo a ponto de início de transcrição.

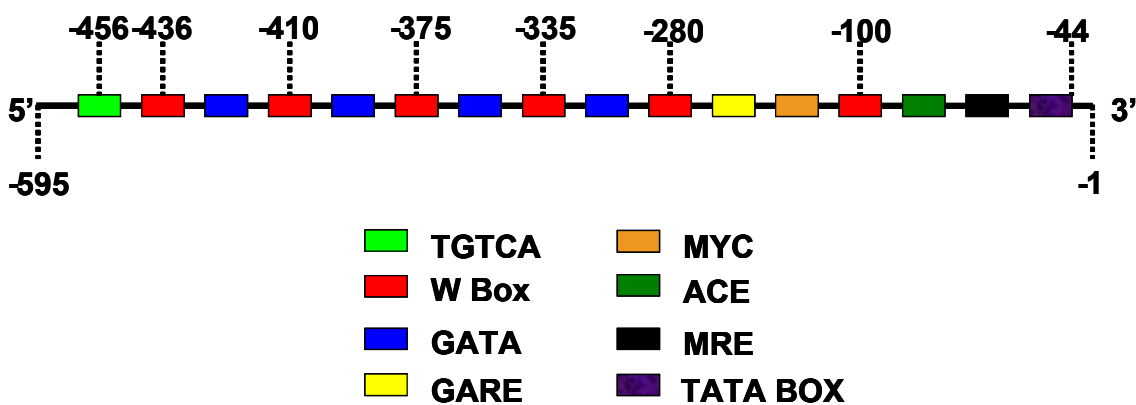


Figura 15. Esquema de localização dos elementos regulatórios encontrados no promotor do gene com expressão específica em folha por análise comparativa com banco de dados do PLACE.

4.7.2 Elementos cis-regulatórios presentes na região promotora do gene com expressão específica em raiz

A busca por elementos cis-regulatórios presentes na região promotora do gene com expressão específica em raiz, utilizando-se de informações disponíveis no banco de dados do PLACE, revelou a presença de inúmeros motivos comumente encontrados em regiões promotoras de plantas.

Além da presença dos bem caracterizados TATA Box, CCAAT Box e GC Box (Stephen e James, 2003) encontrados em promotores de eucariotos, foram também encontrados diversos elementos especificamente presente em regiões promotoras de genes induzidos por fatores bióticos (Figura 16).

Próximo à extremidade 5' do fragmento de 2 kb foi possível identificar um motivo TGACG ("*as-1 element activity*"), comumente presente em promotores de genes ativados por auxina e ácido salicílico (Klinedinst *et al.*, 2000). Em plantas, esses elementos conferem uma expressão específica em raiz, sendo induzidos em resposta a hormônios e estresse xenobióticos (An *et al.*, 1990; Liu and Lam, 1994; Ulmasov *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1996).

Duas repetições da seqüência TGTCA também são encontradas. A seqüência TGTCA corresponde ao sítio de reconhecimento de proteínas do tipo BIHD1 (*BELL type homedomain proteins*) caracterizadas em arroz. Luo *et al.* (2005) demonstraram que o gene *OsBIHD1* de arroz é induzido por benzotriazolone (BTH).

Ao longo da região promotora isolada verificamos a presença de três repetições da seqüência CATATG encontrada no promotor do gene *SAUR 15A* de soja, cuja expressão é regulada por auxina (Xu *et al.*, 1997). Próximo à região do putativo TATA-box encontra-se o sítio GT-1 que é capaz de estabilizar o complexo TFIIA-TBP-DNA, e está presente em vários promotores de diferentes espécies de plantas (Terzaghi *et al.*, 1995).

Além disso, foi encontrado um sítio GARE (sítio de ativação induzido por giberilina e ácido abscísico) bem como inúmeros sítios de ligação para os fatores de transcrição descritos no item anterior como WRKY, ERF, bZIP, MYB e MYC, fatores estes considerados chaves na resposta de defesa das plantas (Rushton and Somssich, 1998; Riechmann and Ratcliffe, 2000; Singh *et al.*, 2002). Cabe destacar a presença dos motivos AAAGAT e CTCTT encontrados inicialmente na região promotora do gene *lbc3* que codifica leghemoglobina em soja e é específico de raiz. A região apresenta também, ao centro da região amplificada, um motivo GAGAC caracterizado em promotores de genes induzidos por deficiência de enxofre em *A. thaliana*. Várias seqüências do tipo CANNTG (MYC) e uma seqüência do tipo CAATTG foram encontradas próximo ao provável TATA-box. Escobar e colaboradores (1999) caracterizaram a região CAATTG em um promotor de um gene altamente induzido em raiz de tomate quando infectadas com nematóides causadores de galha (*Meloidogyne incognita*).

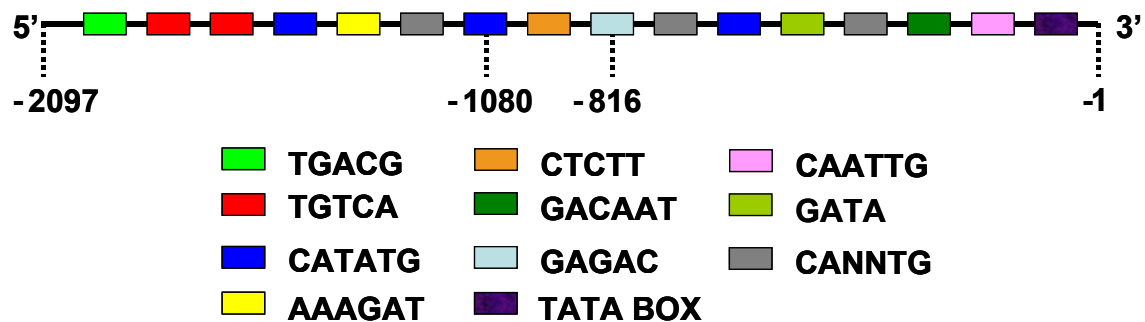


Figura 16. Localização dos elementos regulatórios encontrados no promotor do gene com expressão específica em raiz por análise comparativa com banco de dados do PLACE. Cabe ressaltar que a numeração negativa é putativa, já que não se conhece a exata localização do sítio de início de transcrição.

4.8 Análise das regiões promotoras através de expressão transiente do gene repórter *uidA* em raiz e folha de *Coffea arabica*

Visando avaliar a funcionalidade e especificidade das regiões promotoras isoladas no presente trabalho, cassetes de expressão foram desenvolvidos de acordo com o item 3.9.3 e utilizados em experimentos de expressão transiente em plântulas de café. Para tal, foram utilizadas as seguintes construções: 1) controle positivo (vetor pRT103-Gus fechado ;Figura 4), 2) promotor específico de folha + *uidA* (Figura 6A), 3) promotor específico de raiz + *uidA* (Figura 6B). Análises prévias realizadas no presente trabalho indicaram que a técnica de transformação transiente via biobalística em plântulas de café é viável e apresenta maior

eficiência de transformação quando são utilizadas micropartículas de ouro sob pressão de 1100 psi na região hipocotiledonar e 600 psi na região epicotiledonar.

Todas construções foram bombardeadas tanto na região hipocotiledonar como na epicotiledonar adotando os procedimentos descritos no item 3.9.2

Análises da atividade da enzima β -glucuronidase em plântulas controle (bombardeadas com a construção 1), utilizando-se uma lupa com aumento de 10X, indicaram que o experimento foi bem sucedido. Estas demonstraram atividades pontuais da enzima em ambas regiões bombardeadas, as quais foram mais evidentes em tecidos jovens (Figura 17A e B).

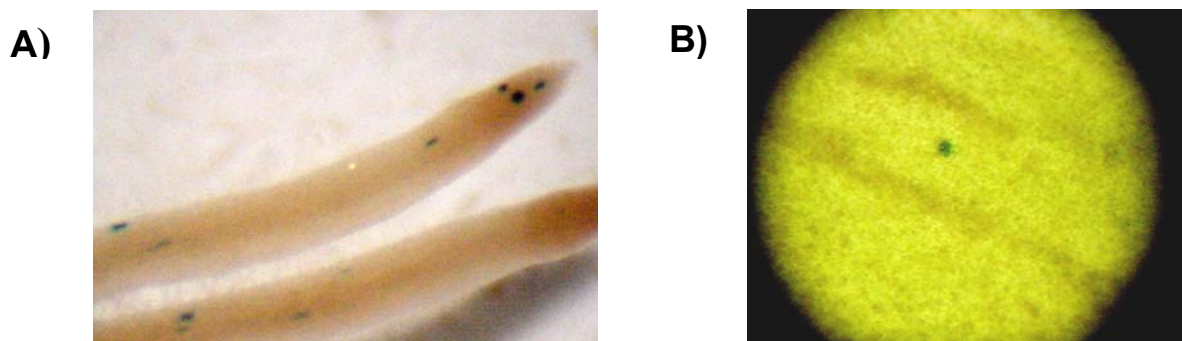


Figura 17. Ensaio de expressão transiente, via biobalística, em raiz e folha de *Coffea arabica*. Detecção da atividade do gene repórter *uidA* em raízes (A) e folhas (B) transformadas com o vetor pRT103-Gus. Foram utilizadas partículas de ouro *BioRad* 1.0 micron sob pressão de disparo de 1100 psi e 600 psi em raiz e folha, respectivamente.

As plântulas bombardeadas com a construção 2 (*uidA* sob o controle do promotor específico de folha) apresentaram um padrão de expressão da atividade Gus diferente das plântulas controle, sendo os pontos correspondentes a essa atividade (pontos azuis) observados nitidamente somente em tecido foliar (Figura 18A, B e C). Por outro lado, nenhuma atividade foi verificada (ausência de pontos azuis) na região hipocotiledonar, mais especificamente em tecido radicular.

Análises do tecido bombardeado por microscopia óptica (aumento de 20X e 40X vezes) confirmaram a expressão celular pontual de Gus (Figura 19), sendo essa a característica principal da técnica de biobalística.

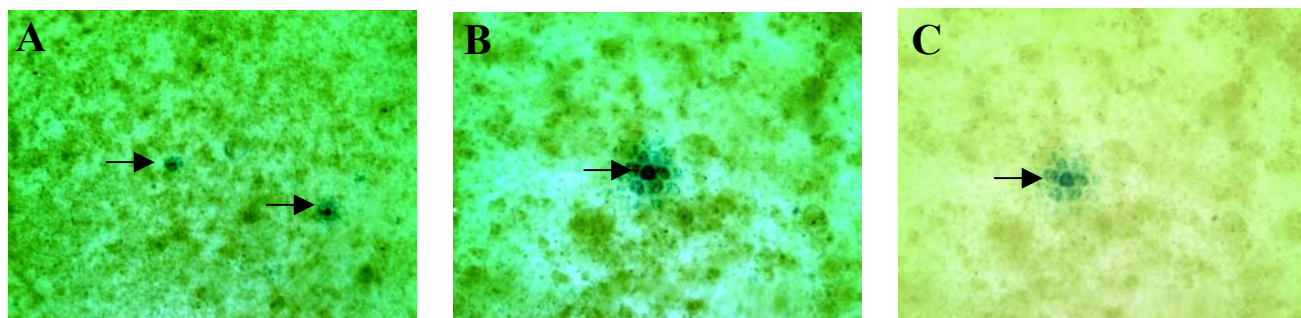


Figura 18. Ensaio enzimático de Gus em folha de *Coffea arabica* transformada via biobalística com o cassete de expressão contendo o promotor específico de folha. A detecção da atividade do gene repórter em folha (setas em A, B e C) revela que a região isolada via *genome walking* apresenta atividade transcricional específica nesse órgão. Foram utilizadas partículas de ouro *BioRad* 1.0 micron sob pressão de disparo de 600 psi.

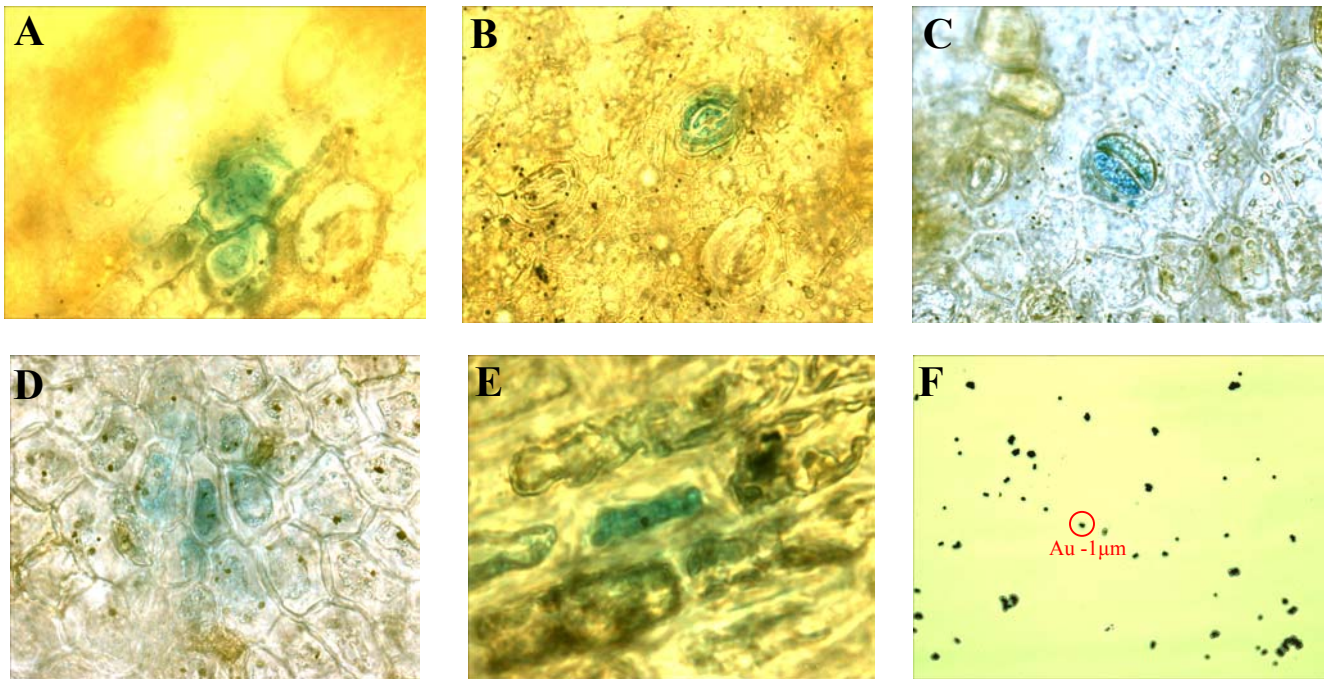


Figura 19. Expressão transiente de Gus em folha de *Coffea arabica* transformada via biobalística com o cassete de expressão contendo o promotor específico de folha. A análise de microscopia óptica confirma transformação pontual das células epidermais (A, B, C, D e E), sendo verificada a presença de micropartículas nas células transformadas. Foram utilizadas partículas de ouro *BioRad* 1.0 micron (painel F) sob pressão de disparo de 600 psi.

Análises mais detalhadas, em microscópio óptico, do tecido foliar de café bombardeado com a construção 2 (*uidA* sob o controle do promotor específico de folha) revelaram a presença um grande número de estômatos transformados (Figura 19, painel B e C) quando comparados com outras células.

Quando a construção 3 (*uidA* sob controle do promotor específico de raiz) foi empregada, os pontos de atividade Gus foram observados somente na região hipocotiledonar, nas raízes mais precisamente, não sendo detectados quaisquer

resquícios de atividade em outras partes da planta. Observações em microscopia óptica também confirmaram a transformação e expressão celular pontual da atividade de Gus em raízes (Figura 20).

Cabe ressaltar que um alto índice de transformação de células meristemáticas, localizadas nas pontas das raízes, foi observado. Esse fato sugere uma maior atividade promotora nessas células quando comparadas com células adultas, indicando haver uma correlação entre os motivos caracterizados *in silico* e a ativação do promotor em células meristemáticas.

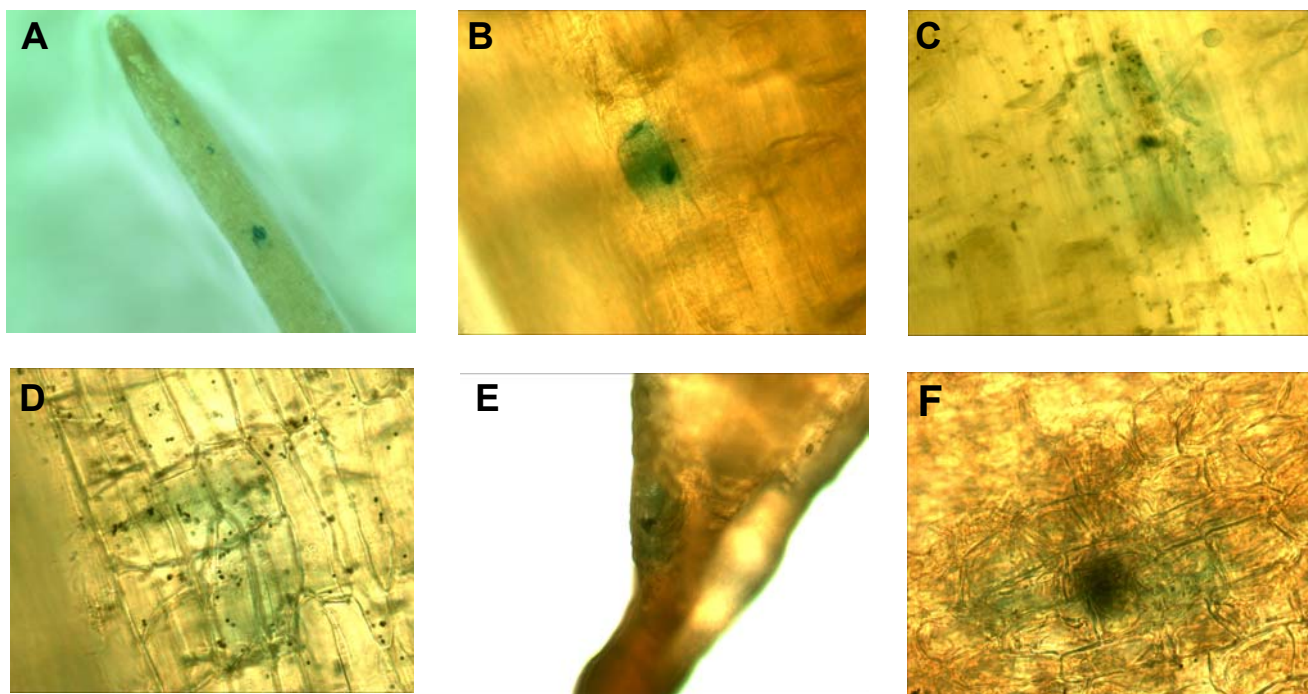


Figura 20. Expressão transitória de Gus em raiz de *Coffea arabica* transformada via biobalística com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz. A detecção da atividade do gene repórter Gus em raízes transformadas via biobalística revela que a região isolada via *genome walking* apresenta atividade transcricional específica (A). Confirmação da transformação pontual das células por análise de microscopia óptica. (A, B, C, D, E e F). Foram utilizadas partículas de ouro *BioRad* 1.0 micron sob pressão de disparo de 1100 psi.

4.9 Análise das plantas de tabaco transgênicas

Análises de PCR utilizando DNA genômico e oligonucleotídeos específicos revelaram que das 17 plantas de tabaco regeneradas e transformadas com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de folha, 14 eram positivas e continham o referido cassete. Já das 27 plantas de tabaco transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz, 20 foram positivas. Todas as plantas regeneradas, inclusive as negativas em PCR, foram mantidas em casa de vegetação até obtenção de sementes. Plântulas da geração F1 de todos os regenerantes foram analisadas pelo ensaio histoquímico de Gus. Neste caso, das 14 plantas positivas em PCR para o promotor de folha, 12 estavam realmente expressando o gene repórter (Figura 21A). Por outro lado, das 20 plantas positivas em PCR para o promotor de raiz, todas foram positivas para a atividade Gus (Figura 21B).

Como pode ser constatado na Figura 21A, nas plântulas transgênicas transformadas com o gene repórter *uidA* sob controle do promotor específico de folha, a expressão de Gus limita-se à região epicotiledonar, mais precisamente em tecido foliar, indicado que o a região promotora isolada de *Coffea arabica* é funcional e apresenta expressão tecido-específica. Cabe ressaltar que nenhum sinal de Gus foi observado em tecido radicular de todas as plantas analisadas.

Já quando as plântulas transformadas com o promotor específico de raiz foram analisadas, para nossa surpresa, a expressão do gene repórter foi

detectada tanto na região epicotiledonar como na região hipocotiledonar (Figura 21B).

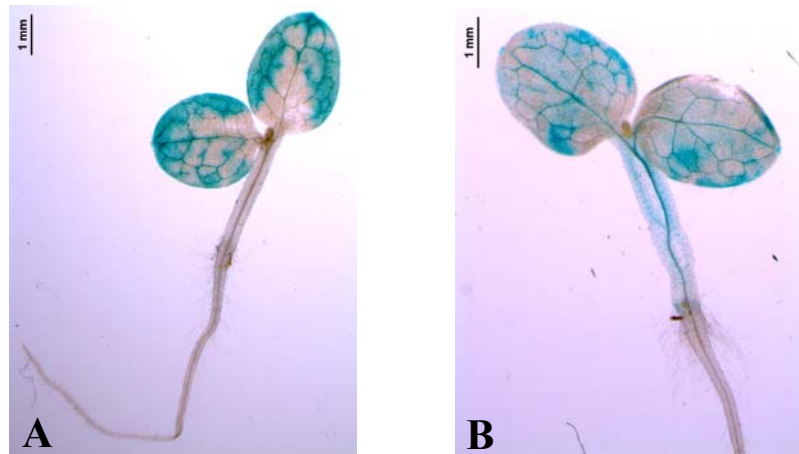


Figura 21. Ensaio histoquímico da atividade de β -glucuronidase em plântulas transgênicas de tabaco transformadas, respectivamente, com os cassetes de expressão contendo os promotores específicos de folha (A) e de raiz (B) isolados de *Coffea arabica*. Painel A encontra-se uma amostra que define o padrão de expressão do gene repórter observado em todas as plântulas transgênicas transformadas com o cassete contendo o promotor específico de folha. Painel B encontra-se uma amostra que define o padrão de expressão do gene repórter observado em todas as plântulas transgênicas transformadas com o cassete contendo o promotor específico de raiz.

A perda de especificidade verificada nas plântulas transformadas com o gene *uidA* sob controle do promotor específico de raiz (Figura 21B), foi observada apenas nos estágios iniciais de desenvolvimento, limitando-se à região epicotiledonar. Acredita-se que esta disfunção deva ser decorrente de uma

incorreta regulação do sistema transcricional nos estágios iniciais de desenvolvimento das plântulas de tabaco, uma vez que, após o surgimento do terceiro par de folhas, nenhum sinal de atividade Gus foi detectado nessa região.

4.10 Análise da indução da expressão do gene repórter *uidA* em plantas transgênicas transformadas com o cassete contendo o promotor específico de folha em resposta a dano mecânico

Vinte e cinco plantas (geração F1) de cinco diferentes eventos de transformação com o cassete de expressão contendo o promotor específico de folha, todas positivas em PCR e nos ensaios histoquímicos (Figura 22), foram avaliadas nos experimentos de dano mecânico. Mínimas pressões foram cuidadosamente geradas, com auxílio de uma pinça estéril, em todas as plantas avaliadas. As injúrias foram limitadas a uma folha por planta (em apenas um lado da folha) com preferência para o terceiro par de folhas. As plântulas foram então analisadas, através de ensaio histoquímico, 4 horas após indução do estresse mecânico.

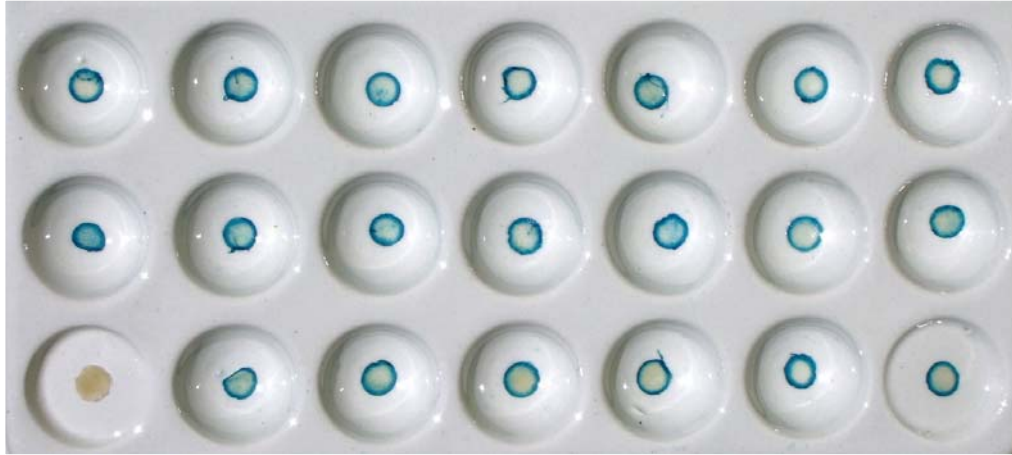


Figura 22. Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em discos foliares de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de folha. Este ensaio foi realizado visando a seleção de plantas positivas para utilização em experimentos de estresse mecânico. Coluna 1, linha 3-planta controle não transformada.

Como pode ser constatado na Figura 23A, não foi possível detectar a atividade do gene repórter em plantas controles (não transformadas) submetidas ao estresse por dano mecânico. Entretanto, foi possível constatar que o dano mecânico em plantas transgênicas (Figura 23B, C, D, E, F) ativou uma resposta de expressão temporal e localizada do gene repórter. A somatória dos resultados obtidos confirmam com segurança a hipótese de que a região promotora isolada a partir do candidato com expressão específica em folha de *Coffea arabica*, além de apresentar especificidade de expressão, é rapidamente induzida por ferimento.

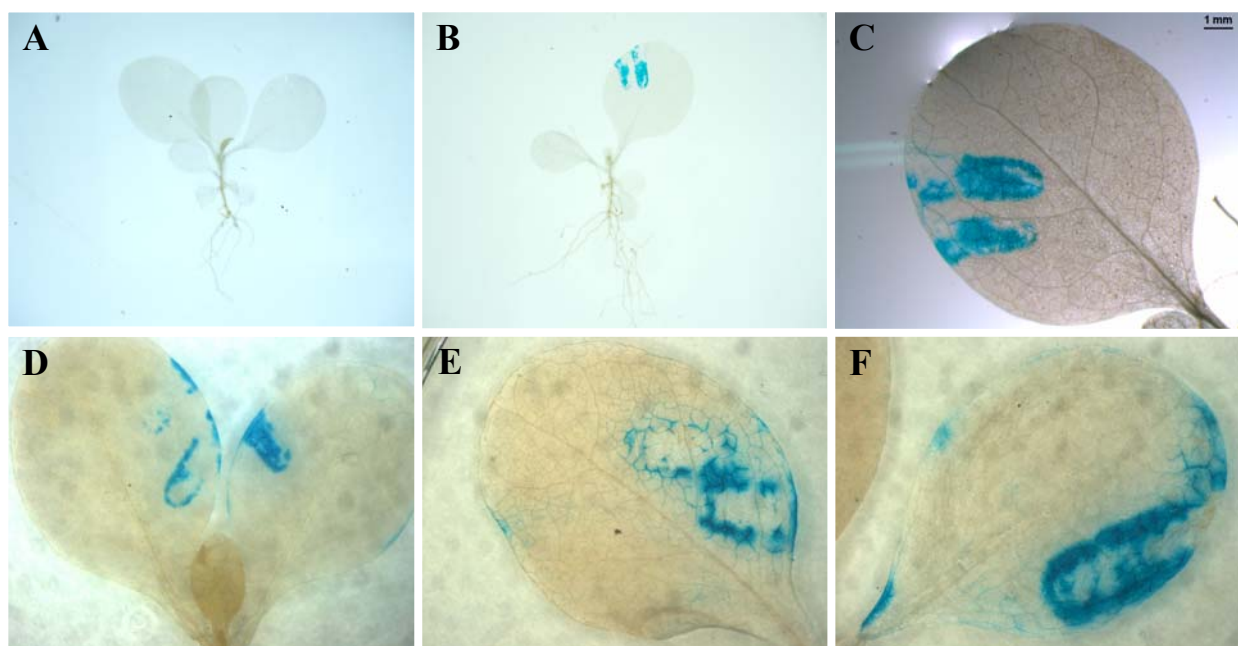


Figura 23. Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em folhas de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de folha, em resposta a dano mecânico. A) Planta selvagem lesionada, onde não há detecção da atividade do gene repórter. Os painéis B, C, D, E e F representam o padrão de expressão de Gus observado em todas as plantas transgênicas submetidas ao estresse por dano mecânico.

4.11 Análise da indução da expressão do gene repórter *uidA* em plantas transgênicas transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz em resposta ao ataque de nematóides

Sessenta plantas de tabaco transgênicos (geração F1) de aproximadamente 60 dias, todas positivas em PCR para o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz, foram inoculadas com nematóides da espécie *Meloidogyne javanica* como descrito no item 3.15. Amostras foram coletadas nos tempos de 24, 72 e 336 (14 dias) horas pós-inoculação com base em resultados de expressão diferencial obtidos por Uehara *et al.* (2007) em tomateiros infectados com nematóides causadores de galha. Nesse caso, os autores verificaram que um homólogo do gene cujo promotor foi isolado em café, é altamente expresso nas raízes de plantas infectadas poucos dias após penetração do parasita.

Nenhum sinal de atividade do gene repórter pode ser detectado 24 horas pós-inoculação (Figura 24; 20 plantas analisadas); entretanto, uma expressão acentuada do gene repórter na raiz principal pode ser observada 72 horas pós-inoculação em todas as plantas analisadas (20 plantas).

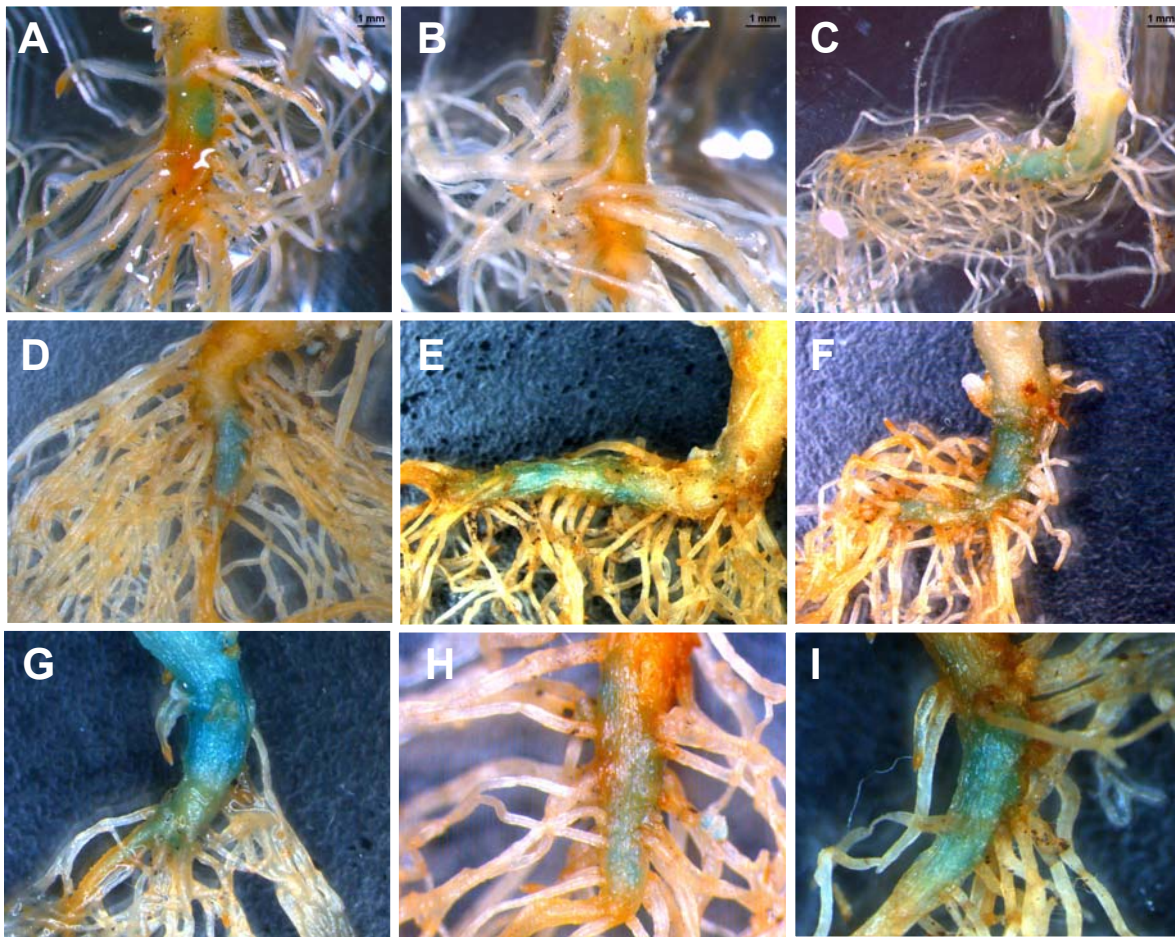


Figura 24. Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em raízes de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de raiz em resposta ao ataque de nematóides. Os painéis A, B, C, D, E, F, G, H e I representam o padrão de expressão de Gus observado em todas as plantas transgênicas submetidas ao estresse biótico após 72 horas.

Quando analisadas amostras com 14 dias pós-tratamento (Figura 25 e 26), a expressão do gene repórter Gus foi especificamente localizada nas regiões parasitadas pelos nematóides, as galhas (Figura 26A, B, C, D, E, F, G, H e I). Pontos de atividade de Gus foram também observados nas fases iniciais de

infecção, regiões estas onde há início de hipertrofia celular (Figura 25A, B, C, D, E, F, G, H e I). É possível verificar na Figura 25, painéis B e F, que a expressão do gene repórter fica limitada à região central da raiz (cilindro vascular), local este onde os nematóides iniciam a atividade parasitaria com conseqüente formação do sítio de alimentação e das células gigantes.

Tais resultados indicam claramente que a região promotora isolada de café, além de apresentar uma expressão específica em órgão radicular, é preferencialmente ativada em situações onde ocorre infecção por nematóides.

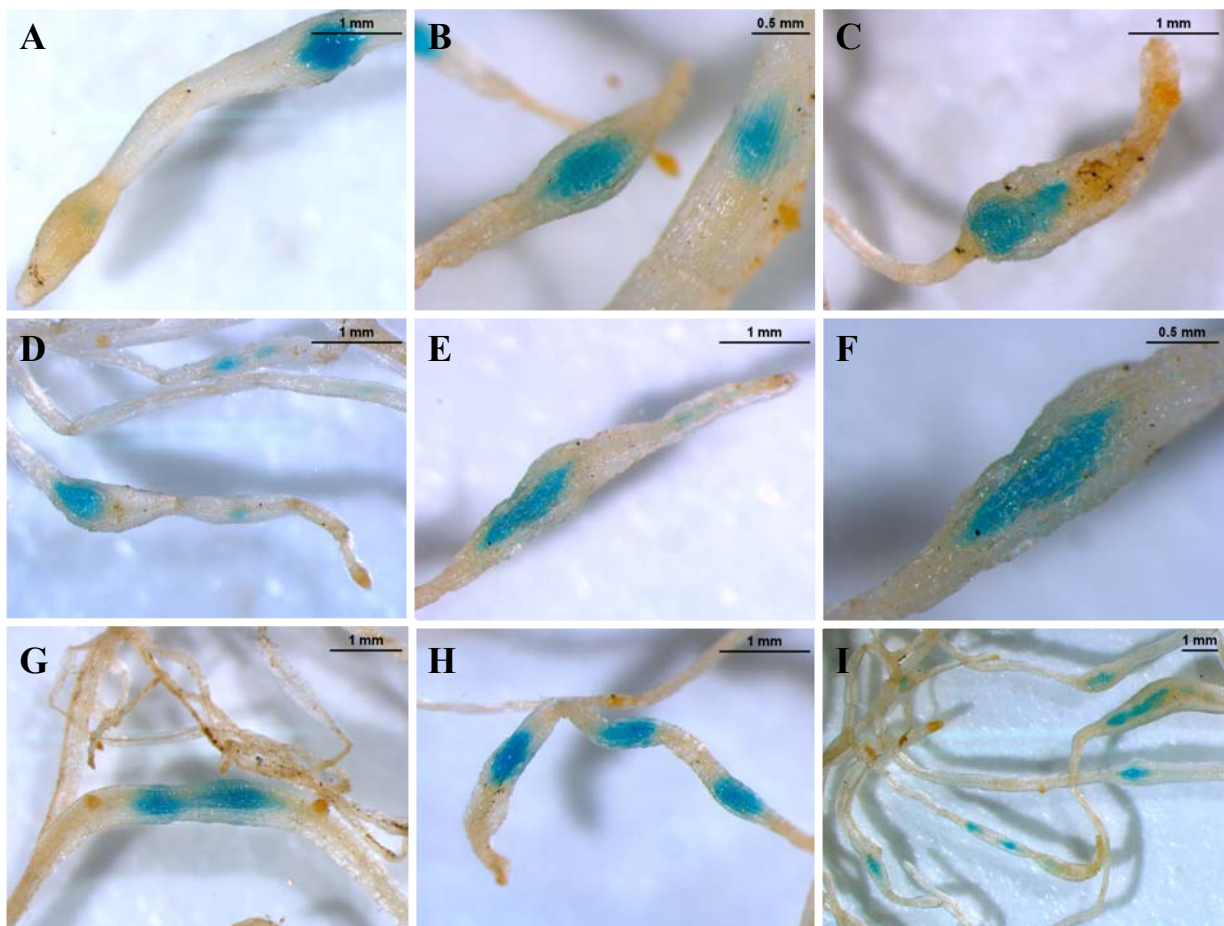


Figura 25. Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em raízes de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de raiz, em resposta ao ataque de nematóides. Os painéis A, B, C, D, E, F, G, H e I representam o padrão de expressão do gene *uidA* observado em todas as raízes das plantas transgênicas submetidas ao estresse biótico 14 dias após a infecção.

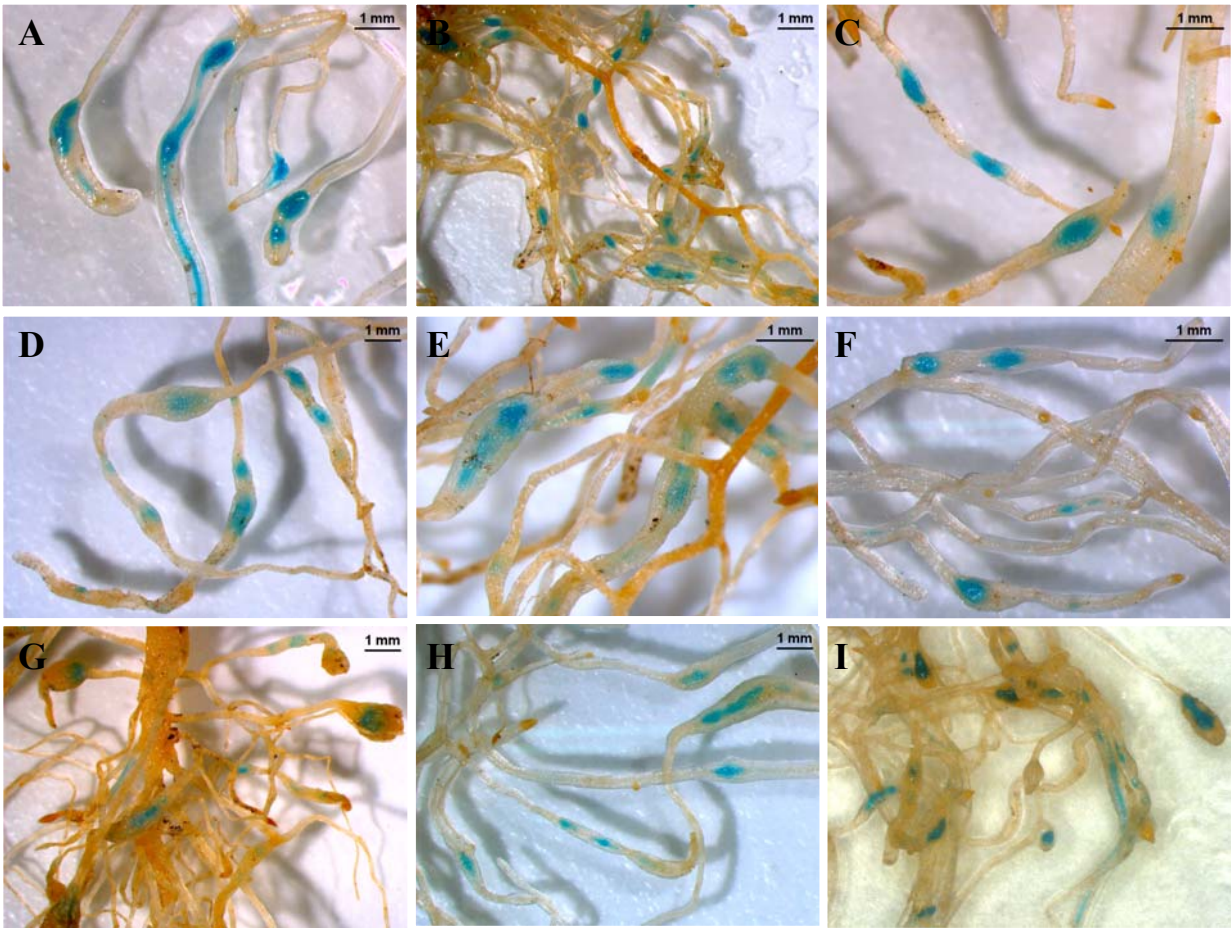


Figura 26. Ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase em raízes de tabacos transgênicos transformados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle do promotor específico de raiz, em resposta ao ataque de nematóides. Os painéis A, B, C, D, E, F, G, H e I representam o padrão de expressão do gene *uidA* observado em todas as galhas das plantas transgênicas submetidas ao estresse biótico 14 dias após a infecção.

5. Discussão

5.1 ESTs órgão/tecido específicos e a análise *in silico*

Vinte e oito ESTs com provável expressão órgão/tecido-específica foram selecionados do banco do Genoma Café a partir de uma análise *in silico* utilizando a ferramenta virtual de *northern* eletrônico. Tal tecnologia nos permitiu identificar com rapidez candidatos potencialmente tecido-específicos, entretanto, após validação da expressão dos mesmos por RT-PCR, verificamos que a maioria apresentava expressão inespecífica, detectada em tecidos não alvos.

A taxa de validação positiva foi muito baixa, ao redor de 7,14%, sendo esta decorrente da confirmação do padrão de expressão órgão/tecido específico por RT-PCR de apenas 2 ESTs (um de folha e outro de raiz). Um elevado número de falsos positivos é normalmente esperado quando se compara os dados obtidos *in silico* com as análises de expressão *in vivo*. Em trabalho semelhante de validação de ESTs tecido-específicos em eucalipto e cana-de-açúcar, por exemplo, Sasaki (comunicação pessoal) e Hoshino (2007) obtiveram uma taxa de validação de 8,6% e de 13,8%, respectivamente. A não confirmação da tecido-especificidade resulta muito provavelmente do fato de que os candidatos selecionados apresentam uma taxa de transcrição muito baixa em determinados órgãos, fazendo com que os mesmos não sejam amostrados durante a preparação das bibliotecas. Estes genes são, na realidade, enriquecidos no órgão considerado específico pela análise *in silico*, mas durante a validação são amplificados nos demais órgãos analisados devido à sensibilidade da PCR.

5.2 Candidato com expressão em folha

A análise da expressão diferencial do candidato com provável expressão em folha, em diferentes órgãos de café sob diferentes situações de estresse, permitiu constatar que o gene em estudo apresenta expressão em folhas saudáveis bem como em folhas infectadas com bicho mineiro e ferrugem. Entretanto, a análise da expressão desse candidato em amostras provenientes de plantas de *C. arabica* (Catuaí) resistentes à ferrugem, revelou a ausência do transcrito correspondente, indicando que em tal variedade a via de ativação do gene está reprimida. Este fato sugere que em plantas susceptíveis este gene é regulado de forma positiva pelo patógeno.

Dados da literatura corroboram a hipótese levantada, já que homólogos desse gene, presentes em outras espécies, são induzidos pelo ataque de fungos (Kim *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que o material infectado utilizado nesse experimento foi obtido em campo de forma aleatória. Em experimentos mais precisos de inoculação do fungo em condições assépticas e amostragem em função do tempo de germinação do esporo em folhas de café Mundo Novo, a avaliação da expressão desse gene por PCR em tempo real revelou um aumento de 50 vezes quatro horas pós-inoculação (Severino, comunicação pessoal).

5.2.1 Caracterização dos elementos regulatórios e análise funcional do promotor específico de folha

Além da presença de elementos típicos de regiões promotoras de eucariotos, foi possível verificar na seqüência promotora amplificada a presença de inúmeros elementos regulatórios de plantas (Figura 15). Um dos mais interessantes foi o elemento de seqüência TGTCA, característico de ligação a fatores de transcrição associados à resposta de resistência em plantas. Luo e colaboradores (2005), por exemplo, caracterizaram um gene que codifica um fator de transcrição em arroz (denominado *OsBIHD1*) cuja proteína recombinante liga-se ao motivo TGTCA *in vivo*. Análises de *northern blot* demonstraram um aumento da expressão do gene *OsBIHD1* em plântulas de arroz tratadas com benzotriazolol (BTH), composto capaz de induzir resistência. Verificou-se também que a expressão de *OsBIHD1* é rapidamente aumentada após 6 horas de inoculação das plantas com *Magnaporthe grisea*, sugerindo que *OsBIHD1* é um fator de transcrição cuja indução estaria associada à resposta de resistência em arroz. Dessa maneira, a presença do elemento TGTCA no promotor do gene específico de folha sugere uma possível ativação dessa região regulatória por fatores ligados à resposta de resistência da planta.

Ainda mais empolgante é a presença nesse promotor de cinco repetições do motivo W-box, dispostas *in tandem*, e compostas por uma seqüência idêntica de 15 nucleotídeos cada. Dong *et al.* (2003) identificaram um número elevado de motivos W-box em promotores de genes de *Arabidopsis* induzidos por patógenos

e ácido salicílico regulados por fatores de transcrição do tipo WRKY. Dados da literatura sugerem que os mecanismos de defesa das plantas mediados pela regulação por fatores WRKY envolvem uma extensa ativação e/ou repressão transcricional pelos próprios membros dessa família (Dong *et al.*, 2003).

Um outro motivo interessante encontrado na referida região promotora foi o elemento MYC, que possui um importante papel no processo de indução do gene *ERD1* em resposta a estresse hídrico em *Arabidopsis*. Tran *et al.* (2004) isolaram três clones de cDNA que codificam proteínas ligantes ao promotor de *EDR1* (que apresenta o motivo CATGTG), identificando-as como fatores de transcrição pertencentes à família das NACs. Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* confirmaram a especificidade de ligação das NACs ao sítio CATGTG, sendo estas ainda capazes de ativar a transcrição de GUS através de uma região de 63 pb contendo o motivo CATGTG. As NACs isoladas nesse trabalho eram induzidas por seca, estresse salino e ácido abscísico. Análises histoquímicas a partir de *Arabidopsis* transformadas com o gene repórter GUS sob controle do promotor de um gene NAC, revelaram a expressão específica do repórter em tecido foliar.

Um outro motivo W-box foi identificado próximo ao provável ponto de início de transcrição, motivo esse presente nos promotores dos genes *PR1-1* e *PR1-2* de salsa (*Petroselinum crispum*), sendo *PR1* um gene induzido por patógenos. Experimentos de expressão transiente demonstraram a presença de dois elementos de resposta ao ataque por fungos nos promotores dos genes *PR1-1* e *PR1-2*. Esses elementos contêm a seqüência (T)TGAC(C), que quando mutadas conduzem a uma inativação da função do promotor (Rushton *et al.*, 1996). Laloi *et*

al. (2004) caracterizaram um gene que codifica uma tioredoxina, *AtTRXh5*, cuja expressão é induzida por lesão mecânica, ataque de patógeno e em situações capazes de gerar estresse oxidativo em *Arabidopsis*. Durante o tratamento com um elicitador bacteriano, observou-se que um fator nuclear é capaz de reconhecer e se ligar a um elemento W-box proximal presente na região promotora do gene *AtTRXh5*, sugerindo que a resposta, nesse caso, pode ser mediada por um fator de transcrição do tipo WRKY. Curiosamente, uma análise detalhada do promotor desse gene revelou a presença de sete cópias da seqüência TTGACC/T distribuídas na região (1 kb) a montante do sítio de início de transcrição, distribuição esta similar à encontrada no promotor que regula o gene com expressão tecido-específica em folha caracterizado no presente trabalho.

A funcionalidade da região promotora em estudo quando analisada em experimentos de expressão transiente em plântulas de *Coffea arabica* foi positiva, apresentando um padrão de expressão específico em tecido foliar. Já nos experimentos de expressão estável em tabaco transgênico foi possível observar que em folhas saudáveis, não estressadas, o promotor isolado não apresenta atividade transcricional. Entretanto, quando as folhas são submetidas a lesões mecânicas, o mesmo é rapidamente ativado (poucas horas pós-indução) sendo tal resposta altamente específica e localizada.

Os resultados obtidos nos referidos experimentos quando consorciados aos dados obtidos em PCR em tempo real, revelam um aumento significativo da expressão do gene em estudo em amostras de folhas de café após 4 horas de inoculação com esporos da ferrugem. Esse tempo é somente suficiente para que

ocorra a germinação dos esporos e início da atividade parasitaria através da penetração das hifas germinativas por meio das células estomáticas. Dados da literatura corroboram tal observação e demonstram que em outras espécies vegetais, a expressão de genes homólogos ao estudado em café também é induzida por fungo, atingindo seu pico máximo de indução nas primeiras horas pós-infecção. Estes fatos sugerem fortemente que o promotor isolado de café apresenta uma rápida ativação em células estomáticas, sendo altamente regulado por estresse biótico.

5.3 Candidato com expressão específica em raiz

As análises de RT-PCR do candidato com expressão específica em raiz, em diferentes órgãos de café sob diferentes situações de estresse, permitiram inferir que o gene estudado, além de tecido-específico, também é induzido pelo ataque de nematóides. Dados da literatura corroboram a hipótese levantada, já que genes homólogos ao gene investigado, presentes em outras espécies, são induzidos pelo parasita em poucos dias pós-infecção (Uehara, *et al.*, 2007, Alkharouf, *et al.*, 2003).

Uma região de 2000 pb situada à montante do provável ponto de início de transcrição do EST selecionado no banco foi seqüenciada, sendo identificados inúmeros elementos regulatórios ao longo da mesma.

5.3.1 Caracterização dos elementos regulatórios e análise funcional do promotor específico de raiz

Na região promotora específica de raiz foram identificados inúmeros elementos regulatórios. Dentre os mais importantes e que corroboram a função fisiológica desempenhada pelo produto do gene em plantas, destaca-se o elemento *as1* (*as-1 element activity*), comumente presente em promotores de genes ativados por auxina e ácido salicílico (Klinedinst *et al.*, 2000) e principalmente, conferindo uma expressão específica em tecido radicular (An *et al.*, 1990; Liu e Lam, 1994; Ulmasov *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1996). Genes que codificam proteínas que se ligam aos elementos *as-1*, denominadas de fatores TGA, foram isolados em um grande número de plantas superiores. Fatores TGA pertencem à família dos fatores de transcrição do tipo bZIP e apresentam papel importante na regulação da expressão tecido-específica. Os genes *TGA1a* e *PG13* homólogos aos TGAs de tabaco, por exemplo, são altamente expressos em raiz (Katagiri *et al.*, 1989; Fromm *et al.*, 1991). Experimentos realizados *in vivo* via transfecção de protoplastos, demonstraram que *TGA1a* é um fator de transcrição induzido por estresse xenobiótico (Pascuzzi *et al.*, 1998). Adicionalmente, Klinedinst *et al.* (2000) demonstraram em experimentos de localização celular que o gene *TGA1a* é preferencialmente expresso na ponta das raízes, especialmente em tecido meristemático.

Recentemente, Fehlberg *et al.* (2005) caracterizaram o promotor do gene *VfLb29* que codifica uma leghaemoglobina de *Vicia faba* e demonstraram que o

mesmo é ativado em células nodulares de raiz infectadas por bactérias *in vivo*. A presença de dois elementos de regulação, AAAGAT e CTCTT, foi necessária para que o promotor desse gene fosse funcional em células nodulares sendo os mesmos considerados elementos órgão-específicos (Stougaard *et al.*, 1990). Esses elementos também são encontrados na região promotora raiz-específica aqui caracterizada. No centro da região promotora amplificada, observa-se o elemento GAGAC comumente presente em promotores de genes induzidos por deficiência de enxofre em *Arabidopsis*. Maruyama-Nakashita *et al.* (2005) analisando as regiões promotoras de genes prematuramente expressos em raiz de *Arabidopsis* em resposta à deficiência de enxofre, verificaram a presença conservada desse motivo em todas regiões analisadas. Esse resultado sugere que esse elemento é conservado e comumente regulado visando adaptação das plantas à deficiência de enxofre.

Cabe ressaltar que, de maneira geral, os elementos regulatórios identificados através da análise *in silico* na região promotora específica de raiz, corroboraram os resultados obtidos até então nas análises funcionais realizadas *in vivo*. Tais análises evidenciam que a expressão do gene repórter sob controle desse promotor é induzida por fatores bióticos e especialmente ativada na interação nematóide - hospedeiro.

Os experimentos de expressão transiente em plântulas de café revelaram que a região promotora específica de raiz apresenta um padrão de expressão diferenciado, sendo o gene repórter pouco expresso e sua localização limitada a células meristemáticas. De posse dos resultados de *northern blot*, onde não foram

constatadas quaisquer alterações nos níveis de expressão do gene regulado pelo promotor investigado em raízes machucadas de café, das análises de RT-PCR e dos elementos regulatórios identificados *in silico*, é possível concluir que esse gene é pouco expresso em tecido radicular de *Coffea arabica* vindo a ser induzido na presença de nematóides.

Abad *et al.* (2003) caracterizando a expressão diferencial de genes em células gigantes parasitadas por nematóides, demonstram um maior acúmulo de transcritos de genes de defesa nos primeiros dias após a infecção do parasita (formação do sítio de alimentação, hipertrofia celular e multinucleação), vindo a diminuir ao longo da infecção. Esses dados corroboram com o resultado observado na Figura 9, onde um maior acúmulo do transcrito estudado foi observado na fase inicial de infecção.

Curiosamente, as análises histoquímicas em plântulas transgênicas de tabaco demonstraram uma perda da especificidade de expressão do gene repórter sob controle do promotor específico de raiz, sendo este detectado em tecido foliar e na região hipocotiledonar. Koyama *et al.* (2005) ao caracterizarem um promotor raiz-específico em *Arabidopsis*, também verificaram uma perda de especificidade durante a análise funcional em plantas transgênicas, detectada pela expressão do gene repórter Gus em plântulas com até 10 dias pós-germinação. Por outro lado, a expressão voltava a ser específica em plantas adultas, corroborando os resultados observados em nossas análises.

Todas essas hipóteses foram validadas no experimento do item 3.15 onde foi possível verificar nitidamente uma rápida ativação na raiz principal, 72 horas

pós-inoculação, da expressão do gene repórter sob controle desse promotor em resposta a infecção por nematóides. Nematóides causadores de galha, em estágio juvenil (J2), penetram através do córtex radicular (12-24 horas), migrando a partir daí para o cilindro vascular, onde se estabelecem e desenvolvem o sítio de alimentação (Barthels, *et al.*, 1997). Nos experimentos aqui descritos foi possível verificar que ao longo da infecção (14 dias), a expressão do gene repórter foi sendo limitada às regiões das galhas. É possível verificar na Figura 25 (painéis B, D e F) que expressão do gene repórter, induzida pelo parasita, localiza-se em locais de hipertrofia celular, ou seja, onde ocorreu a instalação do sítio de alimentação.

6. Conclusões e Perspectivas

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que o método *in silico* utilizado para identificação de genes com expressão órgão/tecido específica é pouco sensível, gerando grande quantidade de falsos positivos.

Os fragmentos isolados empregando a técnica de *genome walking* e provenientes de genes com expressão específica em folha (0.8 kb) e raiz (2 kb), respectivamente, apresentam atividade transcricional dirigindo a expressão de um gene repórter nos órgãos esperados tanto em experimentos de expressão transiente em plântulas de café, bem como em experimentos de expressão estável, utilizando para tal tabaco transgênico.

O método de bombardeamento desenvolvido e utilizado para confirmação da atividade transcricional das regiões promotoras aqui isoladas foi extremamente funcional e seguro, demonstrando com rapidez que as regiões isoladas são funcionais e órgão-específicas.

Podemos afirmar com segurança que a região promotora do gene com expressão específica em folha, isolada de *Coffea arabica*, apresenta um padrão de expressão altamente específico, sendo o mesmo limitado ao tecido foliar e rapidamente ativado em situações de estresse biótico e abiótico. Já o promotor isolado do gene com expressão específica em raiz apresenta um padrão de expressão diferenciado, sendo específico de raiz e ativado somente em resposta ao ataque de nematóides e não por dano mecânico.

Do ponto de vista biotecnológico e principalmente de biossegurança o presente trabalho disponibiliza duas importantes ferramentas que viabilizam a

expressão racional de transgenes, em órgãos chaves da planta, livrando os órgãos destinados à alimentação humana da proteína heteróloga indesejada.

Muitos estudos ainda deverão ser conduzidos com intuito de checar a viabilidade de utilização das seqüências promotoras caracterizadas no presente trabalho em outras espécies de interesse agrônômico como milho, soja, algodão, cana de açúcar, dentre outras. Essas são espécies de grande importância para o agronegócio brasileiro e altamente prejudicadas por parasitas foliares e radiculares, o que evidencia o potencial de uso de tais promotores.

7. Bibliografia

- ABAD, P., FAVERY, B., ROSSO, M.N., SERENO, P.C. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.217-224, 2003.
- ALKHAROUF, N., KHAN, R., MATTHEWS B. Analysis of expressed sequence tags from roots of resistant soybean infected by the soybean cyst nematode. *Genome*, v.47, p.380-388, 2004
- AN, G., COSTA, M. AND HA, S.B. Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxin inducible. *Plant Cell*, v.2, p.225–233, 1990.
- ASAI, T., TENA, G., PLOTNIKOVA, J., WILLMANN, M.R., CHIU, W.L., GOMEZ-GOMEZ, L., BOLLER, T., AUSUBEL, F.M., SHEEN, J.. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, v.415, p.977–983, 2002.
- BARTHELIS, N., VAN DER LEE, F.M., KLAP, J., GODDIJN, O.J., KARIMI, M., PUZIO, P., GRUNDLER, F.M., OHL, S.A., LINDSEY, K., ROBERTSON, L., ROBERTSON, W.M., VAN MONTAGU, M., GHEYSEN, G., SIJMONS, P.C. Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *Plant Cell*, v.12, p.2119-2134, 1997.
- BERTHAUD, J. L'incompatibilite' chez *Coffea canephora* methode de test et determinisme genetique. *Cafe', Cacao, The'*, v.24, p.267–274, 1980.
- BORÉM, A. Biotecnologia no melhoramento de plantas In: **Melhoramento de Plantas**, 2^a ed, Editora UFV, Viçosa, 1998.

- BROWN, D.J.F., ROBERTSON, W.M., TRUDGILL, D.L. Transmission of viruses by plant nematodes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.33, p.223-249, 1995.
- BUTLER, J.E.F., KADONAGA J.T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes & Development**, v.6, p.2583–2592, 2002.
- CAMPOS, V.P., SIVAPALAN, P., GNANAPRAGASAM, N.C. Nematodes parasites of coffee, cocoa and tea. In: Luc, M.; Sikora, R.A.; Bridge, J. (Eds.) **Plant parasitic nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. C.A.B. International. London, 1990. p.387-430.
- CARNEIRO, R.M.D.G. *et al.* *Meloidogyne paranaensis* a n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), root-knot nematodes parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, v.27, p.177-189, 1996.
- CARNEIRO, M.F. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. **Euphytica**, v.96, p.167-172, 1997.
- CARVALHO, A., FAZUOLI, L.C. Café. In: Furlani, A.M.C. e Viégas, G.A. (eds.) **O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico**. Campinas, Instituto Agronômico, 1993. p.29-76.
- CHEN, C., CHEN, Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. **Plant Physiol.**, v.129, p.706–716, 2002.

- CHEN, C., CHEN, Z. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. **Plant Mol. Biol.**, v.42, p.387–396, 2000.
- DONG, J., CHEN, C., CHEN Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Mol. Biol.**, v.51, p.21-37, 2003.
- DU, L., CHEN, Z. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v.24, p.837–847, 2000.
- EISENBACK, J. D., TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot Nematodes: Meloidogyne species and races. In: Nickle, W. R. (Ed.) **Manual of Agricultural Nematology**. Marcel Dekker, New York, 1991. p.281 286.
- ESCOBAR, C., DE MEUTTER, J., ARISTIZABAL, F.A., SANZ-ALFEREZ, S., DEL CAMPO, F.F., BARTHELIS, N., VAN DER EYCKEN, W., SEURINCK, J., VAN MONTAGU, M., GHEYSEN, G., FENOLL, C.. Isolation of the *LEMMI9* gene and promoter analysis during a compatible plant-nematode interaction. **Mol. Plant Microbe Interact.** , v.12, p.440-449, 1999.
- EULGEM, T., RUSHTON, P.J., SCHMELZER, E., HAHLBROCK, K., SOMSSICH, I.E. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **EMBO Journal**, v.18, p.4689-4699, 1999.

- FAZUOLI, L.C.;MEDINA-FILHO, H.P.; GUERREIRO-FILHO, O; GONÇALVES, W.; SILVAROLA, M.B.; LIMA, M.M.A.; DE CARVALHO, A. **Cultivares de café**. Campinas, Instituto Agronômico, 1999.
- FAZUOLI, L.C. Resistance of coffee to the root-knot nematode species *Meloidogyne exigua* and *M. incognita*. Colloque Intern.sur la Protec. Des Cultur. Trop., Lyon, 1981. p.57. Resumos.
- FEHLBERG, V., VIEWEG, M.F., DOHMANN, E.M., HOHNJEC, N., PUHLER, A., PERLICK, A.M., KUSTER, H.. The promoter of the leghaemoglobin gene *VfLb29*: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. **Journal Exp. Bot.**, v.56, p.799-806, 2005.
- FERNANDEZ, D., SANTOS, P., AGOSTINI, C., SILVA, M.C., GUERRA-GUIMARÃES, L., RIBEIRO, A., ARGOUT, X., NICOLE, M.. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Mol. Plant Pathology**, v.5, p.527-536, 2004.
- FROMM, H., KATAGIRI, F., CHUA, N.H. The tobacco transcription activator TGA1a binds to a sequence in the 5' upstream region of a gene encoding a TGA1a-related protein. **Mol. Gen. Genet.**, v.229, p.181–188, 1991.
- GONÇALVES, W. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a nematóide. III Simpósio de atualização em genética e melhoramento de plantas. Genética e melhoramento do cafeeiro. Universidade Federal de Lavras, 1999.

- GONÇALVES, W., SILVAROLLA, M.B. Nematóides parasitos do cafeeiro. In: Zambolim, L. (ed.) **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Editora UFV, Viçosa, 2001. p.199-268.
- GREEN, J., VAIN, P., FEARNEHOUGH, M.T., WORLAND, B., SNAPE, J.W., ATKINSON, H.J. Analysis of the expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* tubulin-1 and *Zea mays* ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.60, p.197-205, 2002.
- HARTMANN, U., SAGASSER, M., MEHRTENS, F., STRACKE, R., WEISSHAAR, B. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. **Plant Mol. Biol.**, v.57, p.155-171, 2005.
- HE, P., WARREN, R.F., ZHAO, T., SHAN, L., ZHU, L., TANG, X., ZHOU, J.M. Overexpression of *Pti 5* in tomato potentiates pathogen induced defense gene expression and enhances disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Mol. Plant–Microbe Interact.**, v.14, p.1453–1457.
- HIGO, K., UGAWA, Y., IWAMOTO, M., KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.297-300, 1999.

- HOSHINO, A. A. Isolamento e caracterização de promotores tecido-específicos a partir das informações do SUCEST. 2007. 143f. Tese (Doutorado) – UNESP, Botucatu - SP.
- HUANG, N., WU, L., NANDI, S., BOWMAN, E., HUANG, J., SUTLIFF, T., RODRIGUEZ, R.L.. The tissue-specific activity of a rice beta-glucanase promoter (*Gns9*) is used to select rice transformantes. **Plant Science**, v.161, p.589-595, 2001.
- KATAGIRI, F., LAM, E., CHUA, N.H.. Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. **Nature**, v.31, p.727-730, 1989.
- KAUL, S. *et al.* The Arabidopsis Genome Initiative. **Nature**, v.408, p.796-815, 2000.
- KIM, S.T., CHO, K.S., KIM, S.G., KANG, S.Y., KANG, K.Y. A rice *Isoflavone Reductase*-like Gene, OsIRL, is induced by rice blast fungal elicitor. **Molecules and Cells**, v.16, p.224-231, 2003.
- KLINEDINST, S., PASCUZZI, P., REDMAN, J., DESAI, M., ARIAS, J. A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. **Plant Mol. Biol.**, v.42, p.679-688, 2000.
- KONIECZNY, A., AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **Plant Journal**, v.4, p.403-410, 1993.
- KONNOROVA, E., DE LA VEJA, A.. Nocividad de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera-Lyonetiidae) III. Características y dimensiones de las lesiones

- producidas a las hojas del cafeto. **Ciencia Tecn. Agric. Café e Cacao**, Habana, v.7, p.25-40, 1985.
- LALOI, C., MESTRES-ORTEGA, D., MARCO, Y., MEYER, Y., REICHHELD, J.P. The *Arabidopsis* Cytosolic Thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-Box-Mediated response to pathogen elicitor. **Plant Physiology**, v.134, p.1006–1016, 2004.
- LEROY, T., HENRY, A.M., ROYER, M., ALTOSAAR, I., FRUTOS, R., DURIS, D., PHILIPPE, R. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. **Plant Molecular Reports**, v.19, p.382-389, 2000.
- LIU, X., LAM, E. Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.668–675, 1994.
- LÓPEZ, R.; SALAZAR, L.. *Meloidogyne arabicida* sp. n. (Nemata: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: un nuevo e severo patógeno del cafeto. **Turrialba**, v.39 p.313-323, 1989.
- LUO, H., SONG, F., GOODMAN, R.M., ZHENG, Z. Up-regulation of *OsBIHD1*, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. **Plant Biol.**, v.7, p.459-468, 2005.
- MARUYAMA-NAKASHITA, A., NAKAMURA, Y., WATANABE-TAKAHASHI, A., INOUE, E., YAMAYA, T., TAKAHASHI, H. Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. **Plant Journal**, v.42, p.305-314, 2005.

- MATIELLO, J.B. *et al.*. **Cultura de café no Brasil: manual de recomendações**. 5^a Ed., Rio de Janeiro: IBC – ERCA, 1985.
- MENG, F., SHEN, J., ZHOU, W., CEN, H.. Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera:Noctuidae). **Pest Manage Sci.**, v.60, p.167-172, 2004.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v.15, p.473-497, 1962.
- NESTER, E.W., THOMASHOW, L.S., MATTHEW, M., GORDON, M. 100 Years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment. American Academy of Microbiology, NW Washington, DC, 2002.
- NEUTEBOOM, L.W., KUNIMITSU, W.Y., WEBB, D., CHRISTOPHER, D.A. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**, v.163, p.1021-1035, 2002.
- PASCUZZI, P., HAMILTON, D., BODILY, K., ARIAS, J. Auxininduced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor. **J. Biol. Chem.**, v.41, p.26631–26637, 1998.
- PARK, K.S., KLOEPPER, J.. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci. **Biological Control**, v.18, p.2-9, 2000.

- PARK, J.M., PARK, C.J., LEE, S.B., HAM, B.K., SHIN, R., PAEK, K.H. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. **Plant Cell**, v.13, p.1035–1046, 2001.
- PARRA, J.R.P. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera-Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.29, p.45-76, 1985.
- RANCE, I., NORRE, F., GRUBER, V., THEISEN, M. Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. **Plant Science**, v.162, p.833-842, 2002.
- RIECHMANN, J.L., RATCLIFFE, O.J. A genomic perspective on plant transcription factors. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.5, p.423-434, 2000.
- ROBATZEK, S., SOMSSICH, I.E. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. **Plant Journal**, v.28, p.123–133, 2001.
- RUSHTON, P.J., TORRES, J.T., PARNISKE, M., WERNERT, P., HAHLBROCK, K., SOMSSICH, I.E. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1*. **EMBO Journal**, v.15, p.5690-5700, 1996.
- RUSHTON, P.J., SOMSSICH, I.E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.4, p.311-315, 1998.

- RUSHTON, P.J., REINSTADLER, A., VOLKER, L., LIPPOK, B., SOMSSICH, I.E..
Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen and wound induced signaling. **Plant Cell**, v.14, p.749-762, 2002.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- SHIN, R., PARK, J.M., AN, J.M., PAEK, K.H. Ectopic expression of *Tsi1* in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. **Mol. Plant–Microbe Interact.**, v.15, p.983–989, 2002.
- SHU, Q.Y., YE, G.Y., CUI, H.R., CHENG, X., XIANG, Y., WU, D., *et al.* Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. **Molecular Breed**, v.6, p.433-439, 2000.
- SONG, F., GOODMAN, R.M. Cloning and identification of the promoter of the tobacco Sar8.2b gene, a gene involved in systemic acquired resistance. **Gene**, v.290, p.115-124, 2002.
- STOUGAARD, J., JORGENSEN, J.E., CHRISTENSEN, T., KUHLE, A.; MARCKER, K.A. Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and N23 gene promoters. **Mol. Gen. Genet.**, v.220, p.353-360, 1990.
- STEPHEN, T.S., JAMES T. The RNA Polymerase II Core Promoter. **Annu. Rev. Biochem.**, v.72, p.449–479, 2003.

- TERZAGHI, W.B., CASHMORE, A.R. Light-regulated transcription. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.46, p.445-474, 1995.
- TOPFER, R., MATZEIT, V., GRONENBORN, B., SCHELL, J., STEINBISS, H.H. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. **Nucleic Acids Res.**, v.15, p.5890, 1987.
- TRAN, L.S., NAKASHIMA, K., SAKUMA, Y., SIMPSON, S.D., FUJITA, Y., MARUYAMA, K., FUJITA, M., SEKI, M., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. **Plant Cell**, v.16, p.2481-2498, 2004.
- UEHARA, T., SUGIYAMA, S., MASUTA, C. Comparative serial analysis of gene expression of transcript profiles of tomato roots infected with cyst nematode. **Plant Mol. Biol.** , v.63, p.185-94, 2007.
- ULMASOV, T., HAGEN, G., GUILFOYLE, T. The *ocs* element in the soybean *GH2/4* promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. **Plant Mol. Biol.**, v.26, p.1055–1064, 1994.
- VAILLEAU, F., DANIEL, X., TRONCHET, M., MONTILLET, J.L., TRIANTAPHYLIDES, C., ROBY, D. An R2R3-MYB gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.99, p.10179–10184, 2002.

- VEGRO, C.L.R., FERREIRA, C.R.R.P.T. Evolução das despesas com defensivos agrícolas e fertilizantes para a safra de café 2000/01 nos estados de São Paulo e Paraná. **Informações Econômicas**, v.30, p.53-59, 2000.
- VIEIRA, L.G.E. *et al.* 2006. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.95-108
- XIANG, C., MIAO, Z.H., LAM, E. Coordinated activation of *as-1-type* elements and a tobacco *glutathione S-transferase* gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. **Plant Mol. Biol.**, v.32, p.415–426, 1996.
- XU, N., HAGEN, G., GUILFOYLE, T. Multiple auxin response modules in the soibean SAUR 15A promoter. **Plant Science**, v.126, p.193-201, 1997.
- WANG, S-J., LAN, Y-C., CHEN, S.F., CHEN, Y.M., YEH, K.-W. Wound-response regulation of the sweet potato sporamin gene promoter region. **Plant Mol. Biol.**, v.48, p.223-231, 2002.
- WILLIAMSON, V.M.; HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell**, v.8, p.1735-1745, 1996.
- YU, J. *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**, v.296, p.79-92, 2002.
- ZHENG, Z., MURAI, N. A distal promoter regions of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Science**, v.128, p.59-65, 1997.