

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TESE DE DOUTORADO

desenvolvida em cotutela com a *Université de Montpellier II*, França

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES
DE GENES DE CAFÉ (*Coffea arabica*)

CARLA FERNANDA BARSALOBRES CAVALLARI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu (SP), para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Genética) e *Docteur de l'Université de Montpellier II*.

Banca examinadora:

Orientador	Ivan G. MAIA	UNESP, IBB, Brasil
Orientadora	Diana FERNANDEZ	IRD, França
	Michel G. A. VINCENTZ	UNICAMP, Brasil
	Luiz G. E. VIEIRA	IAPAR, Brasil
	Anne-Lise HAENNI	CNRS-IJM-Université Paris-Diderot, França
	Pierre MARRACCINI	CIRAD, França

B O T U C A T U
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Cavallari, Carla Fernanda Barsalobres.

Identificação e caracterização de promotores de genes de café (*Coffea arabica*) / Carla Fernanda Barsalobres Cavallari. – Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2009

Orientadores: Ivan G. Maia e Diana Fernandez
Assunto CAPES: 20203004

1. Café – Melhoramento genético 2. Cofea arabica

Palavras-chave: Expressão gênica; Frutos; Genes ubíquos; Resistência de plantas

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Ivan de Godoy MAIA (Instituto de Biociências de Botucatu - IBB, UNESP, Botucatu) por me acolher em seu grupo de pesquisa, pela confiança, apoio e preciosos conselhos durante estes quatro anos de tese. Obrigada por sua compreensão ao permitir a realização de meu trabalho em outros laboratórios.

Agradeço à Dra. Diana FERNANDEZ (Equipe Résistance des Plantes aux Bioagresseurs - RPB, Institut de Recherche pour le Développement - IRD, Montpellier), por facilitar minha integração e minha estadia em Montpellier. Obrigada pela oportunidade, atenção e pela ajuda em relação às questões administrativas e científicas.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Anne-Lise HAENNI (Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS, Institut Jacques Monod - IJM, Université de Paris-Diderot; Paris); Dr. Pierre Roger René MARRACCINI (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement - CIRAD, Montpellier), Prof. Dr. Michel Georges Albert VINCENTZ (Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas) e ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves VIEIRA (Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, Londrina), pela dedicação e contribuição na versão final deste trabalho. Muito obrigada à Dra. HAENNI e ao Dr. VINCENTZ por aceitarem participar também como *rapporteurs* de minha tese.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Helena de Souza GOLDMAN (Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto), ao Dr. Carlos COLOMBO (Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, Campinas), ao Dr. Celso Eduardo BENEDETTI (Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron - ABTLuS, Centro de Biologia Molecular Estrutural - CeBiME, Campinas) e aos professores Dra. Adriane Pinto WASKO, Dr. Fabio Tebaldi Silveira NOGUEIRA e Dr. Paulo Eduardo Martins RIBOLLA do IBB (UNESP) por se disponibilizarem como membros do júri.

Agradeço aos funcionários de l'Ecole Doctorale SIBAGHE (Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences, Environnement) e da Seção de Pós-Graduação do IBB/UNESP pelo cuidado e atenção dispensada nas formalidades desta tese em cotutela.

Agradeço à Assessoria de Relações Externas da UNESP (AREX), em especial à Daniela BARBOSA e Patricia Gasparini SPADARO, pelo apoio prestado.

Agradeço aos Governos Brasileiro e Francês pelo acordo internacional firmado em 11 de outubro de 2005 que permitiu a realização desta tese em cotutela. À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) e à Université de Montpellier II (UM2) pela oportunidade oferecida. À CAPES pela bolsa concedida para o período de tese realizado na França, em especial à Nancy da Silva SANTOS e Jussara Pereira PRADO, da Coordenação Geral de Cooperação Internacional (Programas CDFB, PVE e CAPES/COFECUB), pela atenção dispensada. Ao CNPq pela bolsa concedida para o período de tese realizado no Brasil.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

- à Dra. Mirian Perez MALUF (Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café "Alcides Carvalho", IAC, Campinas) pelas discussões científicas, fornecimento de material, por disponibilizar a infra-estrutura de seu laboratório e por fim, por ter me colocado em contato com a Dra. Diana FERNANDEZ, o que culminou na realização deste doutorado em cotutela;
- ao Dr. Michel NICOLE (RPB/IRD) por me acolher em seu grupo de pesquisa;
- à Dra. Anne-Sophie PETTROT (RPB/IRD) pela amizade, paciência e ensinamentos, tanto científicos quanto culturais;
- aos colegas Agnès PINEL-GALZI; Alessandra RIBAS; Evelyne DÉCHAMP; Luc VILLAIN; Majd ALHAMDIA; Sylvie POUNHET e demais membros da Equipe RPB (IRD) pelo suporte e amizade;
- aos professores Dr. João Manuel Grisi CANDEIAS; Dr. João Pessoa ARAÚJO JUNIOR; Dr. Cláudio OLIVEIRA, Dr. Paulo Eduardo Martins RIBOLLA (IBB, UNESP, Botucatu) e seus alunos pelo apoio na realização deste projeto;
- à Profa. Dra. Marina A. MORAES-DALLAQUA e ao técnico de laboratório Kleber Alexandre CAMPOS (Departamento de Botânica do IBB, UNESP), juntamente com a Dra. Cecília Alzira Ferreira PINTO-MAGLIO (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais - CPDRV, Laboratório de Citogenética do IAC, Campinas), o Dr. Marcelo Carnier DORNELAS (UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal) e a Dra. Mirian Perez MALUF (Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café "Alcides Carvalho", IAC, Campinas) por me ajudarem a realizar a técnica de hibridização *in situ*;
- à Profa. Dra. Helaine CARRER (Centro de Biotecnologia Agrícola - CEBTEC, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Universidade de São Paulo - USP, Piracicaba) por permitir a finalização deste trabalho em seu laboratório, disponibilizando toda a infra-estrutura necessária;
- à Valentina de Fátima De MARTIN e todos os demais membros e alunos do CEBTEC pela ajuda inestimável na etapa final do trabalho; MUITO OBRIGADA em especial aos alunos Andre Luiz BARBOSA, Evandro Vagner TAMBARUSSI, Frederico Almeida de JESUS e Eduardo da Cruz Maduro PICELLI pelo auxílio e empenho na realização dos experimentos e sobretudo pela amizade;
- à Dra. Mariza MONTEIRO (CPDRV, IAC) por disponibilizar seu precioso tempo me ajudando nas estratégias de clonagem das regiões promotoras e sua realização, me socorrendo em um momento de muita necessidade;
- ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira PERES (Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP) e sua então aluna de doutorado Lilian Ellen PINO pelo apoio científico ao desenvolvimento deste trabalho, discussões e troca de idéias, bem como pelo fornecimento de material biológico;

aos professores Dr. José Baldin PINHEIRO (ESALQ/USP), Dra. Maria Imaculada ZUCCHI (IAC), Dr. Daniel Scherer de MOURA (CEBTEC), Dr. Marcio de Castro SILVA FILHO (ESALQ/USP), Dr. Antonio Vargas de Oliveira FIGUEIRA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, USP, Piracicaba), seus alunos e técnicos (especialmente à Myrian Raquel Orsi SPROVIERI), pelo apoio prestado para a realização desta pesquisa;

às doutoras Sandra A. Drigo LINDE, Debora COLOMBI e Regiane Degan FÁVARO pela colaboração no delineamento experimental e métodos de análises de PCR quantitativa;

ao doutorando Fábio Eduardo SEVERINO (IBB, UNESP) pela ajuda nos ensaios de expressão gênica, fornecendo amostras de experimentos biológicos e realizando parte das análises quantitativas;

aos doutores Antonio Sergio Kimus BRAZ e Flávio Tetsuo SASSAKI pelos ensinamentos de bioinformática e ajuda sempre que solicitada;

aos alunos e técnicas do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café "Alcides Carvalho" (IAC) pelo fornecimento de experimentos biológicos utilizados na validação dos genes candidatos;

à Bénédicte FAVREAU e Alexandre VAILLANT (CIRAD, Montpellier) pela ajuda na confecção dos textos em língua francesa que constam nesta tese;

aos amigos Bénédicte, Alexandre, Julien, Gilles e demais amigos do CIRAD por apresentarem a cultura francesa em ótimos momentos que passamos juntos nas randonnées et restos du Languedoc;

à Família RAMIRO (Daniel, Sílvia, João Pedro e Luiza) e também à Família MAZZEI (Lucas, Mireille, Maria, Clara e Luisa) pelos bons momentos brasileiros que passamos na França;

às alunas de iniciação científica Luciane Missae SATO e Layra Gabriella PINTO pelo auxílio prestado na bancada e fora dela;

aos colegas de l'Association Contact (Association des Elèves et Anciens Elèves des Ecoles Doctorales de l'Académie de Montpellier) onde tive a oportunidade de viver a vida universitária de Montpellier, participando de reuniões, atividades culturais e organização de eventos.

aos colegas e funcionários do Departamento de Genética (IBB, UNESP) pelo convívio, troca de informações, auxílio e amizade;

e por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu marido e à minha filha pela paciência (MUITA PACIÊNCIA), compreensão nos momentos de minha ausência, colaboração e apoio para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS DOS GENES ESTUDADOS NESTE TRABALHO....	xvii
RESUMO.....	xix
RÉSUMÉ.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
RÉSUMÉ LONG.....	xxv
1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	xxv
2. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	xxvii
2.1. Le caféier : ressources génétiques et génomiques.....	xxvii
2.2. Mécanismes de défense des plantes.....	xxix
3. SELECTION, ISOLEMENT ET CARACTERISATION CHEZ LE CAFEIER DE GENES PRESENTANT UNE EXPRESSION CONSTITUTIVE, SPECIFIQUE DES FRUITS OU INDUITE LORS DE LA REPONSE A UNE ATTAQUE PATHOGENE (CHAPITRE I).....	xxxiv
3.1. Identification et caractérisation de gènes du caféier d'expression constitutive ou spécifique des fruits.....	xxxiv
3.2. Identification et caractérisation de gènes du caféier induits lors de la réponse à une attaque pathogène.....	xxxv
4. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES PROMOTEURS DE GENES DU CAFEIER (CHAPITRE II).....	xxxvi
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	xxxvii
Références bibliographiques.....	xlii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1. O gênero <i>Coffea</i>	5
2. Importância econômica do café no Brasil.....	7
3. Fenologia do cafeeiro.....	9
3.1. Desenvolvimento dos frutos de café.....	11
4. Ferrugem do cafeeiro.....	15
4.1. Taxonomia e ciclo de vida de <i>H. vastatrix</i>	15
4.2. Sintomas da doença.....	17
5. Genética da resistência do cafeeiro à ferrugem.....	18
6. Interação <i>Coffea arabica</i> – <i>Hemileia vastatrix</i>	21
7. Regulação da transcrição gênica em eucariontes.....	26
7.1. As células regulam a expressão dos seus genes.....	26
7.2. A regulação da transcrição em células procarióticas e eucarióticas.....	28
7.3. Região de controle gênico em eucariotos.....	29
7.3.1. Elementos <i>cis</i> -regulatórios.....	29
7.3.2. Elementos <i>trans</i> -regulatórios.....	32
7.4. Importância da identificação de regiões promotoras em plantas....	34
7.4.1. Promotores constitutivos.....	35
7.4.2. Promotores de fruto- e/ou semente-específicos.....	38
7.4.3. Promotores induzidos por patógenos.....	39
7.5. Caracterização de regiões promotoras de genes de café.....	42
8. Mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de patógenos..	45
8.1. Reconhecimento genético ente a planta e o patógeno.....	47

8.1.1. O conceito de reconhecimento “gene a gene”	48
8.1.2. Genes <i>R</i>	50
8.1.3. Fatores <i>Avr</i>	55
8.1.4. Modelos de reconhecimento.....	61
8.1.4.1. Reconhecimento direto (<i>Avr-R</i>).....	62
8.1.4.2. Reconhecimento indireto (<i>Avr-X-R</i>).....	63
8.2. Processo de transdução de sinal.....	64
8.3. Mecanismos de resistência.....	65
8.3.1. Resposta de hipersensibilidade.....	65
8.3.2. Resistência sistêmica adquirida.....	69
8.3.2.1. O ácido salicílico.....	72
8.3.2.1.1. Modo de ação do ácido salicílico.....	72
8.3.2.2. Sinalização na SAR.....	74
9. Regulação da expressão de proteínas PR.....	78
9.1. Genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese.....	78
9.1.1. Classificação.....	80
9.2. Co-fator de transcrição NPR1.....	83
9.2.1. Expressão do gene <i>NPR1</i> durante os mecanismos de defesa....	87
9.2.2. Interações entre proteínas NPR1 e fatores de transcrição.....	89
9.2.2.1. NPR1 e fatores de transcrição do tipo TGA.....	89
9.2.2.2. NPR1 e fatores de transcrição do tipo WRKY.....	91
9.2.3. Proteínas NPR1 e a indução de genes <i>PRs</i>	92
9.2.4. Modo de ação de proteínas NPR1 durante a resposta de defesa.....	93
9.3. Fatores de transcrição do tipo WRKY.....	96
9.3.1. Estrutura protéica de fatores de transcrição do tipo WRKY.....	97
9.3.1.1. Domínio WRKY.....	97
9.3.1.2. Outros domínios presentes em proteínas WRKY.....	101
9.3.2. Características da interação entre proteínas WRKY e o DNA.....	103
9.3.3. Funções biológicas das proteínas WRKY.....	105
9.3.3.1. Defesa de plantas.....	105
9.3.3.2. Transdução de sinais ativados por MAP quinases.....	108
9.3.3.3. Alteração na estrutura da cromatina.....	110
9.3.3.4. Outras funções das proteínas WRKY.....	110
9.3.4. Genes alvos dos fatores de transcrição do tipo WRKY.....	111
9.3.4.1. Genes relacionados à patogênese.....	112
9.3.4.2. Genes relacionados à proteínas quinases.....	112
9.3.4.3. Genes relacionados à proteínas WRKY.....	113
9.3.4.4. Genes relacionados à pequenos RNAs.....	114
9.3.4.5. Outros genes alvos.....	116
Referências bibliográficas.....	120
CAPÍTULO I: SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES CANDIDATOS VISANDO A CLONAGEM DE PROMOTORES TECIDO- ESPECÍFICOS E UBÍQUOS EM CAFÉ.....	149
I.1. Busca por genes candidatos.....	151
I.1.1. Genes candidatos com padrão de expressão tecido-específico...	152
I.1.2. Genes candidatos com padrão de expressão ubíquo.....	155

I.1.3. Desenho dos <i>primers</i> para validação biológica dos genes candidatos com padrão de expressão tecido-específico e ubíquo.....	157
I.1.4. Resultados obtidos.....	158
I.2. Validação biológica e análise da expressão gênica.....	161
I.2.1. Material vegetal empregado.....	161
I.2.2. Extração de RNA total.....	164
I.2.2.1. Metodologia de extração utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen).....	164
I.2.2.2. Metodologia de extração utilizando gradiente de cloreto de lítio (Mason & Schmidt, 2002).....	165
I.2.3. Quantificação do RNA total.....	167
I.2.4. Preparo de RNA total livre de DNA.....	171
I.2.5. Síntese de cDNA.....	171
I.2.6. Validação da expressão dos genes candidatos por RT-PCR.....	172
I.2.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	172
I.2.6.2. Análise dos resultados obtidos.....	173
I.2.7. Quantificação da expressão dos genes validados por RT-PCR...	178
I.2.7.1. Desenho dos <i>primers</i>	178
I.2.7.2. Análise semi-quantitativa da expressão gênica.....	181
I.2.7.3. Análise quantitativa da expressão gênica: PCR em tempo real.....	182
I.2.7.4. Resultados obtidos para os candidatos com padrão de expressão ubíquo.....	185
Identification of suitable internal control genes for expression studies in <i>Coffea arabica</i> under different experimental conditions.....	191
I.2.7.5. Resultados obtidos para os candidatos com padrão de expressão tecido-específico.....	203
I.2.8. Conclusões.....	210
Referências bibliográficas.....	211
CAPÍTULO II: AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DAS REGIÕES PROMOTORAS DOS GENES DE INTERESSE.....	213
II.1. Material Vegetal: <i>Coffea arabica</i>	216
II.2. Extração do DNA genômico.....	216
II.3. Construção de Bibliotecas <i>GenomeWalker</i>	218
II.4. Obtenção das seqüências promotoras dos genes de interesse.....	220
II.5. Clonagem dos fragmentos.....	222
II.6. Seqüenciamento da região de interesse dos plasmídeos.....	225
II.7. Análise das seqüências e busca de domínios regulatórios.....	227
II.8. Construções gênicas em pCAMBIA 1305.1.....	227
II.8.1. Desenho de oligonucleotídeos.....	228
II.8.2. Amplificação dos fragmentos.....	229
II.8.3. Restrição dos fragmentos e do vetor de expressão em plantas..	229
II.9. Clonagem em vetor binário para transformação de plantas.....	231
II.10. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	231
II.11. Análise funcional das regiões promotoras putativas por expressão transiente.....	233
II.11.1. Transformação transiente de plantas por agroinfiltração.....	233
II.11.2. Ensaio histoquímico da atividade GUS.....	234

II.11.3. Ensaio fluorimétrico da atividade GUS.....	235
II.12. Resultados obtidos.....	237
II.12.1. Análise funcional das putativas regiões promotoras.....	237
II.12.2. Caracterização das putativas regiões promotoras isoladas.....	241
II.12.2.1. Promotor do gene <i>GAPDH</i> de café (<i>pCaGAPDH</i>).....	242
II.12.2.1.1. O gene <i>GAPDH</i>	242
II.12.2.1.2. A enzima GAPDH.....	243
II.12.2.1.3. Caracterização do promotor do gene <i>CaGAPDH</i>	246
II.12.2.2. Promotor do gene <i>AN2</i> de <i>Coffea arabica</i> (<i>pCaAN2</i>).....	251
II.12.2.2.1. O gene <i>AN2</i>	251
II.12.2.2.2. Atividade biológica de proteínas MYB-R2R3.....	254
II.12.2.2.3. Caracterização do promotor do gene <i>CaAN2</i>	259
II.12.2.3. Promotores de genes de defesa do café.....	263
Expression profiling of the host response to fungal infection: molecular characterization of pathogen defense-related genes in coffee (<i>Coffea arabica</i>).....	265
II.13. Conclusões.....	311
Referências bibliográficas.....	313
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	325
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	329
Artigos completos publicados em periódicos.....	329
Resumos publicados em anais de congressos.....	330

ABREVIATURAS DOS GENES ESTUDADOS NESTE TRABALHO*

1.	F-BOX	F-box family protein
2.	ALBUMIN	2S albumin
3.	TURNIP	lipid transfer like protein
4.	LRR	leucine-rich repeat family protein
5.	AN2	anthocyanin 2 protein
6.	ND	No hits found
7.	α -GALAC	α -galactosidase
8.	β -GALAC	β -galactosidase
9.	β -MAN	(1-4)- β -mannan endohidrolase
10.	β -MANNAN	β -mannanase
11.	GLICININ	glicinin
12.	GLUTELIN	seed storage glutelin GluB-4
13.	LEG B4	legumin B4
14.	PHATER	AP2/ERF-domain protein
15.	PECTIN	pectinesterase 3
16.	PME	pectin methylesterase
17.	POLYGAL	polygalacturonase
18.	SSP	seed storage protein
19.	SP	late embryogenesis abundant protein D-34
20.	VICILIN	vicilin storage protein
21.	GLOBULIN	11S storage globulin
22.	LEGUMIN	legumin
23.	TUBULIN	tubulin β -9 chain
24.	POLYUBIQ	polyubiquitin (ubq10)
25.	14-3-3	14-3-3 protein
26.	ADH	alcohol dehydrogenase class III
27.	ACTIN	actin 7
28.	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
29.	PEPC	phosphoenolpyruvate carboxylase
30.	rRNA 1	60S ribosomal protein L7
31.	CYSTEIN	cysteine proteinase
32.	CITc	cytochrome B6-F complex iron-sulfur subunit 1
33.	CCS1	caffeine synthase 1
34.	FLAVAN	flavanone-3-hydroxylase
35.	MYB	Myb family transcription factor
36.	NADP	malate dehydrogenase
37.	rRNA 2	ribosomal protein S17p family
38.	RUBISCO	rubisco small subunit
39.	THEOBRO	theobromine synthase 2
40.	PR1b	basic form of pathogenesis-related protein type 1
41.	NPR1	nonexpressor of pathogenesis-related genes

*Estas abreviaturas foram denominadas de modo informal para representar as proteína decodificadas pelos genes de interesse.

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROMOTORES DE GENES DE CAFÉ (*Coffea arabica*)

A caracterização de promotores ubíquos, tecido-específicos ou induzidos sob determinada condição é importante para a produção e liberação comercial de plantas geneticamente modificadas. Este trabalho apresenta a identificação e caracterização de promotores de genes de café (*Coffea arabica*), uma cultura de grande importância sócio-econômica. Foram selecionados 41 genes candidatos com padrão de expressão constitutivo, fruto-específico ou relacionados com o mecanismo de defesa, através de dados da literatura e da análise *in silico* em bancos de ESTs disponíveis. A expressão constitutiva ou específica foi confirmada através de PCR quantitativa para somente 10 dos genes analisados. Os experimentos foram realizados em 5 diferentes tecidos/órgãos (raiz, caule, folha, flor e fruto) ou em plantas tratadas com o fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*. Regiões promotoras de 4 genes foram isoladas através de *genome walking*: *CaGAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* como candidato constitutivo), *CaAN2* (*anthocyanin 2* específico de fruto), *CaPR1b* e *CaNPR1* (*basic form of Pathogenesis-Related protein type 1* e *Nonexpressor of PR genes*, correspondentes a genes induzidos mediante a presença de agentes patogênicos). As regiões *cis*-reguladoras foram caracterizadas *in silico* e a funcionalidade dos promotores foi avaliada *in planta* através da expressão do gene repórter *uidA* em experimentos de transformação transiente em plantas de tabaco ou tomate. Além do interesse fundamental para a compreensão dos mecanismos de regulação gênica em eucariotos, os resultados desta pesquisa são importantes para o desenvolvimento de plantas transgênicas, apresentando também potencial em programas de melhoramento genético do cafeeiro.

Palavras-chaves: *Coffea arabica*, expressão gênica, promotores, genes ubíquos, frutos, resistência de plantas.

RÉSUMÉ

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES PROMOTEURS DES GÈNES DU CAFÉIER (*Coffea arabica*)

Le choix du promoteur dirigeant l'expression d'un gène d'intérêt est une des clés déterminantes des applications en biotechnologie végétale. L'objectif principal de cette étude est l'identification et la caractérisation de différents promoteurs chez le caféier (*Coffea arabica*), espèce végétale d'importance socio-économique élevée. Quarante-et-un gènes constitutifs, spécifiques de fruits, ou liés aux mécanismes de défense ont été sélectionnés d'après les données de la littérature et l'analyse *in silico* des bases de données d'ESTs disponibles. L'expression constitutive ou spécifique a été confirmée pour seulement 10 de ces gènes par PCR quantitative sur 5 tissus distincts (racine, tige, feuille, fleur et fruit), ou après traitement par le champignon parasite *Hemileia vastatrix*. Les séquences promotrices ont été isolées par marche chromosomique pour 4 gènes: *CaGAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* comme candidat constitutif), *CaAN2* (*anthocyanin 2* spécifique de fruit), *CaPR1b* et *CaNPR1* (*basic form of Pathogenesis-Related protein type 1* et *Nonexpressor of PR genes*, inductibles par les agents pathogènes). Les séquences *cis*-régulatrices ont été caractérisées *in silico* et l'activité des promoteurs a été évaluée *in planta* à l'aide du gène rapporteur *uidA* par transformation transitoire de feuilles de tabac et de fruits de tomate. Au-delà de la caractérisation de promoteurs, utilisables pour l'amélioration génétique du caféier, cette étude apporte également des données fondamentales pour la compréhension des mécanismes de régulation d'expression génique chez les plantes pérennes.

Mots-clés: *Coffea arabica*, expression génique, promoteurs, genes constitutifs, fruits, résistance des plantes.

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GENE PROMOTERS IN COFFEE (*Coffea arabica*)

The choice of promoter, to confer constitutive, spatial and/or temporal transgene expression, is important in plant biotechnology applications. This study presents the identification and characterization of different gene promoters in coffee (*Coffea arabica*), a species of major socio-economic characteristics. Forty one constitutive, fruit-specific or pathogen defense-related genes were identified following literature data or *in silico* analyses in available EST databases. The expression levels of these genes were verified by quantitative PCR and only 10 genes presented a constitutive or specific expression condition. The expression levels assays were carried out in 5 coffee organs/tissues (root, stem, leaves, flowers and fruits) or in coffee plants challenged with *Hemileia vastatrix*. The promoter region of 4 genes were isolated and characterized *in silico*: *CaGAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* as inner control), *CaAN2* (*anthocyanin 2* fruit-specific), *CaPR1b* and *CaNPR1* (basic form of *Pathogenesis-Related protein type 1* and *Nonexpressor of PR genes*, both pathogen-inducible). The functional analyses of the DNA sequence upstream of these genes were assessed with regard to the *uidA* reporter gene, via *Agrobacterium*-mediated transient expression assay in tobacco or tomato plants. The characterization of promoters is not only an approach towards coffee breeding programs, but also provides fundamental data for understanding the mechanisms regulating gene expression in perennial plants.

Keywords: *Coffea arabica*, gene expression, promoters, housekeeping genes, fruits, plant resistance.

RÉSUMÉ LONG

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Le café est une ressource agricole importante, classée parmi les 5 produits d'exportation les plus importants en provenance des pays en voie de développement. De plus, la production et la transformation du café emploient plus de 25 millions de personnes dans le monde, en particulier au Brésil où la production de café est l'un des piliers majeurs de l'économie. Depuis les années 50, des efforts importants ont été continuellement conduits afin d'améliorer l'efficacité du secteur de la production du café, en particulier celui concernant les problèmes phytosanitaires et la qualité de la boisson.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans un objectif général d'amélioration génétique du caféier pour une résistance accrue aux parasites et pour une meilleure qualité à la tasse. Plus précisément, l'objectif principal de cette thèse est l'identification et la caractérisation de différents promoteurs chez le caféier (*Coffea arabica*). Ils pourraient être utilisés en bioingénierie afin de diriger l'expression des transgènes chez le caféier mais également chez d'autres plantes. Nous nous sommes fixés pour objectif de travailler avec 2 types de gènes : les gènes constitutifs, qui sont exprimés dans tous les organes et tissus, et les inductibles, qui sont exprimés dans des conditions spécifiques. Le clonage des promoteurs de gènes constitutifs permettrait l'expression hétérologue des gènes dans tous les organes/tissus. Concernant, les promoteurs inductibles, nous avons décidé de travailler avec ceux liés au développement des fruits, à partir desquels est extrait le café, et

ceux inductibles par les pathogènes, en raison de leur importance économique élevée dans le contexte des objectifs d'amélioration du caféier.

Ce travail de thèse est le fruit d'une collaboration entre l'Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP (Botucatu, Brésil) et l'Institut de Recherche pour le Développement - IRD (Montpellier, France) grâce à un accord de co-encadrement de thèse (UNESP / UM2 - Université Montpellier 2 - Sciences et Techniques du Languedoc) et une bourse financée par le CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brésil), au sein du Collège Doctoral Franco-Brésilien. Les travaux de thèse ont commencé en 2005 à l'UNESP par la sélection de gènes dont l'expression est soit constitutive, soit spécifique des fruits. A partir de 2007, les recherches ont été étendues à l'étude de gènes induits par les parasites au sein de l'UMR (Unité Mixte de Recherche) Résistance des Plantes aux Bioagresseurs (RPB) de l'IRD.

Le mémoire est constitué de 4 parties :

1. Une introduction bibliographique qui présente, dans un premier temps, les connaissances actuelles sur le caféier et le pathosystème caféier – *Hemileia vastatrix*, puis qui développe 2 thèmes principaux : 1) les mécanismes de régulation de la transcription des gènes et 2) la résistance des plantes aux bioagresseurs, avec une description poussée des mécanismes de reconnaissance et des réponses de défense, en liaison avec la sélection de gènes candidats opérée dans la thèse.
2. Un chapitre rapportant les résultats acquis sur la sélection de gènes dont l'expression est constitutive ou spécifique des fruits (chapitre I).
3. Un chapitre décrivant le clonage et l'analyse fonctionnelle des promoteurs de 4 gènes dont l'expression est constitutive, spécifique des fruits, ou induite par les parasites (chapitre II).
4. Enfin, des conclusions générales et perspectives sont présentées.

La sélection et l'analyse des gènes constitutifs (partie du chapitre I) font l'objet d'un article publié dans la revue BMC Molecular Biology [Barsalobres-Cavallari *et al.* (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology* 10:1]. De plus, il est important de noter qu'aucun contrôle interne adapté n'avait été défini pour *Coffea arabica* avant notre travail de recherche.

Dans ce résumé, nous présentons rapidement les données bibliographiques relatives au caféier et aux réponses de défense des plantes, puis les résultats acquis, en suivant l'organisation du mémoire écrit en portugais.

2. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

2.1. Le caféier : ressources génétiques et génomiques

Le genre *Coffea* (tribu Coffeae, famille Rubiaceae) comprend environ une centaine d'espèces. Les caféiers sont des espèces forestières de sous-bois, originaires d'Afrique. Les espèces cultivées *C. arabica* Linnaeus (*arabica*) et *C. canephora* Pierre (*robusta*) représentent respectivement 70% et 30% du marché du café. Les caféiers *arabica* fournissent une boisson de qualité supérieure et sont particulièrement sensibles aux parasites (champignons, nématodes, insectes), tandis que les caféiers *robusta* produisent un café de moindre qualité mais se montrent bien plus résistants aux bioagresseurs.

Les maladies d'origine fongique, telles que la rouille orangée des feuilles et l'antrachnose des baies (CBD pour *Coffe Berry Disease*), causées respectivement par *Hemileia vastatrix* (Berkeley et Broome) et *Colletotrichum kahawae* (Bridge et Waller) sont un des facteurs limitants de la production de café. L'espèce *C. arabica* est très sensible à l'infection par *H. vastatrix*, qui est présent dans toutes les régions du monde où sont cultivés les caféiers (Kushalappa & Eskes, 1989). Les urédospores d'*H. vastatrix*

pénètrent dans les feuilles de caféier par les stomates et développent des pustules orange poudreuses sur la surface abaxiale des feuilles, ce qui entraîne une déficience de la photosynthèse, une défoliation prématurée et une diminution du rendement au champ. Le contrôle chimique de la maladie est possible mais présente des inconvénients, car il est extrêmement onéreux, et présente des difficultés dans son application.

Ce scénario a conduit les programmes d'amélioration du caféier à sélectionner des plants résistants à ces maladies, comme principale approche de protection intégrée. Cependant, les espèces appartenant au genre *Coffea* sont toutes diploïdes ($2n = 2x = 22$) à l'exception de *C. arabica* qui est tétraploïde ($2n = 4x = 44$). L'espèce *C. arabica* serait le résultat d'une hybridation spontanée entre deux espèces diploïdes sauvages (*C. eugenioides*, d'une part, et *C. canephora* ou *C. congensis*, d'autre part) ayant conduit à la formation d'un allotétraploïde naturel (Lashermes *et al.*, 1999 ; Petitot *et al.*, 2008).

Ainsi, pour combiner les caractères génétiques de *C. canephora* avec ceux de *C. arabica*, les techniques d'amélioration génétique traditionnelles ont fait largement profit de l'Hybride de Timor, une variété tétraploïde résultant d'une hybridation naturelle de *C. arabica* avec *C. canephora*. Cependant, le transfert de facteurs de résistance d'espèces sauvages vers les variétés de *C. arabica* cultivées reste très difficile, et s'accompagne généralement de facteurs génétiques défavorables à la qualité (Bertrand *et al.*, 2003). Les approches en biotechnologies et la recherche transgénique peuvent donc être utiles pour surpasser ces goulots d'étranglement ainsi que pour apporter de l'aide aux programmes d'amélioration conventionnels. Il faut rappeler que cette espèce ligneuse pérenne est particulièrement difficile à étudier et que son cycle de développement est très lent, ce qui ralentit la progression de la recherche.

Bien que la transformation génétique du caféier soit encore une technologie difficile à mettre en œuvre, elle permet déjà d'envisager l'étude de caractères importants au niveau moléculaire (Alpizar *et al.*, 2008). Les ressources génomiques (EST - *Expressed Sequence Tag*) du caféier sont en

progression constante (Fernandez *et al.*, 2004 ; Lin *et al.*, 2005 ; Vieira *et al.*, 2006), ce qui permet désormais le développement et le déploiement d'outils efficaces pour la découverte des gènes et l'analyse de la génétique fonctionnelle chez le caféier. Actuellement, il y a en parallèle plusieurs projets de génomique du caféier qui ont lieu dans différents instituts dans le monde. Pourtant, l'accessibilité publique des bases de données ESTs est limitée à 527 unigènes de *C. arabica* associés aux réponses de résistance du caféier à la rouille (Fernandez *et al.*, 2004) et à 13157 unigènes de *C. canephora* liés au développement du fruit (Lin *et al.*, 2005). Au Brésil, nous avons accès aux 200.000 ESTs de *C. arabica* produites dans le cadre du projet GenomaCafé, qui rassemble plusieurs instituts de recherche (Vieira *et al.*, 2006).

Excepté pour les études concernant le métabolisme de la caféine chez le caféier, seules quelques données sont disponibles concernant les gènes, enzymes et voies métaboliques de beaucoup d'autres composés biochimiques aussi importants pour la qualité du café (Geromel *et al.*, 2006 ; Leroy *et al.*, 2006 ; Simkin *et al.*, 2008), pour la santé humaine ou la résistance des plantes aux maladies (Silva *et al.*, 2006). A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur les promoteurs, excepté concernant la voie de biosynthèse de la caféine (Satyanarayana *et al.*, 2005), la petite sous unité rubisco (Marraccini *et al.*, 2003) et les protéines de stockage des graines 11S (Acuña *et al.*, 1999 ; Marraccini *et al.*, 1999).

2.2. Mécanismes de défense des plantes

Les plantes, à l'instar des animaux, sont continuellement exposées aux attaques de parasites et ont développé un mécanisme de surveillance naturel leur permettant de prévenir les tentatives d'infection. Celles-ci donnent généralement lieu à une réponse spécifique, dépendant des constitutions génétiques de la plante et de l'agresseur (pour revue Jones & Dangl, 2006). La différence clé entre les interactions de compatibilité (sensibilité) et incompatibilité (résistance) réside dans la reconnaissance de

l'agent pathogène et dans l'expression rapide de réponses défensives. Lors d'une interaction d'incompatibilité, le pathogène demeure localisé dans la zone d'infection primaire, souvent visible sous la forme de lésion nécrotique locale sur les feuilles. Cette réaction de défense est qualifiée de réaction d'hypersensibilité (RH). Ce type de réponse déclenche *a posteriori* un mécanisme général de résistance protégeant les parties non infectées de la plante contre une nouvelle attaque du pathogène, un phénomène appelé résistance systémique acquise (RSA) (Ryals *et al.*, 1996). La mise en œuvre des réactions de RH et RSA s'accompagne d'une induction coordonnée d'un groupe hétérogène de protéines dans les feuilles infectées et saines, communément appelée protéines liées à la pathogénèse (*Pathogenesis-Related proteins*, PRs) (pour revue Van Loon *et al.*, 2006).

Bien que de fonction non clairement définie, l'expression des gènes de PR a servi de marqueurs fiables de l'induction de la RSA (Broekaert *et al.*, 1995). Initialement, il a été découvert que les protéines PR étaient fortement inductibles par l'application d'acide salicylique (AS) exogène (Friedrich *et al.*, 1996). En parallèle, il a été démontré que les niveaux d'AS tissulaires augmentent significativement localement et de façon systémique chez les plantes montrant une RH (Malamy *et al.*, 1990 ; Anand *et al.*, 2008). De plus, les plantes dont l'accumulation d'AS est inhibée présentent des dysfonctionnements dans la RSA, ainsi que dans l'expression des gènes *PR* (Devadas *et al.*, 2002 ; Shah, 2003).

On a découvert qu'un élément de réponse lié à l'AS, appelé *activation sequence-1 (as-1)*, avait un effet sur le promoteur des gènes *PR* (Zhang *et al.*, 1999 ; Johnson *et al.*, 2003). *as-1* se caractérise par un motif TGACG qui se lie au facteur de transcription bZIP de la famille TGA des plantes. L'interaction entre les *cis*-éléments *as-1* et les facteurs TGA est cruciale dans la régulation des gènes *PR* (Zhang *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2000 ; Kinkema *et al.*, 2000 ; Subramaniam *et al.*, 2001 ; Johnson *et al.*, 2003 ; Dong, 2004).

Cette interaction lors de l'activation des gènes implique une nouvelle protéine appelée NPR1 (*Nonexpressor of PR genes*). Les *Arabidopsis* mutants pour la protéine NPR1 (*npr1*) sont incapables d'exprimer les gènes *PR* (*PR-1*, *PR-2*, et *PR-5*), et n'arrivent pas à développer de résistance aux agents pathogènes (Cao *et al.*, 1994).

La protéine NPR1 comporte deux motifs d'interaction protéine-protéine conservés, une région de répétitions ankyrine et un large complexe, *tramtrack*, *bric à brac/poxviruses* et domaine en doigts de zinc (BTB/POZ - *broad-complex*, *tramtrack*, and *bric-à-brac/poxvirus*, *zinc finger*) (Rochon *et al.*, 2006).

En cas d'attaque pathogène, l'accumulation de SA provoque un changement du potentiel redox des cellules, conduisant à la conversion du NPR1 inactif, présent dans le cytosol sous forme d'oligomère, en NPR1 actif, sous forme de monomère, et qui entre alors dans le noyau et interagit avec les facteurs de transcription TGA (Kinkema *et al.*, 2000 ; Mou *et al.*, 2003 ; Rochon *et al.*, 2006). A son tour, cette interaction stimule la fixation des facteurs de transcription TGA aux éléments de réponse AS dans le promoteur des gènes *PR*, donnant lieu au début de la RSA (Kinkema *et al.*, 2000 ; Rochon *et al.*, 2006).

En relation avec son rôle de co-activateur du facteur TGA, il a été montré que NPR1 interagissait *in vivo* et *in vitro* avec les différents membres de la famille TGA. Cette interaction a été rapportée pour les facteurs de transcription d'*Arabidopsis*, du tabac, de la tomate et du riz (Zhang *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2000 ; Després *et al.*, 2000 ; Subramaniam *et al.*, 2001 ; Chern *et al.*, 2001 ; Fan & Dong, 2002). Un schéma résume les données concernant le rôle de NPR1 et des PR-protéines dans les réponses de défense des plantes aux agents pathogènes (Figure 1).

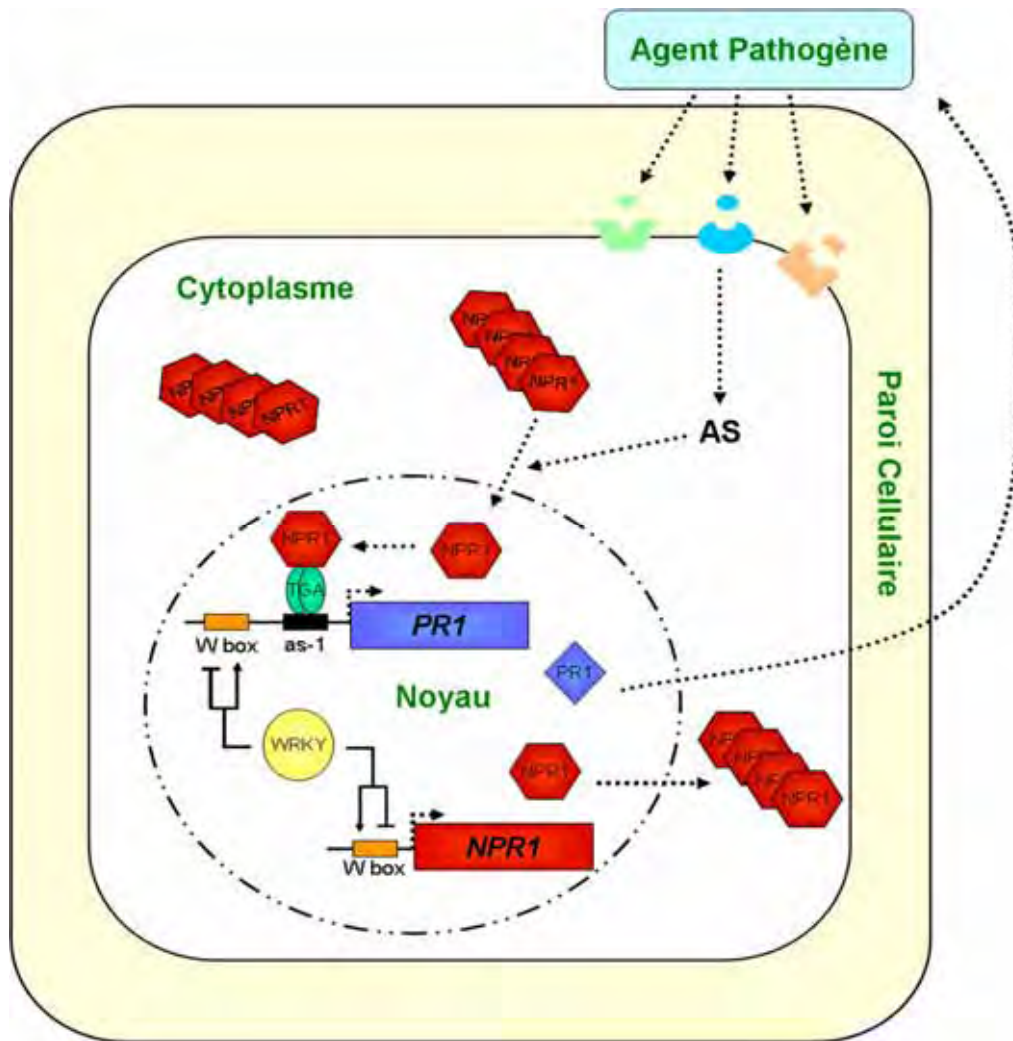


Figure 1 - Schéma de la signalisation cellulaire de défense déclenchée par la reconnaissance des agents pathogènes. La reconnaissance de l'agresseur par l'hôte déclenche un changement du potentiel redox des cellules par l'accumulation de SA. La réponse au SA consiste en une conversion d'oligomères en monomères de la protéine NPR1, qui sont transloquées vers le noyau. Une protéine se fixant sur l'ADN de la famille des TGA-*element binding protein*, s'associe à NPR1 et sa forme tronquée stimule la fixation des facteurs de transcription TGA-NPR1 aux éléments de réponse AS (as-1) dans le promoteur des gènes *PR*, donnant lieu au début de la RSA. Il est également connu que les facteurs de transcription de type WRKY peuvent réguler l'expression des gènes *PR1* et *NPR1* en interagissant avec W box éléments présentes dans leurs régions promotrices. Schéma réalisé à partir des données de Kinkema *et al.*, 2000 ; Rochon *et al.*, 2006 et Pandey & Somssich, 2009.

Par ailleurs, les gènes codant pour *PR1* et *NPR1* sont régulés par des facteurs de transcription de type WRKY. Ces protéines semblent en effet jouer un rôle important dans la régulation des mécanismes de défense des plantes (pour revue, Pandey & Somssich, 2009). Cette famille de facteurs de transcription sont induits en réponse à des infections provoquées par une grande variété de pathogènes, tels les virus, les bactéries et les champignons, ainsi que par les molécules signal comme l'AS et l'acide jasmonique (AJ). Les protéines WRKY possèdent un ou deux motifs de fixation, région de 60 acides aminés qui contient une séquence WRKYGQK et un domaine similaire à un motif doigts de zinc. Ces protéines se fixent à une élément (T)TGACY, où Y est soit un C soit un T, qui est une séquence conservée appelée boîte «W» (W box), présente dans les promoteurs de beaucoup de gènes de défense des plantes. Une seule région promotrice peut comporter des amas de plusieurs motifs W box, indiquant que les protéines WRKY pourraient agir en synergie. Ces boîtes sont également présentes dans les promoteurs de certains gènes *WRKY*, montrant un mécanisme d'induction auto-régulé.

Le groupe de Résistance des Plantes aux Bioagresseurs (RPB) de l'IRD, travaille à l'identification et l'analyse fonctionnelle des gènes du caféier (*C. arabica*) liés à la résistance à la rouille *Hemileia vastatrix* ainsi qu'aux nématodes. Le groupe a isolé des gènes associés à l'expression de mécanismes de défense précoce des plants de caféiers à *H. vastatrix* par hybridation soustractive et suppressive (SSH) (Fernandez *et al.*, 2004). En particulier, un facteur de transcription WRKY chez le caféier (*CaWRKY1*) a récemment été isolé et caractérisé (Petitot *et al.*, 2008). Dans ce travail de thèse, nous avons identifié les promoteurs des gènes *CaPR1b* et *CaNPR1* du caféier pour une meilleure compréhension de la régulation de ces gènes lors des réponses de défense de la plante. Par ailleurs, des essais de *trans*-activation ont été entrepris pour vérifier si ces promoteurs pouvaient être la cible de *CaWRKY1*. Une partie des ces résultats est présentée sous la forme d'un article dans le chapitre II.

3. SELECTION, ISOLEMENT ET CARACTERISATION CHEZ LE CAFEIER DE GENES PRESENTANT UNE EXPRESSION CONSTITUTIVE, SPECIFIQUE DES FRUITS OU INDUITE LORS DE LA REPONSE A UNE ATTAQUE PATHOGENE (CHAPITRE I)

3.1. Identification et caractérisation de gènes du caféier d'expression constitutive ou spécifique des fruits

Dans ce travail, les gènes constitutifs et spécifiques de fruits ont été recherchés parmi les 200.000 ESTs disponibles dans la base de données brésilienne (*Coffee Genome Project*, <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafes/>; Vieira *et al.*, 2006).

A partir de données de la littérature, et d'analyses *in silico* de la distribution des ESTs dans les différentes banques d'ADNc représentatives de différents organes de caféier, nous avons sélectionné pour cette analyse dix-sept gènes « constitutifs » et vingt deux gènes « fruit-spécifiques ». Les données sont présentées dans le chapitre I de la thèse (Tableaux 1.1. à 1.7.). Ces gènes ont été analysés par utilisation de la PCR en transcription reverse (RT-PCR), afin de vérifier leur expression dans les tissus du caféier (Figures 1.4 à 1.7). Cinq gènes décrits comme constitutifs ont montré une expression différentielle selon les tissus. Inversement, treize gènes considérés comme spécifiques des fruits ont révélé une expression ubiquitaire chez le caféier. Ces gènes ont été éliminés de l'étude.

L'expression des gènes restants a été vérifiée par une technique plus fiable, la PCR quantitative (qPCR). Seuls trois gènes (*rRNA*, *14-3-3* et *GAPDH*) ont présenté une expression réellement constitutive dans cinq organes/tissus analysés (racines, tige, feuille, fleurs et fruits) alors que cinq autres (*ALBUMIN*; *AN2*; *SSP*; *SP* et *LEGUMIN*) ont montré une expression spécifique des fruits lors des essais de qPCR (Fig. 1.12). Les principaux résultats de la sélection des gènes constitutifs et de l'analyse d'expression sont présentés sous forme d'article publié dans une revue scientifique (Barsalobres-Cavallari *et al.*, 2009).

Par marche sur le génome, les séquences complètes des gènes *CaGAPDH* et *CaAN2* ont été amplifiées, clonées et séquencées. Une analyse détaillée des motifs peptidiques et des relations phylogénétiques avec les protéines GAPDH et AN2 d'autres plantes est présentée dans le manuscrit. Le gène *CaGAPDH* coderait pour l'enzyme GAPDH - EC 1.2.1.12 (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) qui est impliqué dans la voie de la glycolyse et de la néoglucogenèse chez la plupart des bactéries et des eucaryotes (Valverde *et al.*, 1999). Le gène *CaAN2* présente des similarités de séquence avec le gène *AN2* (*anthocyanin 2*) de Pétunia, qui code un facteur de transcription de type MYB, nécessaire à la synthèse d'anthocyanines, et qui régule, principalement, l'expression des gènes *DFR* (dihydroflavonol réductase) (Spelt *et al.*, 2002).

3.2. Identification et caractérisation de gènes du caféier induits lors de la réponse à une attaque pathogène

Des ESTs présentant des homologies avec les gènes *PR1* et *NPR1* d'*A. thaliana* et du tabac ont été identifiés dans les banques de données de l'IRD et du Brésil. Comme précédemment, les séquences complètes des gènes *CaPR1b* et *CaNPR1* ont été obtenues par marche sur le génome. Une analyse détaillée des motifs peptidiques et des relations phylogénétiques avec les protéines PR1 et NPR1 d'autres plantes est présentée. La protéine CaNPR1 présente un motif leucine zipper qui n'ai été pas rapporté chez aucune autre protéine NPR1 identifiée à ce jour. De façon générale, les protéines de caféier se rapprochent davantage de celles des Solanacées (tomate) que de celles des Brassicacées (*Arabidopsis*) au sein du clade des Astérides I (sensu APG II, 2003).

L'étude de l'expression des gènes *CaPR1b* et *CaNPR1* en réponse à l'inoculation par le champignon *H. vastatrix* (interaction compatible) a montré que *CaPR1b* était induit 8 à 12 heures après inoculation et que les niveaux de transcrits de *CaNPR1* n'ont pas non plus changé. A l'IRD, les travaux entrepris en parallèle ont confirmé ces données

en montrant notamment que *CaPR1b* était induit précocement dans le cadre d'interactions compatibles, mais que son activation n'était maintenue après 24h que dans l'interaction incompatible (Ramiro *et al.*, 2009).

4. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES PROMOTEURS DE GENES DU CAFEIER (CHAPITRE II)

Les promoteurs des gènes : constitutif (*CaGAPDH*) , spécifique de fruit (*CaAN2*) ou inductibles par les agents pathogènes (*CaPR1* et *CaNPR1*) ont été isolés et caractérisés. Par marche sur le gène, les séquences de *pCaGAPDH* (1459 pb), *pCaAN2* (1186 pb), *pCaPR1b.1* (820 pb), *pCaPR1b.2* (822 pb) et *pCaNPR1* (1444 pb) ont été amplifiées et clonées. Pour le gène *CaPR1*, les deux séquences isolées *pCaPR1b.1* et *pCaPR1b.2* présentent 95% d'homologie et sont probablement des copies homéologues du génome allotétraploïde de *C. arabica*.

Leur analyse *in silico* a permis l'identification de multiples motifs de régulation de l'expression des gènes (plusieurs centaines pour chaque promoteur). Pour vérifier la fonctionnalité des séquences promotrices, des constructions portant ces séquences en amont du gène rapporteur *uidA* ont été réalisées et insérées dans des vecteurs binaires. L'activité des promoteurs a été évaluée *in planta* en dosant l'activité GUS après transformation transitoire, par agro-infiltration, de feuilles de tabac et de fruits de tomate. Les séquences promotrices *pCaGAPDH*, *pCaPR1b.1*, *pCaPR1b.2* et *pCaNPR1* sont fonctionnelles dans les feuilles de tabac (Fig. 2.3 et 2.4). Par contre, aucune activité GUS n'a été obtenue pour *pCaAN2*, en accord avec une expression qui serait spécifique aux fruits. Cependant, la fonctionnalité de *pCaAN2* n'a pas encore pu être vérifiée, les essais d'expression transitoire dans les tomates n'ayant pas été concluants, des faux positifs ayant été obtenus (Fig. 2.5).

Les gènes *CaPR1b* et *CaNPR1* étant inductibles par l'AS, on a vérifié l'activation des promoteurs *pCaPR1b.1*, *pCaPR1b.2* et *pCaNPR1* après application exogène d'AS sur les feuilles de tabac. On montre que pour le *pCaNPR1* être actif il est nécessaire la présence de l'AS. En revanche, l'application de AS n'a pas affecté l'expression du gene *uidA*, dirigé par les promoteurs *pCaPR1b.1* et *pCaPR1b.2*.

Des essais de *trans*-activation de ces promoteurs ont également été entrepris dans ce travail afin de vérifier si la protéine CaWRKY1 pouvait contrôler l'expression des gènes *CaPR1b* et *CaNPR1*. Les résultats obtenus par transformation transitoire de feuilles de tabac n'ont pas permis de conclure et des plantes d'*A. thaliana* sur-exprimant le gène *CaWRKY1* ont été préparées pour s'affranchir des effets secondaires liés à l'agro-infiltration de ce gène.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Devant les résultats obtenus dans ce travail, on peut conclure que l'analyse *in silico* (*Northern* électronique) de ESTs est une méthode peu sensible pour l'identification des gènes dont l'expression est organe/tissu spécifique, en produisant grande quantité de faux positifs.

Les expériences de RT-PCR ont été importantes pour la sélection des gènes candidats. D'un autre côté, la technique de PCR quantitative a été indispensable pour la quantification précise des niveaux d'expression génique dans les différents tissus/organes étudiés.

Dans ce travail, plusieurs gènes de caféier ont été identifiés, clonés, et leurs promoteurs caractérisés. Nous avons montré que le gène *CaGAPDH* s'exprime de façon constitutive dans différents tissus du caféier et qu'il peut être utilisé comme normalisateur pour les études d'expression des gènes chez le caféier. *CaGAPDH* présente des homologues de séquence en acides aminés avec l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Cette protéine est une des enzymes clés de la glycolyse. Les profils

d'expression de *CaGAPDH* sont cohérents avec un rôle de gène de ménage, essentiel au métabolisme carboné de la plante.

CaAN2, un gène qui s'exprimerait spécifiquement dans les fruits a été isolé, à partir d'analyses *in silico*, et son expression a été vérifiée sur des échantillons issus de divers organes. Par contre, l'analyse de son promoteur *pCaAN2* doit être poursuivie pour confirmer qu'il dirige bien une expression fruit-spécifique. *CaAN2* possède des homologies avec le facteur de transcription *anthocyanin 2* de type MYB qui régule la synthèse d'anthocyanines chez le Pétunia. Cette famille de facteurs de transcription comprend de nombreux membres dont les rôles dans différents processus (développement et défense essentiellement) ont été démontrés (Yanhui *et al.*, 2006).

Enfin, deux gènes impliqués dans les réponses de résistance aux agents pathogènes ont été caractérisés. *CaNPR1* présente des homologies de séquence avec le gène *NPR1* régulateur de la voie de résistance dépendante de l'AS (Cao *et al.*, 1994). *NPR1* est un élément clé de la mise en place de la résistance systémique acquise chez les plantes, efficace contre de nombreux agents pathogènes de type biotrophe. Dans ce cadre, la protéine NPR1 régule la transcription de gènes de défense, notamment celui de *PR1* qui code pour une protéine PR de type 1 (Mukhtar *et al.*, 2009 ; Spoel *et al.*, 2009). Selon la littérature, ces deux gènes sont inductibles par les agents pathogènes et l'AS, qui joue un rôle de molécule signal dans cette voie de résistance. Les résultats de notre étude démontrent une augmentation significative de l'expression du gène *CaPR1b* en réponse à l'inoculation par le champignon *H. vastatrix* dans l'interaction compatible. Par contre, on n'a pas observé des changements significatifs des niveaux de transcrits de *CaNPR1*.

Cinq régions régulatrices ont été isolés et caractérisés : une pour un gène constitutif (*pCaGAPDH*, 1459 pb), une pour un gène dont l'expression est spécifique des fruits (*pCaAN2*, 1186 pb), et trois correspondant à gènes inductibles par les agents pathogènes (*pCaPR1b.1*, 820 pb ; *pCaPR1b.2*, 822 pb et *pCaNPR1*, 1444 pb).

Par rapport l'activité des ces promoteurs, les résultats démontrent que les promoteurs des gènes de défense sont fonctionnels. On montre que pour le *pCaNPR1* être actif il est nécessaire la présence de l'AS. En revanche, l'application de AS n'a pas affecté l'expression du gene *uidA*, dirigé par les promoteurs *pCaPR1b.1* et *pCaPR1b.2*. Les données qui ont été obtenues sur le fonctionnement des promoteurs *pCaPR1b.1* et *pCaPR1b.2*, dans le contexte allopolyploïde de *C. arabica*, pourront apporter des connaissances intéressantes pour la compréhension de l'évolution des allèles homéologues et du contrôle de leur expression. Les données de la fonctionnalité des promoteurs *pCaGAPDH* et *pCaAN2* sont encore préliminaires et expérimentations supplémentaires sont nécessaires.

Pour la suite du travail concernant l'étude des promoteurs des gènes du caféier, soit de expression constitutive, soit une expression spécifique ou inductible, il sera intéressant dans un premier temps, de faire l'analyse d'une série de délétions situées en 5' de ces promoteurs. L'effet de délétions sur l'activation ou de la répression de l'activité des promoteurs selon les traitements subis par la plante permettra d'identifier les différents éléments *cis* régulateurs essentiels. Ces essais pourront être entrepris chez le tabac, comme précédemment. En revanche, la transformation de fruits de tomate devra être mise au point pour vérifier l'expression spécifique de *pCaAN2*. Par ailleurs, il est désormais possible d'obtenir assez rapidement des racines de caféier transformées par *A. rhizogenes* (Alpizar *et al.*, 2008), ce qui permet de vérifier la fonctionnalité du promoteur en système homologue. Des essais sont déjà en cours pour *pCaNPR1* qui confirment que son expression est inductible par le AS (Petitot A-S. - com. pers.).

Les connaissances qui seront acquises sur les éléments régulateurs de l'expression des gènes pourront ensuite permettre leur utilisation pour des applications en biotechnologie végétale. Des fruits de *C. arabica* transformés avec le gène *uidA* ont été décrits récemment (Albuquerque *et al.*, 2009), prouvant qu'une telle approche est réalisable malgré les délais de régénération puis de floraison du caféier. Il est donc raisonnable d'envisager maintenant l'obtention de plants de caféier

génétiqnement modifiés et producteurs dans un délai de moins de 5 années. Le développement de plantes transgéniques, avec des traits agronomiques spécifiques, chez lesquelles il est possible de contrôler précisément l'activité du transgène après transformation, présente un intérêt certain et les travaux devront être poursuivis dans ce sens. Parmi les applications possibles, la connaissance des promoteurs des gènes spécifiques de fruits serait d'un grand intérêt pour l'utilisation dans des stratégies de manipulation du métabolisme des fruits, et pour produire de protéines intéressantes telles que les anticorps, les molécules biopharmaceutiques et des vaccins comestibles grâce à l'ingénierie génétique. Cela permettrait également d'améliorer les aspects de stockages et les propriétés organoleptiques des grains de caféier.

Au-delà de la caractérisation de promoteurs, utilisables pour l'amélioration génétique du caféier, cette étude apporte également des données fondamentales pour la compréhension des mécanismes de régulation d'expression génique chez le caféier, et, par extension, chez les plantes pérennes.

Ainsi, concernant la compréhension de mécanismes de défense des plantes aux bioagresseurs, il serait intéressant de vérifier la fonction des gènes que nous avons caractérisés. Des approches de génétique reverse pourraient être utilisées pour ceux bien caractérisés et pour lesquels il existe des mutants chez *A. thaliana*. Récemment, la complémentation du mutant *ndr1-1* (*non-race-specific disease resistance*), impliqué dans la signalisation de la résistance chez *A. thaliana*, par le gène de caféier *CaNDR1* a été entreprise avec succès à l'IRD (Cacas *et al.*, 2009). De même, la fonction du gène *CcETR1* (*Ethylene Receptor gene*) de *C. canephora* dans la perception de l'éthylène a été montrée en utilisant la plante *A. thaliana* (Bustamante-Porras *et al.*, 2007). Ainsi, la complémentation du mutant d'*A. thaliana npr1-1* (Cao *et al.*, 1994) pourrait être tentée avec le gène *CaNPR1* relativement aisément. Il existe une lignée *npr1-1* modifiée avec le gène rapporteur *uidA* sous contrôle du promoteur d'une beta-1,3-glucanase (classe des PR2). Le rétablissement de la fonction

de *NPR1* peut être visualisé simplement par l'activation du gène rapporteur et le développement d'une coloration bleue dans les organes ciblés.

En revanche, il n'existe pas de mutants *pr1* chez *A. thaliana* qui pourraient permettre l'analyse fonctionnelle de *CaPR1*. Par contre, les mécanismes sous-tendant les régulations transcriptionnelles de *CaPR1b* et *CaNPR1* pourront être étudiés par l'analyse de la protéine CaWRKY1 agissant en tant que facteur *trans* sur leurs promoteurs.

Pour conclure, les informations apportées par ce travail de thèse sont une contribution à l'étude de la biologie et de la physiologie du caféier. A plus long terme, l'isolement et la caractérisation de gènes d'importance agronomique pourra aussi contribuer à l'amélioration génétique de *C. arabica*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acuña, R. *et al.* (1999) Coffee seeds contain 11S storage proteins. *Physiologia Plantarum* 105:122-131.
- Albuquerque, E.V.S. *et al.* (2009) Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45:532-539.
- Alpizar, E. *et al.* (2008) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Coffea arabica*: Conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization *Annals of botany*, 101:929-940.
- Anand, A. *et al.* (2008) Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 146:703-715.
- Angiosperm Phylogeny Group (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141:399-436.
- Barsalobres-Cavallari, C.F. *et al.* (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology* 10:1.
- Bertrand, B. *et al.* (2003) Impact of *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theor. Appl. Genet.* 107:387-394.
- Broekaert, W.F. *et al.* (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108:1353-1358.
- Bustamante-Porras, J. *et al.* (2007) Molecular characterization of an ethylene receptor gene (CcETR1) in coffee trees, its relationship with fruit development and caffeine content. *Molecular Genetics and Genomics* 277:701-712.
- Cacas J.-L. *et al.* (2009) The coffee CaNDR1 protein restores bacterial resistance in the *Arabidopsis thaliana ndr1-1* mutant and is plasma membrane-localized. *Molecular Plant Microbe Interactions, soumis*.
- Cao, H. *et al.* (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 6:1583-1592.
- Chern, M. *et al.* (2001) Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signalling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27:101-113.
- Després, C. *et al.* (2000) The *Arabidopsis* *NPR1/NIM1* protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12:279-290.
- Devadas, S.K. *et al.* (2002) The *Arabidopsis hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *Plant J* 30:467-480.
- Dong, X. (2004) *NPR1*, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:547-552.
- Fan, W. & Dong, X. (2002) *In vivo* interaction between *NPR1* and transcription factor *TGA2* leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:1377-1389.
- Fernandez, D. *et al.* (2004) Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* 5:527-536.
- Friedrich, L. *et al.* (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10:61-70.
- Geromel, C. *et al.* (2006) Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *Journal of Experimental Botany* 57:3243-3258.
- Johnson, C. *et al.* (2003) Salicylic acid and *NPR1* induce the recruitment of trans-activating *TGA* factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1846-1858.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kinkema, M. *et al.* (2000) Nuclear localization of *NPR1* is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* 12:2339-2350.
- Kushalappa, A.C. & Eskes, A.B. (1989). Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology* 27: 503-531.
- Lashermes, P. *et al.* (1999) Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics* 261:259-266.

- Leroy, T. *et al.* (2006) Genetics of coffee quality. *Brazilian journal of plant physiology* 18:229-242.
- Lin, C. *et al.* (2005) Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theoretical and Applied Genetic* 112:114-130.
- Malamy, J. *et al.* (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004.
- Marraccini, P. *et al.* (1999) Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37:273-282.
- Marraccini, P. *et al.* (2003) Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 41:17-25.
- Mou, Z. *et al.* (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113:935-944.
- Mukhtar, M.S. *et al.* (2009) NPR1 in plant defense: it's not over 'til it's turned over. *Cell* 137:804-806.
- Pandey, S.P. & Somssich, I.E. (2009) The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiology* 150:1648-1655.
- Petitot, A.-S. *et al.* (2008) Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Genetics and Genomes* 3:379-390.
- Ramiro, D.A. *et al.* (2009) Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*, v.58. Doi: 10.1111/j. 1365-3059.2009.02122.x
- Rochon, A. *et al.* (2006) The coactivation of the *Arabidopsis* *NPR1* requires the core of its *BTB/POZ* domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 8:3670-3685.
- Ryals, J.A. *et al.* (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1809-1819.
- Satyanarayana, K.V. *et al.* (2005) Isolation of promoter for *N-methyltransferase* gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. *Journal of Biotechnology* 119:20-25.
- Shah, J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 365-371.
- Silva, M.C. *et al.* (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18:119-147.
- Simkin, A.J. *et al.* (2008) An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *J Plant Physiol.* 165:1087-1106.
- Spelt, C. *et al.* (2002) ANTHOCYANIN1 of petunia controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant Cell* 14:2121-2135.
- Spoel, S.H. *et al.* (2009) Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* 137:860-872.
- Subramaniam, R. *et al.* (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* 19:769-772.
- Valverde, F. *et al.* (1999) Engineering a central metabolic pathway: glycolysis with no net phosphorylation in an *Escherichia coli* gap mutant complemented with a plant GapN gene. *FEBS Lett.* 449:153-158.
- Van Loon, L.C. *et al.* (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135-162.
- Vieira, L.G.E. *et al.* (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:95-108.
- Yanhui, C. *et al.* (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol.* 60:107-124.
- Zhang, Y. *et al.* (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96:6523-6528.
- Zhou, J.M. *et al.* (2000) *NPR1* differentially interacts with members of the *TGA/OBF* family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:191-202.

INTRODUÇÃO

Coffea arabica Linnaeus ($2n=4x=44$), é uma espécie de grande importância econômica para as regiões que a cultivam, especialmente nas Américas, onde seu produto é de qualidade superior e de maior aceitação em todos os mercados consumidores. O Brasil é o maior produtor mundial de café, com produção anual equivalente à soma da produção dos outros seis maiores países produtores. Sendo uma espécie nobre, apresenta diversas variedades e mais de 40 mutantes já descritos. Porém é uma espécie susceptível a doenças e pragas.

Das doenças que ocorrem no cafeeiro, a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) é a mais importante devido aos grandes prejuízos que causa à cultura, podendo comprometer até 50% da produção. Esta doença ocorre em todas as regiões produtoras do café no Brasil. Trata-se de uma doença foliar que inicialmente causa manchas cloróticas observadas na face inferior do limbo foliar. Em poucos dias as manchas crescem e se desenvolvem em massas pulverulentas de coloração amarelo-alaranjado, formadas por uredósporos do patógeno que, quando coalescem, podem cobrir grande extensão do limbo. Atualmente existem mais de 40 raças fisiológicas desta ferrugem, sendo que no Brasil são encontradas oito raças virulentas.

Até poucos anos atrás, esforços visando aumentar a resistência a patógenos, produtividade e qualidade de plantas de café dependiam primordialmente dos métodos clássicos de melhoramento, ou seja, da genética mendeliana. Hoje, a utilização de novas tecnologias é um dos fatores determinantes para o alcance da qualidade, da sustentabilidade e da competitividade do café brasileiro.

A transformação genética de plantas surgiu como uma estratégia para o melhoramento genético clássico, permitindo a introdução de genes de interesse em genótipos-elite. Desta forma, é possível a obtenção de variedades superiores em um menor espaço de tempo. No entanto, a meta em todo processo de obtenção de plantas transgênicas não consiste somente na clonagem e transferência do gene desejado, mas também que o mesmo seja expresso em um modelo temporal, espacial e na magnitude adequada. Desta forma, o estudo de regiões promotoras de genes constitui uma ferramenta chave na regulação da transcrição gênica, e, por conseguinte, na regulação da expressão de transgenes.

O promotor é o processador central da regulação de um gene. Compreende a região 5' não transcrita do gene e contém os sítios de ligação para RNA polimerases e fatores de transcrição. Alguns promotores conferem expressão constitutiva, enquanto outros permitem a expressão órgão/tecido-específica, ou tem sua expressão induzida pelo meio. Os mecanismos que regulam a atividade de promotores que conferem padrões de expressão tecido- ou desenvolvimento-específicos em plantas são geralmente pouco compreendidos. Em parte, isso ocorre em função do número limitado de promotores com tais características a terem sido isolados e caracterizados funcionalmente.

Promotores que garantem a expressão de um transgene em um ambiente particular, numa fase do desenvolvimento ou de maneira específica em um determinado órgão/tecido, são extremamente úteis. Há uma série de vantagens em se restringir a expressão do transgene em determinada célula ou tecido-alvo através do emprego de promotores tecido-específicos. A expressão de uma proteína heteróloga em sementes ou em tubérculos, por exemplo, evita o seu acúmulo em órgãos vegetativos, o que poderia provocar a intoxicação da planta ou a morte de organismos não-alvos. Paralelamente, sistemas baseados em promotores induzidos, que respondam a estímulos externos químicos ou físicos, também podem ser usados para restringir a expressão do gene exógeno numa base temporal.

A caracterização de promotores, sejam ubíquos, tecido-específicos ou induzidos sob determinada condição, é importante não somente para a produção e liberação comercial de plantas geneticamente modificadas, mas também, e principalmente, porque a maioria dos promotores usados até o presente momento é patenteada e, portanto, objeto de assinatura de termos de Transferência de Material Biológico. Isto impede a utilização comercial de tais plantas no país, a menos que sejam pagos *royalties* aos proprietários das patentes. Assim sendo, para que possamos efetivamente utilizar-nos desta tecnologia com nossos genes de interesse, é imperativo que sejam identificados novos promotores, de expressão constitutiva, tecido-específicos, e/ou ativados sob determinadas condições de estresse e derivados da espécie de interesse.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta a identificação e caracterização de promotores de genes de café (*Coffea arabica*). Primeiramente realizou-se a seleção e validação de genes candidatos visando a clonagem de promotores tecido-específicos e ubíquos em café (Capítulo I). Em seguida foram realizadas a amplificação e clonagem das regiões promotoras dos genes de interesse (Capítulo II). Estas atividades foram realizadas no Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, sob orientação do Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia.

Adicionalmente realizou-se a amplificação e clonagem das regiões promotoras de genes de defesa que foram alvo de investigação durante o estágio de co-tutela realizado no *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD, Montpellier, França), sob orientação da Dra. Diana Fernandez (Equipe *Résistance des Plantes aux Bioagresseurs* - RPB). Através desta pesquisa, pretendeu-se dar continuidade aos estudos conduzidos pela Dra. Diana Fernandez, em relação à resistência do café (*Coffea arabica*) a *Hemileia vastatrix*, fungo causador da ferrugem alaranjada do cafeeiro (Capítulo II).

A seguir é apresentada uma revisão da literatura a respeito da cultura do café e sua interação com o fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*, dos mecanismos de regulação da transcrição gênica em eucariontes, e uma síntese dos mecanismos de defesa das plantas.

O Capítulo I apresenta os principais resultados obtidos para a identificação de genes com expressão constitutiva e específica de frutos. Uma parte dos resultados deste capítulo é apresentada sob a forma de um artigo, publicado no periódico *BMC Molecular Biology*.

No Capítulo II é apresentado o trabalho de identificação e caracterização molecular de três diferentes tipos de regiões promotoras, relativas a genes com padrão de expressão constitutivo, fruto-específico e induzidos mediante a presença de agentes patogênicos. Neste capítulo também são apresentadas análises funcionais dos promotores clonados, realizadas através de transformação transitória em plantas de tabaco e tomate. Uma parte destes resultados também é apresentada sob a forma de um artigo, que será submetido a uma revista científica da área.

Os resultados desta pesquisa são importantes para o desenvolvimento de plantas transgênicas, tanto em café quanto em sistemas heterólogos, com genes de interesse agrônômico específicos, capazes de controlar precisamente a atividade do transgene.

REVISÃO DE LITERATURA

1. O gênero *Coffea*

O gênero *Coffea* (tribo Coffeae, família Rubiaceae) é formado por cerca de 100 espécies (Bridson & Verdcourt, 1988; Davis *et al.*, 2006). Apresentando Centro de Origem na África, este gênero é caracterizado por plantas perenes, dicotiledôneas, de porte arbustivo ou arbóreo, de caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas (Fazuoli *et al.*, 2000; Souza & Lorenzi, 2005).

A espécie *Coffea arabica* Linnaeus é originária da Etiópia, Sudão e Quênia, e a espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner oriunda de regiões tropicais e subtropicais da África (Chevalier, 1947; Charrier, 1978; Davis *et al.*, 2006). As demais espécies são provenientes das Ilhas de Madagascar e Mascarenhas (Davis *et al.*, 2006). Dentre essas espécies, apenas *C. arabica* (café arábica) e *C. canephora* (café robusta) são utilizadas comercialmente, enquanto as demais são importantes em programas de melhoramento, por serem fontes de variabilidade genética, principalmente para a tolerância a fatores bióticos e abióticos (Gaspari-Pezzopane, 2007).

Estudos sugerem que *C. arabica* seja um alotetraplóide formado pela hibridação entre *C. eugenioides* ($2n=22$) e *C. canephora* ($2n=22$) (Raina *et al.*, 1998; Lashermes *et al.*, 1999).

De acordo com Charrier & Berthaud (1985), no híbrido resultante teria havido uma duplicação do número de cromossomos, dando origem a um alotetraplóide autofértil ($2n=4x=44$). Assim, o café arábica multiplica-se, predominantemente, por autofecundação, em que a

fecundação cruzada varia a uma taxa média da ordem de 10% (Carvalho & Mônaco, 1962), em razão das condições climáticas e da ação de polinizadores. As demais espécies do gênero *Coffea* são diplóides ($2n=2x=22$) e possuem auto-incompatibilidade do tipo gametofítica (Conagin & Mendes, 1961), tornando-as alógamas, ou seja, reproduzindo-se por fecundação cruzada (Berthaud, 1980; Pinto-Maglio & Cruz, 1998; Fazuoli *et al.*, 1999; Lashermes *et al.*, 1999).

Coffea arabica L. tem grande importância econômica para as regiões que o cultivam, especialmente nas Américas, uma vez que seu produto é apreciado no mundo inteiro e de grande aceitação em todos os mercados consumidores (Anthony *et al.*, 2001). A espécie arábica produz cafés de melhor qualidade, mais finos e requintados, possui aroma intenso e os mais diversos sabores, com inúmeras variações de corpo e acidez (Arlita, 2009). Sendo uma espécie nobre, apresenta várias variedades e mais de 40 mutantes já descritos (Carvalho & Fazuoli, 1993). Seu cultivo encontra excelentes resultados em regiões montanhosas com altitude entre mil e dois mil metros. É adaptado ao clima úmido com temperaturas amenas e seu cultivo é mais adequado em regiões de temperaturas médias entre 18°C e 21°C (Fazuoli, 1986). Em regiões mais quentes e com elevada umidade atmosférica, na ocasião do florescimento, poderá apresentar boa frutificação desde que não haja deficiências hídricas (Moragado, 2008).

O café robusta é mundialmente conhecido devido à sua ampla distribuição nos continentes africano e asiático, pois é capaz de se adaptar às mais variadas condições climáticas (Moragado, 2008). Ele se destaca comercialmente devido ao teor de cafeína e de sólidos solúveis, em suas sementes, superiores ao café arábica, possuindo também maior resistência contra pragas e doenças (Fazuoli *et al.*, 2002; Matiello *et al.*, 2002; Várzea *et al.*, 2002). Apresenta desenvolvimento inicial mais lento que o arábica, porém pode atingir até 10 metros de altura nas regiões quentes e úmidas. É uma planta oriunda de regiões equatoriais baixas, quentes e úmidas, estando adaptado a condições de temperatura bem mais elevadas, com médias anuais entre 22°C e 26°C. Praticamente não sofre problemas de

frutificação em função de temperaturas mais altas. As lavouras são bastante produtivas, apresentando grande variedade quanto ao tamanho, formato e maturação dos frutos (Ormond *et al.*, 1999).

O Brasil possui um dos principais bancos de germoplasma ativos de *Coffea*, localizado no Centro de Café “Alcides Carvalho” do Instituto Agrônomo na cidade de Campinas, possuindo 16 espécies, centenas de híbridos intra e interespecíficos, introduções da Etiópia, mutantes e variedades comerciais, e ainda três espécies do gênero *Psilanthus* (Eira *et al.*, 2007, Gaspari-Pezzopane, 2007).

2. Importância econômica do café no Brasil

O café é hoje a segunda maior *commodities* do planeta, perdendo apenas para o petróleo. Com um mercado gigantesco, movimenta anualmente 91 bilhões de dólares, ficando apenas 9% desse montante com os países produtores. O setor emprega direta ou indiretamente meio bilhão de pessoas em todo o mundo, ou seja, 8% da população mundial, o que justifica sua importância sócio-econômica (Campos, 2005).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de café, com produção anual (safra 2008) da ordem de 45,9 milhões de sacas (30% da produção internacional) (CONAB, 2009). Este volume equivale à soma da produção dos outros seis maiores países produtores. É também o segundo mercado consumidor, atrás somente dos Estados Unidos (Moragado, 2008).

A terceira estimativa de produção total de café (arábica e robusta), para a safra 2009, indica que o País deverá colher entre 39 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, das quais 28,4 milhões são de arábica (72,8%), e 10,6 milhões de robusta (27,2%) (CONAB, 2009).

A área cultivada com café no Brasil é de 2,30 milhões de hectares, dos quais 2,1 milhões estão em produção e 228,2 mil em formação (CONAB, 2009). Os principais Estados produtores são (em escala decrescente): Minas Gerais com 48,6% da produção do País, das quais 98,8% são sacas de arábica, Espírito Santo com 25%, em que 2,4 milhões

são sacas de arábica (terceiro lugar entre os Estados produtores) e 7,3 milhões de sacas de robusta (primeiro lugar entre os Estados produtores), e São Paulo, que produz apenas café arábica, com 8,8% da produção nacional (CONAB, 2009).

Segundo a CONAB, a produção de café em 2010 poderá ser recorde. O Brasil deverá colher entre 45,89 milhões e 48,66 milhões de sacas. Se confirmado o intervalo superior, esta será a maior colheita da história, superando em 0,37% a do ciclo 2002/03, que foi de 48,48 milhões de sacas. A projeção mostra um crescimento entre 16,3% e 23,3% em relação ao total de 39,47 milhões de sacas produzidas em 2009. Segundo os técnicos da CONAB, o principal motivo do incremento é a bienalidade positiva da cultura, com ocorrência de colheita cheia no ano de 2010. O ciclo bienal registra um ano com grande florada dos cafezais, seguido de outro com pequena florada. Este fenômeno se deve ao esgotamento da planta, que precisa de 12 meses para se recuperar e produzir. Outro fator a favor na temporada atual é o regime de chuvas regulares na primavera, coincidindo com a fase de floração nas regiões produtoras, explicam os técnicos (Agência Estado, <http://ultimosegundo.ig.com.br/economia/2010/01/07/conab+producao+de+café+em+2010+pode+ser+recorde+9265660.html>).

A expansão cafeeira no país foi possível graças às condições de solo e clima, bem como à diversificação de materiais genéticos pela seleção de cultivares altamente produtivos e adaptados aos diversos ambientes. O Brasil possui hoje 103 cultivares de *C. arabica* e 10 cultivares de *C. canephora* registrados no Ministério da Agricultura e do Abastecimento, único país no mundo a cultivar as duas espécies em escala comercial (Gaspari-Pezzopane, 2007).

O crescimento da participação brasileira no mercado de café não descarta investimentos em tecnologia e definições de estratégias de produção e comércio. Pelo contrário, o Brasil tem, na base tecnológica e nas estratégias de política econômica, o suporte para se manter no primeiro posto. Nesse contexto, a utilização de novas tecnologias é um dos fatores

determinantes para o alcance da qualidade, da sustentabilidade e da competitividade do café brasileiro.

Até poucos anos atrás, os esforços visando aumentar a produtividade e melhorar a qualidade dependiam primordialmente dos métodos clássicos de cruzamentos, ou seja, da genética mendeliana. No entanto, as estratégias baseadas nos métodos convencionais de melhoramento, embora imprescindíveis, levaram os rendimentos das culturas a uma situação estacionária. Além disso, estes métodos não permitem ultrapassar as barreiras naturais de cruzamentos para a obtenção de variedades com características desejáveis. No caso da cultura do café, são necessários 20 a 30 anos para o melhoramento de variedades e geração de um novo cultivar. Outra desvantagem do cruzamento clássico é o fato de que, além das características desejáveis, os caracteres indesejáveis também são transferidos (Fazuoli *et al.*, 1999).

3. Fenologia do cafeeiro

A fenologia compreende o estudo de eventos periódicos da vida da planta em função da sua reação às condições do ambiente, como por exemplo, manejo cultural, temperatura, precipitação e fertilidade do solo (Gaspari-Pezzopane, 2007).

O ciclo fenológico do cafeeiro apresenta duas fases, as quais ocorrem simultaneamente: vegetativa e reprodutiva. Em razão disso, as plantas de café demoram dois anos para completar o ciclo, o que não ocorre com a maioria das plantas, que florescem e frutificam no mesmo ano fenológico. Esse acontecimento é chamado de bienalidade. De acordo com Camargo & Camargo (2001), o ciclo fenológico do café foi subdividido em seis fases distintas: (1) vegetação e formação das gemas foliares; (2) indução e maturação das gemas florais; (3) florada; (4) granação dos frutos; (5) maturação dos frutos e (6) repouso e senescência dos ramos terciários e quaternários (Figura 1).

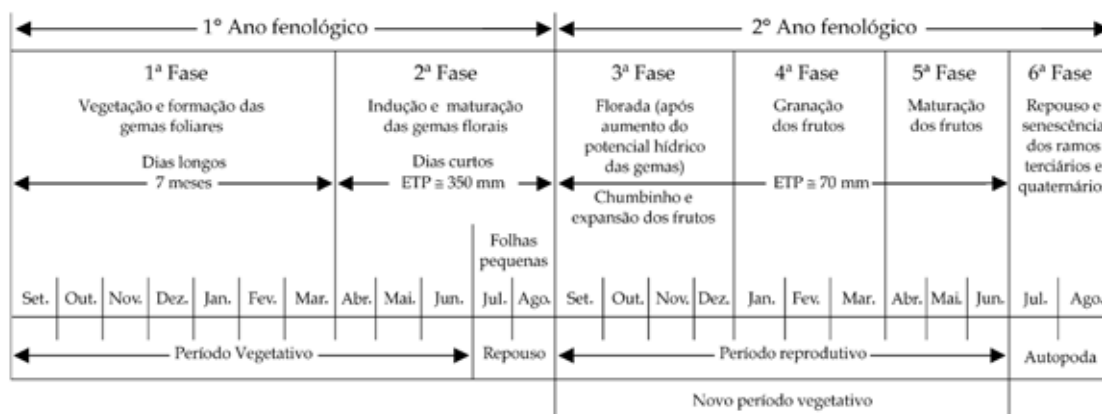


Figura 1 - Esquematisação das seis fases fenológicas do cafeeiro arábica.
Fonte: Camargo & Camargo (2001).

No primeiro ano são formados os ramos vegetativos, com gemas axilares nos nós, que depois são induzidas e se transformam em gemas reprodutivas (Gouveia, 1984). Esse processo é determinado por condições ambientais como a interação entre a redução do fotoperíodo e temperaturas amenas (Camargo, 1985; Rena & Maestri, 1987; Camargo & Camargo, 2001; Camayo-Velez *et al.*, 2003). Após a indução, a gema floral amadurece, entra em dormência e se torna apta à antese, que ocorre, principalmente, após chuva ou irrigação (Rena & Maestri, 1987).

O segundo ano fenológico inicia-se com a florada, seguida pela formação dos frutos que compreende as seguintes fases de crescimento: chumbinhos, expansão e granação, seguida pela fase de maturação. O estresse hídrico durante as fases de crescimento dos frutos afeta a granação e resulta em frutos pequenos (peneira baixa) ou chochos (frutos desprovidos de uma ou das duas sementes). Na maturação dos frutos, a ocorrência de deficiências hídricas moderadas poderá beneficiar a qualidade da bebida (Camargo & Camargo, 2001).

A fase reprodutiva do cafeeiro arábica foi detalhada por Pezzopane *et al.* (2003). Estes autores realizaram uma avaliação fenológica das fases reprodutivas que variam de 0 a 11 como: gema floral dormente (0); gema floral entumescida (1); botão floral abotoada (2); florada ou antese (3); pós-florada com queda de pétalas (4); fruto “chumbinho”, no início do crescimento após a fecundação (5); frutos em expansão (6); grão verde, com formação do endosperma e granação dos frutos (7); grão verde cana, corresponde ao início da maturação devido à mudança de cor (8); fruto cereja completou a maturação (9); fruto passa - início da senescência (10); e fruto seco (11) (Figura 2).

3.1. Desenvolvimento dos frutos de café

O fruto do cafeeiro é uma drupa com duas lojas de fertilização independentes, as quais originam duas sementes. Os frutos maduros são formados pelo exocarpo (casca), responsável pela expressão da coloração do fruto do café durante o desenvolvimento; mesocarpo (polpa ou mucilagem), rico em açúcar e água (durante a maturação o açúcar diminui, provavelmente devido a modificações da pectina); endocarpo (pergaminho), tecido duro e lignificado; película prateada (testa ou resto de tegumento) e o endosperma (tecido triplóide que contém as reservas para consumo do embrião). O embrião encontra-se inserido no endosperma. (Antunes Filho & Carvalho, 1954; Coste, 1959; De Castro & Marraccini, 2006, Geromel *et al.*, 2006). Juntos, o exocarpo, mesocarpo e endocarpo constituem o pericarpo.

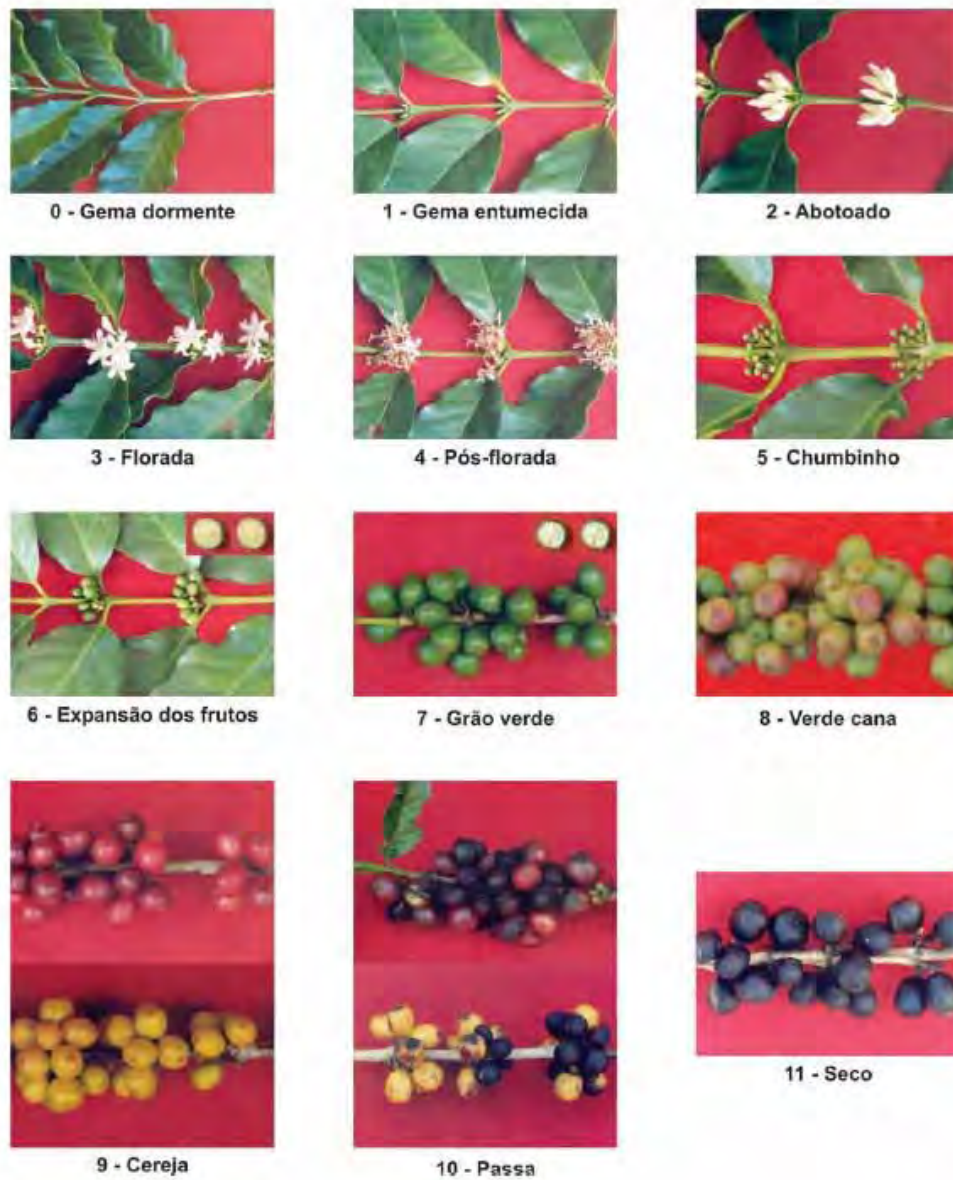


Figura 2 - Escala de notas para o desenvolvimento fenológico do cafeeiro.
 Fonte: Pezzopane *et al.* (2003).

O desenvolvimento dos frutos de café é um processo longo, que pode variar de 6 a 8 meses para as cultivares de *C. arabica* e 9 a 11 meses para as cultivares *C. canephora*. Após a fecundação ocorre a fase maternal, caracterizada pela divisão e alongação das células (perisperma) e pelo início da divisão das células do endosperma. Essas fases correspondem aos frutos chumbinho e em expansão. Na seqüência há a alongação das células e o desenvolvimento do endosperma. Nessa fase, chamada de grão verde, o perisperma desaparece gradualmente, substituído pelo endosperma. Finalmente, ocorre a fase de maturação do pericarpo (fases verde-cana e cereja), em que se verifica o endurecimento do endosperma e a alteração da cor do pericarpo, pelo acúmulo gradual de proteínas de reserva, sacarose e polissacarídeos complexos, que constituem as principais reservas da semente, além da degradação da clorofila e produção de pigmentos (Figura 3) (Pezzopane *et al.*, 2003; De Castro & Marraccini, 2006; Gaspari-Pezzopane, 2007).

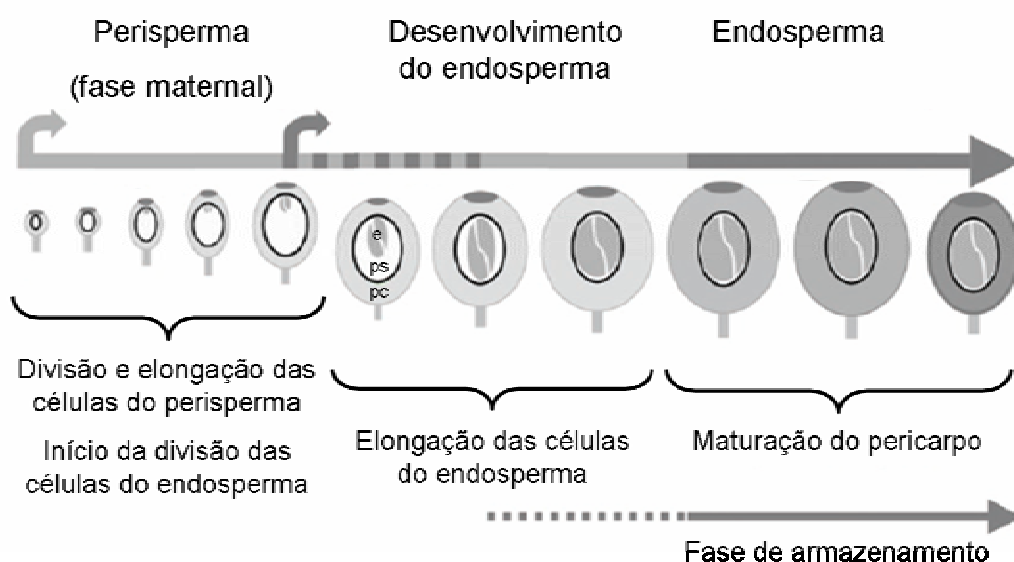


Figura 3 - Fases do desenvolvimento e maturação do fruto do cafeeiro. e: endosperma; ps: perisperma; pc: pericarpo. Fonte: adaptado de De Castro & Marraccini (2006).

Em relação à fisiologia da maturação dos frutos de cafeeiro, Pereira *et al.* (2005) observaram que nos frutos verde-cana há um rápido crescimento na produção de etileno, que decresce nos frutos cereja, o que indica serem frutos climatéricos. Frutos climatéricos são aqueles nos quais a maturação é acompanhada por um aumento na respiração e na produção de etileno (Marín-López *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2005).

As modificações bioquímicas que levam à maturação de frutos climatéricos incluem o aumento na atividade de enzimas responsáveis pela biossíntese de etileno, assim como a degradação da parede celular, o acúmulo de pigmentos, a formação de aroma e de metabólitos secundários (Clifford, 1985; Castro *et al.*, 2005). O conhecimento sobre a expressão dos genes envolvidos nesse processo é essencial como subsídio aos estudos de melhoramento de características agrônomicas importantes, tais como uniformidade de maturação e duração do ciclo fenológico (Gaspari-Pezzopane, 2007).

Recentemente, Salmona *et al.* (2008) e Joët *et al.* (2009) realizaram um estudo transcricional em larga escala sobre os genes relacionados com o desenvolvimento de sementes de *C. arabica*. Nestes trabalhos foram identificados 58 e 79 genes não redundantes, respectivamente. Juntamente com os dados Geromel *et al.*, 2006; Lepelley *et al.*, 2007 e Privat *et al.*, 2008, hoje temos o conhecimento das vias metabólicas envolvidas na biossíntese dos principais compostos de armazenamento de sementes de dicotiledôneas, ou seja, enzimas relacionadas à produção de polissacarídeos da parede celular, triacilgliceróis, sacarose e ácidos clorogênicos, utilizando-se *C. arabica* como planta modelo.

4. Ferrugem do cafeeiro

Dentre as doenças que ocorrem no cafeeiro, a ferrugem é uma das mais importantes, podendo causar prejuízos de 35 a 50% (Zambolim *et al.*, 2002). A ferrugem alaranjada, descrita pela primeira vez no Ceilão (atual Sri Lanka) em 1868 por Berkeley e Broome, tem como agente causal o fungo *Hemileia vastatrix* (Berk & Br). Esta doença tem sido o principal problema da cultura do café em todas as regiões do mundo onde é cultivado. No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez na Bahia em 1970, espalhando-se rapidamente para a América Central em 1976 e para a Colômbia em 1983 (Carvalho *et al.*, 1989).

4.1. Taxonomia e ciclo de vida de *H. vastatrix*

Hemileia vastatrix é um fungo biotrófico pertence à ordem Pucciniales, família Pucciniaceae, classe Basidiomycetes.

Este fungo apresenta ciclo de vida incompleto, pois são conhecidos apenas os estádios de urédia, télia e basídia (Kushalappa & Eskes, 1989), mas não os de pécnio e écio (Rajendren, 1967), quer em condições naturais ou controladas (Gopalkrishnan, 1951). Normalmente, há produção de urediniósporos em grande quantidade e, ocasionalmente, formam-se teliósporos e basidiósporos. Os urediniósporos desempenham papel fundamental no ciclo de vida do fungo, já que são responsáveis pela dispersão e pelo início da infecção em *Coffea* spp. Os urediniósporos são dicarióticos (n+n) (Ono, 2002). Em condições normais, os uredósporos permanecem unidos por uma mucilagem e, em contato com a água, libertam-se com facilidade. Para formação de teliósporos, exigem-se condições de umidade e temperaturas baixas (Holguin-Melendez, 1993; Coutinho *et al.*, 1995). Eventualmente, os teliósporos podem ser formados em lesões velhas (Bocóli, 2008). Os teliósporos, ao germinarem, formam o pró-micélio (basídeo) e basidiósporos, porém, é ainda desconhecida a função destes (Ward, 1882; Rayner, 1972).

A fonte de inóculo é constituída pelas lesões em folhas infectadas onde são produzidos os uredósporos. Cada pústula produz ao redor de 150.000 uredósporos que podem sobreviver sob condições secas por um período de seis semanas. O período de produção de uredósporos em uma mesma lesão pode ser superior a três meses. Assim, uma lesão produzida numa estação vegetativa pode servir de fonte de inóculo para o início da estação vegetativa seguinte. A disseminação ocorre pela ação do vento, pelas gotas de chuva, pelo homem durante a execução de tratamentos culturais, por insetos e animais que entram em contato com plantas infectadas (Moraes, 1983). Depois de disseminados, os uredósporos que caem na face inferior das folhas germinam em um período de 6 a 8 horas em condições de alta umidade e temperatura entre 21 °C a 25 °C (Martins, 1998). Os sintomas iniciais surgem entre 7 a 15 dias após a penetração, variando em função da temperatura, suscetibilidade da planta e idade do órgão afetado.

O fungo se desenvolve na superfície abaxial do limbo foliar a partir da germinação dos uredósporos, podendo emitir de um a três tubos germinativos. Na extremidade do tubo germinativo ocorre a formação de apressório usualmente sobre um estômato, dando origem, em seguida, ao peg de penetração (hifa de penetração), o qual, após atravessar o ostíolo do estômato, diferencia-se em vesícula subestomática (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975; Rijo & Rodrigues Jr., 1977; Coutinho *et al.*, 1993; Martins & Moraes, 1996; Silva *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002). O desenvolvimento subsequente de hifa de infecção na câmara subestomática leva à colonização das células subsidiárias e do mesófilo, com a formação do micélio intercelular e em seguida, dos haustórios, estruturas responsáveis pela absorção de nutrientes pelo patógeno, dentro das células do hospedeiro (Martins, 1998; Zambolim *et al.*, 2002). Em cafeeiros suscetíveis, a colonização do mesófilo pela formação de numerosas hifas intercelulares e haustórios dá origem aos soros uredospóricos, que saem em buquê através do estômato (Rijo & Rodrigues Jr., 1977) (Figura 4).

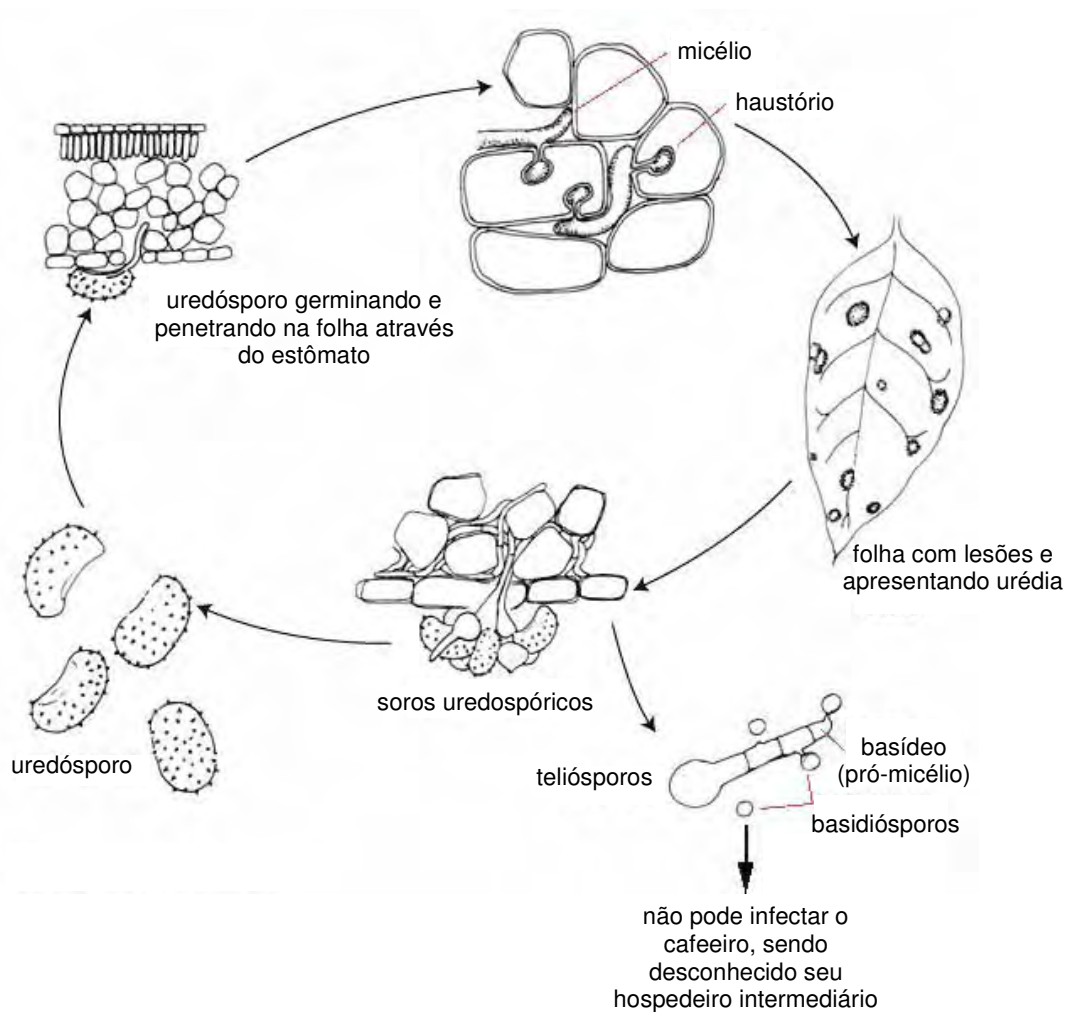


Figura 4 - Esquema simplificado do ciclo de vida de *H. vastatrix* no cafeeiro. Fonte: adaptado de Arneson (2000).

4.2. Sintomas da doença

A doença é reconhecida inicialmente por manchas cloróticas translúcidas com 1-3 mm de diâmetro, observadas na face abaxial do limbo foliar. Em poucos dias, essas manchas crescem, atingindo 1-2 cm de diâmetro. Na face abaxial, desenvolvem-se massas pulverulentas de coloração alaranjada formadas por uredósporos do patógeno (Figura 5). Ocasionalmente, o fungo pode atacar a extremidade do ramo em desenvolvimento e frutos verdes (Godoy *et al.*, 1997). Na plantação, o

sintoma mais evidente é a desfolha das plantas. A desfolha ocorrida antes do florescimento interfere no desenvolvimento dos botões florais e na frutificação. A perda das folhas durante o desenvolvimento dos frutos leva à formação de grãos anormais e frutos com lojas vazias, afetando sensivelmente a produção (Matiello *et al.*, 2002; Brandalise, 2007). A seca progressiva dos ramos reduz a vida útil da lavoura, tornando-a antieconômica (Zambolim *et al.*, 1997).



Figura 5 - Sintoma característico de folhas de *Coffea arabica* infectadas com a ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). Fonte: *Institut de Recherche pour le Développement*.

5. Genética da resistência do cafeeiro à ferrugem

A resistência de cafeeiros à ferrugem é condicionada por fatores dominantes, aparentemente independentes, e os genótipos são classificados em grupos de resistência de acordo com sua interação com raças fisiológicas do patógeno (Van Der Vossen, 2001). Até o momento foram identificados nove genes de resistência em plantas de café de diferentes espécies (Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Rodrigues Jr. *et al.*, 1975; Bettencourt & Rodrigues

Jr., 1988). Estes genes receberam a sigla SH, que representa suscetibilidade a *Hemileia* e são designados por SH₁, SH₂, SH₃, SH₄, SH₅, SH₆, SH₇, SH₈ e SH₉. Esses genes de resistência foram encontrados, principalmente, em *C. arabica* (SH₁, SH₂, SH₄, SH₅), *C. canephora* (SH₆, SH₇, SH₈, SH₉) e *C. liberica* (SH₃). Os genes SH₆, SH₇, SH₈ e SH₉ também foram encontrados em derivados do Híbrido de Timor. Dois fatores de resistência monogênicos, que parecem diferir de SH₁ a SH₉, foram detectados no Brasil, um em *C. canephora* cultivar Kouilou, e o outro em Icatu (Kushalappa & Eskes, 1989). Além desses, foram detectados pelo menos mais dois genes de resistência ainda não caracterizados, que, isoladamente ou associados aos genes SH₁-SH₉, condicionam resistência a mais de 40 raças fisiológicas de ferrugem (Várzea & Marques, 2005).

O conhecimento da maneira pela qual os genes SH são herdados é de extrema importância para os programas de melhoramento que buscam resistência duradoura a *H. vastatrix*, um fungo que apresenta elevada variabilidade genética. Os genes SH₁, SH₂, SH₄ e SH₅, encontrados em *C. arabica*, já foram suplantados por diversas raças de *H. vastatrix* (Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971), inclusive as identificadas no Brasil (Cardoso, 1986). De acordo com Kushalappa & Eskes (1989) o gene SH₄ confere resistência completa somente em homozigose e em condições de pouca luz.

Inúmeras seleções de *C. arabica* com resistência a *H. vastatrix* foram efetuadas, principalmente em material provindo da Etiópia e Sudão, em várias épocas, originando muitas progênies com os fatores genéticos de resistência SH₁, SH₂, SH₄ e SH₅. Por outro lado, a seleção de cafeeiros do tipo arábica com o fator SH₃ foi obtida em germoplasma derivado do cruzamento de *C. arabica* com *C. liberica*, evidenciando a origem do fator genético SH₃ de *C. liberica* (Eskes, 1989).

A resistência de cafeeiros à ferrugem nas espécies diplóides tem sido detectada com maior frequência, principalmente, em *C. canephora*, *C. congensis*, *C. dewevrei* e *C. liberica*. Esta resistência é conhecida há muito tempo, pois em muitos locais onde *H. vastatrix* teve um efeito drástico,

as plantações de *C. arabica* foram substituídas por seleções de *C. canephora* e *C. liberica*. De todas as espécies utilizadas, *C. canephora* foi a mais importante e a responsável pela restauração da cafeicultura em Java e em muitos outros países (Fazuoli *et al.*, 2007). O aproveitamento das fontes de resistência das espécies diplóides nos programas de melhoramento visando resistência a *H. vastatrix* ficou relativamente mais fácil com a possibilidade de duplicação do número de cromossomos dessas espécies. Através desta metodologia, espécies diplóides resistentes duplicadas podem cruzar diretamente com a espécie tetraplóide *C. arabica* (Fazuoli *et al.*, 2007). Uma segunda alternativa é o cruzamento entre as espécies diplóides com *C. arabica*. Desse procedimento irão resultar, inicialmente, cafeeiros triplóides que poderão ser posteriormente utilizados em retrocruzamentos para o genitor tetraplóide, restaurando a fertilidade dos híbridos obtidos (Fazuoli *et al.*, 2007).

A produção de variedades resistentes foi alcançada por meio de hibridação interespecífica (*C. canephora* x *C. arabica*), tendo como exemplo o cultivar Icatu, que apresenta boas características de resistência à ferrugem e vigor elevado (Godoy *et al.*, 1997). O cultivar Icatu Vermelho é derivado do cruzamento entre as espécies *C. arabica* cultivar Bourbon Vermelho e *C. canephora* cultivar Robusta, com dois retrocruzamentos com *C. arabica* cultivar Mundo Novo (Fazuoli, 1991). Cultivares como o Catucaí, resultante do cruzamento natural entre Catuaí e Icatu, e o Catimor resultante do cruzamento entre o Caturra Vermelho e o Híbrido de Timor, têm apresentado também boa resistência à ferrugem (Godoy *et al.*, 1997). A maioria dos cultivares de *C. arabica* é aparentada e caracterizada por uma baixa diversidade genética em função do reduzido número de plantas que deu origem ao cultivo no Brasil, e aos métodos de melhoramento empregados, especialmente o genealógico. Assim, a transferência de genes de resistência de espécies diplóides para *C. arabica* (tetraplóide) tem sido uma constante nos programas de melhoramento (Anthony *et al.*, 2002).

6. Interação *Coffea arabica* – *Hemileia vastatrix*

As diferentes etapas do processo infeccioso e as respostas de resistência do cafeeiro a *H. vastatrix*, tanto em interações compatíveis quanto em incompatíveis, foram investigadas em nível celular, bioquímico e molecular através de uma colaboração entre o *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD, Montpellier, França), e o Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC, Oeiras, Portugal) (Silva *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2004; Ganesh *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006).

Não existe nenhuma prova da existência de defesas pré-existentes (barreiras físicas) no cafeeiro que poderia limitar o crescimento de *H. vastatrix* (Kushalappa & Eskes, 1989; Rodrigues Jr. *et al.*, 2000). Os uredósporos de *H. vastatrix* germinam e diferenciam-se em apressório nos estômatos tanto em plantas de café susceptíveis quanto em resistentes ao patógeno (Silva, 1996; Silva *et al.*, 2002). Para a maior parte dos genótipos de cafeeiro examinados (espécies de *Coffea*), a resistência observada é do tipo pós-haustorial. Isto se deve ao fato do fungo cessar seu crescimento em diferentes etapas da infecção, e mais frequentemente, após a formação do primeiro haustório.

Martins & Moraes (1996) e Martins (1998), através de estudos histológicos, observaram o desenvolvimento da raça II de *H. vastatrix* após a inoculação em *C. arabica* cultivar Mundo Novo, com ou sem resistência induzida pela aplicação prévia de extrato de fermento, e no híbrido Sarchimor que apresenta resistência a todas as raças do patógeno. Os autores observaram que o fungo se desenvolveu de forma semelhante nas três interações estudadas, até a diferenciação de apressório em vesícula subestomática, que ocorreu entre 24 e 36 horas após a inoculação. A expressão da incompatibilidade entre cafeeiro e ferrugem foi detectada em Sarchimor e em Mundo Novo com resistência induzida, entre 48 e 72 horas após a inoculação do fungo, quando a inibição do desenvolvimento do patógeno pôde ser notada. Nesse estágio, foi detectada a formação dos primeiros haustórios, que apresentaram crescimento reduzido em Sarchimor.

Após 96 horas, a maioria dos haustórios na interação incompatível apresentou-se encapsulada em um espessamento, que se desenvolve a partir da parede celular do hospedeiro. Foi verificado, também, que a expressão da resistência induzida no cafeeiro suscetível pelo tratamento com extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), 3 dias antes da inoculação do patógeno, ocorre 72 horas após a inoculação de *H. vastatrix*. Nas plantas induzidas, 80% das colônias do fungo não puderam mais ser visualizadas 72 horas após a inoculação. Foi aventada a hipótese de que o desaparecimento das colônias do fungo nas plantas induzidas, 6 dias após o tratamento com o indutor de resistência, poderia estar relacionado com a degradação das estruturas de infecção de *H. vastatrix* por enzimas sintetizadas pelo hospedeiro (Martins, 1998). Estudos imunocitoquímicos revelaram que as paredes das hifas intercelulares de *H. vastatrix*, bem como das células-mãe de haustório e dos haustórios, contêm β -1,3-glucanas e resíduos de N-acetilglucosamina, monômeros formadores do polímero quitina (Silva *et al.*, 1999; Guerra-Guimarães *et al.*, 2001). Esses polissacarídeos do patógeno poderiam ter sido degradados por enzimas hidrolíticas, como β -1,3-glucanases e quitinases, durante a resposta de resistência induzida em cafeeiro.

Na interação incompatível (ou resistência específica) ocorre uma reação de hipersensibilidade (HR, *Hypersensitive Responses*) no cafeeiro, a qual está associada à morte das células da planta no local da infecção (Silva *et al.*, 2002). A HR pode ser observada em cafeeiro a partir de 2 dias após inoculação com *H. vastatrix*, apenas nas células guarda, ou nas células guarda e subsidiárias, nos pontos de infecção onde o fungo desenvolveu o apressório e a hifa de penetração (Silva, 1996; Silva *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002). A morte das células subsidiárias e do mesófilo é observada quando elas são invadidas por um haustório, a partir do terceiro dia após inoculação (Silva, 1996; Silva *et al.*, 2002). Ao curso da infecção, pode-se observar a morte de células não invadidas da epiderme e mesófilo adjacentes (Martins *et al.*, 1985; Rijo *et al.*, 1991). A morte de células não infectadas também foi reportada em plantas resistentes a outros patógenos

(Huang *et al.*, 1998; Koga *et al.*, 1990; Heath, 2000b). Segundo Silva *et al.* (dados não publicados), células de cafeeiro que sofreram HR apresentam rupturas na membrana plasmática bem como na membrana de diferentes organelas (cloroplastos, núcleo e mitocôndrias).

Foi observado na interação incompatível entre o cafeeiro da variedade S4 Agaro com a raça II de *H. vastatrix* que a HR foi iniciada após a diferenciação do haustório (Silva *et al.*, 2002). Entretanto, na interação incompatível da variedade Caturra com a raça VI, o crescimento de *H. vastatrix* foi interrompido imediatamente após a penetração do fungo na cavidade subestomática, sem a formação do haustório (Guerra-Guimarães, 2004; Ganesh *et al.*, 2006) (Figura 6). Este fenótipo de resistência pré-haustorial é observado nas interações entre a ferrugem com plantas não-hospedeiras (Heath, 1997). Este tipo de resistência é interessante já que o desenvolvimento do patógeno é interrompido antes da diferenciação das estruturas de infecção. Assim, os mecanismos de resistência do cafeeiro contra a ferrugem podem ser diferentes de acordo com os genes de resistência considerados (Ramiro, 2009).

Diversas modificações celulares específicas, como a produção de calose e de β -1,4-glucanas que encapsulam os haustórios, estão associadas à morte celular causada pela HR em cafeeiro (Silva *et al.*, 2002). Do ponto de vista bioquímico, dois picos de expressão da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) foram detectados, 2 e 5 dias após inoculação. O primeiro é correlacionado com a acumulação de compostos fenólicos ligados à morte celular, enquanto que o segundo coincide com uma produção tardia de compostos fenólicos e de lignificação das paredes das células vegetais (Silva *et al.*, 2002). Além disso, atividades enzimáticas do tipo peroxidase, quitinase, β -1,3-glucanase e lipoxigenase foram destacadas em certas interações incompatíveis (Maxemiuc-Naccache *et al.*, 1992; Rojas *et al.*, 1993; Guzzo & Martins, 1996; Silva *et al.*, 2002; Guzzo & Harakava, 2002; Guerra-Guimarães *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008).

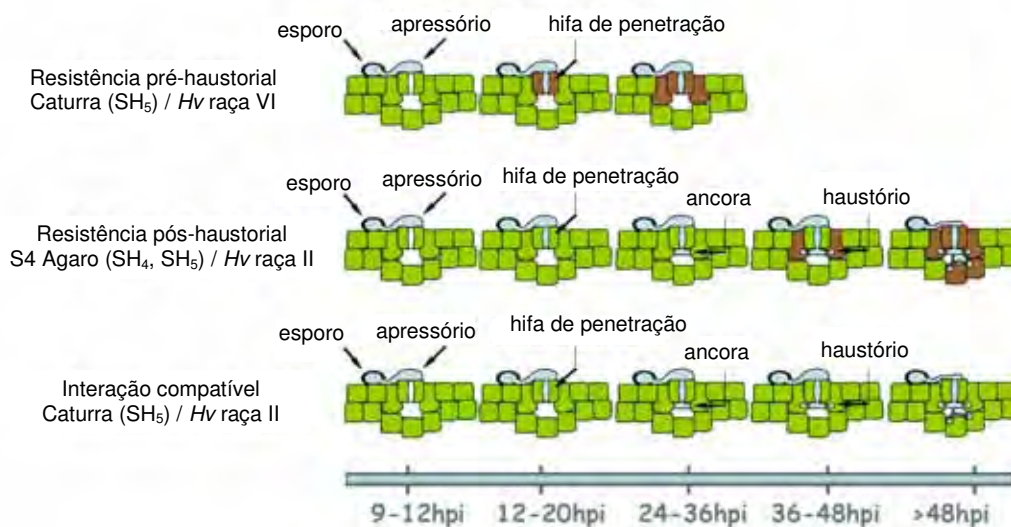


Figura 6 - Desenvolvimento de *H. vastatrix* em folhas do cafeeiro. Em marrom: células vegetais no processo de HR. A linha de tempo está representada em horas pós-inoculação (hpi). Esquema realizado a partir dos dados de Silva *et al.* (1999), Silva *et al.* (2002) e Guerra-Guimarães (2004). Fonte: adaptado de Ramiro (2009).

Foi observado por Mendgen & Voegelé (2005) que o desenvolvimento das estruturas de infecção (após a aderência de uredósporos de *H. vastatrix* sobre a superfície da folha de cafeeiro) resulta de um sistema de reconhecimento sofisticado da superfície do hospedeiro. A extremidade do tubo germinativo dicariótico pode reconhecer certas características topográficas da cutícula da planta, aumentando assim a probabilidade de encontrar uma abertura estomática. Características específicas, como a dimensão dos lábios externos das células guarda, parecem servir de sinais indutores (Collins *et al.*, 2001; Wiethölter *et al.*, 2003). Para controlar o desenvolvimento de estruturas de infecção na folha, uma seqüência sucessiva de sinais específicos parece igualmente necessária (Heath, 1997, Mendgen & Voegelé, 2005).

A fim de compreender quais sinais e vias de sinalização estão implicados na diferenciação nas estruturas de infecção de *H. vastatrix*, a germinação do parasita sob diferentes membranas artificiais foi estudada (Azinheira, 2005). Com membranas de colóide (*collodium*), as porcentagens de germinação de uredósporos e de formação de apressório foram próximas dos valores obtidos em folhas de cafeeiro, evidenciando o papel dos sinais topográficos na indução de estruturas de pré-penetração. No entanto, somente uma taxa muito baixa de estruturas de infecção se desenvolveu (1-2%), e na maioria dos casos, sem septo para diferenciar a hifa de penetração do apressório (Azinheira *et al.*, 2001; Azinheira, 2005). Assim, um segundo estímulo é aparentemente necessário para dar continuidade à diferenciação de *H. vastatrix*, porém a natureza deste sinal é desconhecida (Azinheira, 2005).

Ramiro *et al.* (2009) avaliaram se as respostas de defesa do cafeeiro (*C. arabica*) estavam correlacionadas a um estágio específico do desenvolvimento do fungo *H. vastatrix*. Observações histológicas em cultivares compatíveis (Catuaí) e incompatíveis (Tupi) de café mostraram que após a germinação dos esporos, o fungo produz haustórios em células adjacentes e subsidiárias do estômato. Em seguida ocorre o desenvolvimento de haustórios secundários em células do mesófilo. Na interação incompatível entre a raça II e o cv. Tupi foi observada uma forte e transiente formação de H₂O₂ no local da infecção 39 horas após a inoculação (hpi), durante a formação dos haustórios secundários. Neste período também foi observada uma expressão diferencial dos genes relacionados com a defesa do vegetal nas interações compatíveis e incompatíveis. Por exemplo, os genes relacionados à patogênese *CaPR1b* e *CaPR10* apresentaram níveis máximos de expressão em 39 hpi na interação incompatível, enquanto que na interação compatível, neste mesmo período, não houve alteração nos níveis de expressão destes genes. Em contrapartida, o gene *CaWRKY1* (um fator de transcrição do tipo WRKY) e o gene de *CaRLK* (um *receptor-like kinase*) foram induzidos somente no cultivar suscetível. Estes resultados sugerem que a resistência específica do

cv. Tupi foi ativada após a formação dos haustórios secundários de *H. vastatrix*. Segundo os autores, nenhuma evidência de reconhecimento específico foi observada no cafeeiro em resposta à formação dos haustórios logo após a germinação dos esporos, sugerindo que os haustórios não são reconhecidos, ou seus componentes não são secretados em células adjacentes e subsidiárias do estômato. Adicionalmente, esse estudo fornece novas introspecções sobre o mecanismo de colonização do fungo causador da ferrugem do cafeeiro.

7. Regulação da transcrição gênica em eucariontes

7.1. As células regulam a expressão dos seus genes

Antes da síntese de uma determinada proteína ser iniciada, a molécula de mRNA (RNA mensageiro) correspondente deve ser produzida pela transcrição do DNA. Este processo é realizado por um complexo enzimático cuja enzima chave é a RNA polimerase, composta de várias subunidades e que realiza a polimerização do RNA a partir de um molde de DNA (Alberts *et al.*, 2002). Em eucariontes, a regulação da expressão gênica ocorre em diferentes etapas de eventos nucleares e citoplasmáticos (Figura 7) (Maniatis *et al.*, 1987).

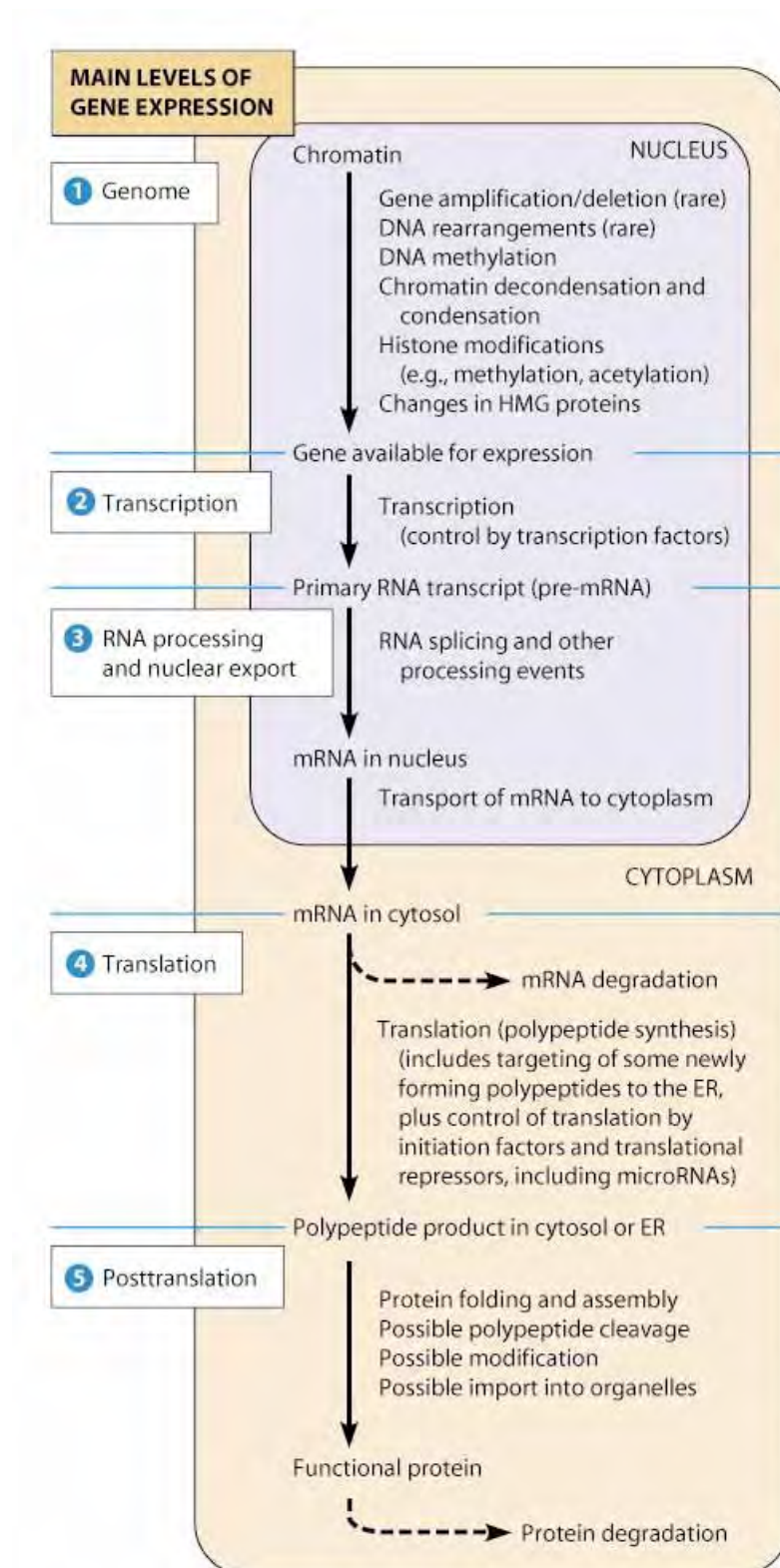


Figura 7 - Mecanismos de regulação da expressão gênica em eucariontes.
 Fonte: Becker *et al.* (2008).

7.2. A regulação da transcrição em células procarióticas e eucarióticas

A transcrição em eucariontes é bem mais complexa do que em procariontes. Nos eucariontes a transcrição ocorre no núcleo, enquanto a tradução ocorre no citoplasma. Já nos procariontes tal separação celular não existe, sendo os dois processos muito bem acoplados no espaço. Nos eucariontes, a separação temporal e espacial desses dois processos permite uma melhor regulação da expressão gênica. Outra diferença é que o transcrito primário de mRNA dos eucariontes, ao contrário dos procariontes, é amplamente processado. O RNA nascente sofre uma série de alterações: aquisição de revestimento (*cap*) na sua extremidade 5', cauda poli-A na extremidade 3' e remoção de introns (*splicing*) para a formação de mRNAs maduros com mensagens contínuas. Alguns mRNAs maduros chegam a ser até dez vezes menores em tamanho que seus precursores (Santos & De Castro, 2000).

A enzima responsável pela transcrição é a RNA polimerase, que nos procariontes é única, enquanto nos eucariotes elas são três (RNA polimerase I, II e III) (Alberts *et al.*, 2002). Em adição a estas polimerases, as plantas apresentam duas outras RNA polimerases nucleares (IV e V), que desempenham papéis não redundantes implicados na metilação do DNA através de pequenos RNAs e no silenciamento gênico (Herr *et al.*, 2005; Pikaard *et al.*, 2008; Wierzbicki *et al.*, 2008; Ream *et al.*, 2009).

Para iniciar a transcrição, a RNA polimerase deve reconhecer um local específico onde começará a síntese do RNA. Esse local chama-se promotor. Em procariontes, o reconhecimento da região promotora pela RNA polimerase se dá graças ao fator sigma (Lewin, 2001), que se liga à enzima fazendo com que esta tenha maior afinidade pelas regiões -10 e -35 do promotor. Por outro lado, as polimerases eucarióticas requerem a associação prévia dos fatores gerais de transcrição à região promotora (Alberts *et al.*, 2002).

7.3. Região de controle gênico em eucariotos

Combinações de elementos com seqüências curtas atuam como sinais de reconhecimento para que os fatores de transcrição possam ligar-se ao DNA, guiando e ativando a RNA polimerase. Freqüentemente um conjunto desses elementos fica agrupado a montante da seqüência a ser transcrita, constituindo, coletivamente, o promotor. Depois que vários fatores comuns de transcrição se ligam à região promotora, uma RNA polimerase liga-se a esse complexo de iniciação e é ativada para iniciar a síntese de RNA a partir de um único ponto (Schrem *et al.*, 2002; Levine & Tijan, 2003).

Assim, em eucariotos, a região promotora de um gene possui componentes fundamentais para o controle da transcrição: suas seqüências de DNA regulatórias, chamadas elementos *cis*-regulatórios, e as proteínas regulatórias, chamadas elementos *trans*-regulatórios (Maniatis *et al.*, 1987; Ptashne, 1988; Armelin-Correa, 2007).

7.3.1. Elementos *cis*-regulatórios

Os elementos *cis*-regulatórios estão distribuídos ao longo do DNA em basicamente três regiões: região promotora mínima, regiões ativadoras (*enhancers*) ou inibidoras (silenciadores) da transcrição, e insuladores (Figura 8) (Levine & Tijan, 2003). Nesse trabalho tratar-se-á como seqüência promotora, ou promotor, os elementos *cis*-regulatórios presentes junto ao promotor mínimo e ao longo da seqüência de DNA localizada acima do mesmo em relação ao ponto de início da tradução (ATG).

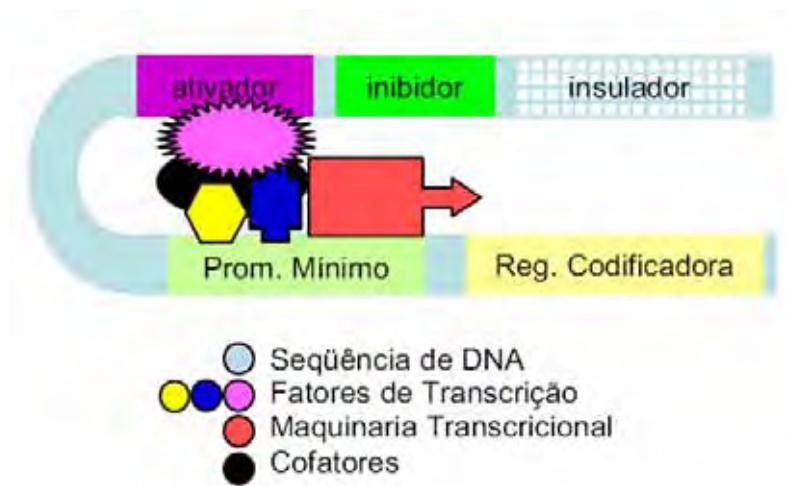


Figura 8 - Esquema dos elementos que atuam na regulação da transcrição de um gene eucariótico. Fonte: Armelin-Correa (2007).

A região promotora mínima (*core promoter*) geralmente encontra-se a montante (*upstream*) e a poucas bases do início da transcrição (ponto +1) (Butler & Kadonaga, 2002). Ela é a seqüência de DNA na qual a maquinaria transcricional, composta pela RNA polimerase e suas proteínas acessórias, vai se ligar para iniciar a síntese do transcrito primário (Smale & Kadonaga, 2003; Levine & Tijan, 2003). Os primeiros promotores mínimos estudados mostraram a existência de uma seqüência TATAA padrão, também chamada TATA-box, onde se liga a *TATA-binding protein* (TBP), que faz parte do complexo protéico que define o início da transcrição (+1) na maioria dos genes transcritos pela RNA polimerase II (Smale & Kadonaga, 2003). Uma mutação no elemento TATA não impede o início da transcrição, mas desloca o ponto +1 de sua posição normal. Em geral, o TATA-box apresenta-se a cerca de -30 pares de bases (pb) do ponto +1, e elementos promotores proximais estão localizados entre -100 (CCAAT-box) e -200 pb (GC-box) deste ponto (Stephen & James, 2003). Posteriormente verificou-se a existência de pelo menos duas outras seqüências que também permitem a ancoragem do complexo iniciador: o *initiator element* (INR) e o *downstream promoter element* (DPE) (Levine & Tijan, 2003).

As regiões ativadoras (*enhancers*) de um gene, por outro lado, podem se localizar próximas ou distantes, a mais de 100 kb, assim como, a montante, a jusante ou em introns do gene regulado. Estes elementos de seqüências curtas intensificam a atividade de transcrição por representarem um sítio de ligação para proteínas de regulação de determinados genes eucarióticos. Na sua ausência a transcrição ocorre em níveis muito mais baixos. Os silenciadores, ou regiões inibidoras, são elementos reguladores equivalentes aos *enhancers*, contudo, inibem a atividade de transcrição de genes específicos (Figura 9) (Armelin-Correa, 2007).

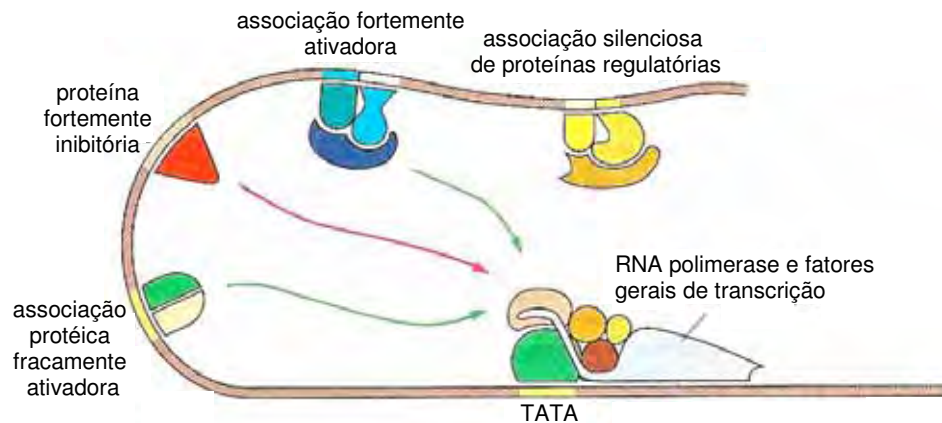


Figura 9 - Integração de diferentes elementos (*cis e trans*) na região promotora proximal e distal de um gene eucarioto. Fonte: adaptado de Alberts *et al.* (2002).

Existem também os insuladores que se localizam em posições mais distantes que as posições ocupadas pelos *enhancers*. A função dos insuladores é proteger a região promotora de determinado gene contra a ação de regiões regulatórias de outros genes (Levine & Tijan, 2003). Ou seja, estes elementos bloqueiam a ação de *enhancers* para que o estímulo não chegue ao gene vizinho (Figura 10).

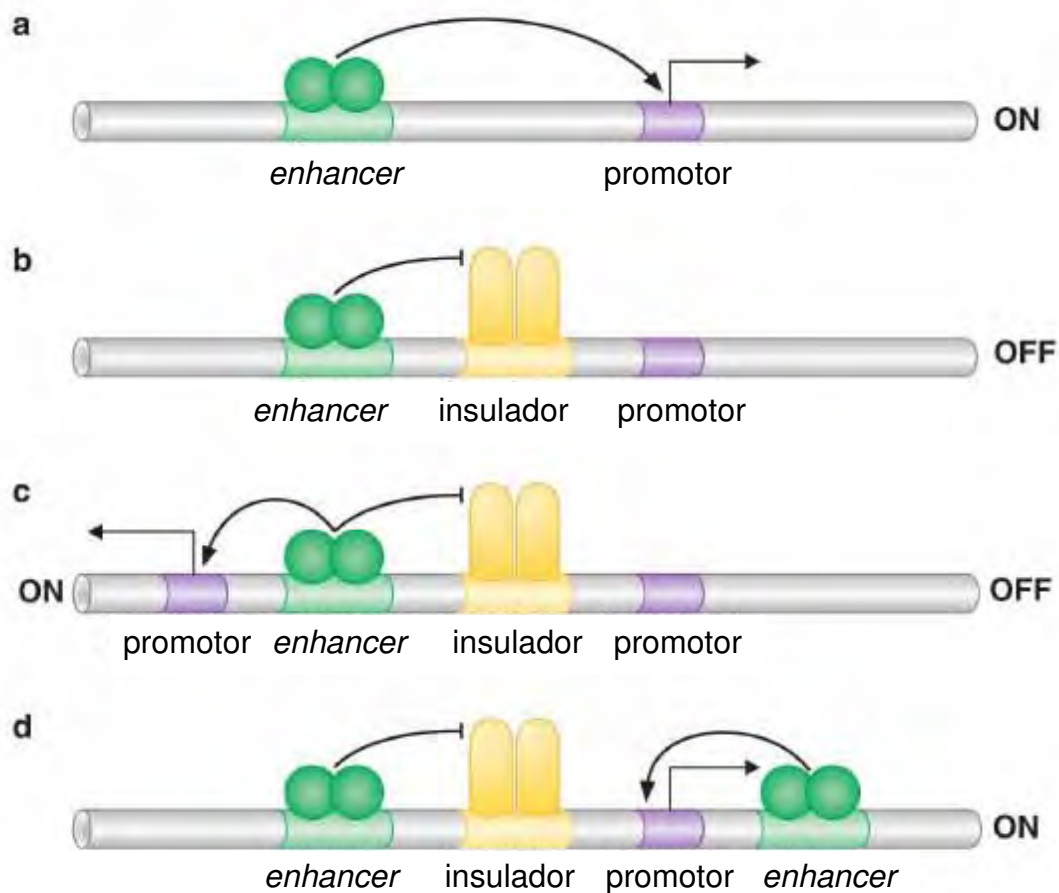


Figura 10 - Insuladores bloqueiam a ativação da transcrição por *enhancers*. a) ação do *enhancer* junto ao promotor mínimo do gene; b) presença do insulador inibindo a ação do *enhancer* junto ao promotor mínimo; c) O ativador é capaz de acionar o promotor de outro gene; d) O promotor original pode ser ativado por outro *enhancer* posicionado a jusante. Fonte: adaptado de Watson *et al.*, 2008.

7.3.2. Elementos *trans*-regulatórios

Nas regiões regulatórias de um promotor vão se ligar também uma série de proteínas, denominadas fatores de transcrição, que reconhecem seqüências específicas de DNA, de aproximadamente 20 bases,

chamadas de motivos transcricionais ou sítios de ligação. O contato do fator de transcrição com cada base não é muito forte, mas o contato desse fator com todas as 20 bases do sítio é forte e específico. Assim, quanto mais próxima a seqüência de DNA estiver da seqüência ideal do sítio de ligação específico do fator de transcrição, maior será a interação entre a proteína e o DNA (Alberts *et al.*, 2002). Os diferentes motivos estruturais utilizados pelas proteínas regulatórias para ler as seqüências específicas de DNA levaram à classificação de fatores de transcrição em famílias, de acordo com características exclusivas da interação com seus sítios de ligação. Além disso, os fatores de transcrição atuam em sinergia, e a existência de vários sítios de ligação próximos uns dos outros leva ao agrupamento desses fatores em uma determinada região regulatória, potencializando a atividade do complexo transcricional (Schrem *et al.*, 2002; Levine & Tijan, 2003).

As proteínas regulatórias se dividem basicamente em dois grupos: as proteínas que se ligam diretamente a seqüência de DNA do promotor, e as que não se ligam diretamente (Figura 9). Essas últimas proteínas regulatórias não reconhecem diretamente a seqüência de DNA, mas vão se ligar a proteínas já ligadas ao DNA, estabilizando o complexo repressor ou ativador da transcrição, sendo chamadas de co-repressores ou co-ativadores conforme a situação (Schrem *et al.*, 2002). Já as proteínas que se ligam diretamente à seqüência de DNA vão atuar ativando ou reprimindo a transcrição basicamente de duas formas: facilitando ou dificultando a montagem da maquinaria transcricional da RNA polimerase II, ou alterando a estrutura da cromatina da região promotora, o que vai permitir maior ou menor acessibilidade dos fatores de transcrição e da maquinaria transcricional à seqüência de DNA em questão (Schrem *et al.*, 2002). De acordo com Brandalise (2007), os sítios de ligação para fatores de transcrição podem ser regulados sob as mais diversas situações, tais como, estímulos endógenos (auxinas, giberilinas, ácido salicílico, ácido jasmônico) e exógenos (luz, pressão, umidade, temperatura). A ação combinatória dos mesmos determina a ativação ou repressão da expressão gênica.

7.4. Importância da identificação de regiões promotoras em plantas

Os promotores constituem, portanto, uma ferramenta chave na regulação da transcrição gênica em eucariontes a fim de garantir que determinado gene seja expresso num modelo temporal, espacial e na magnitude adequada. Entretanto, as seqüências regulatórias nem sempre são funcionalmente compatíveis entre diferentes organismos. Genes de bactérias, por exemplo, podem não ser expressos em plantas (Fraley *et al.*, 1983), e alguns genes de monocotiledôneas apresentam um outro perfil de expressão quando inseridos em dicotiledôneas (Willmitzer, 1988). Também foi descrito que plantas transgênicas apresentando genes regulados pelo seu próprio promotor podem apresentar silenciamento gênico (Flavell *et al.*, 1994; Matzke *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996). Assim sendo, muitas vezes, para obter a expressão adequada do gene transferido, faz-se necessário substituir as regiões regulatórias originais por outras que funcionem de maneira desejada, obtendo-se um gene quimérico (Herrera-Estrella *et al.*, 1984). Desta forma, é essencial o isolamento de novos promotores a partir de diferentes espécies de plantas.

Alguns promotores conferem expressão constitutiva, enquanto outros permitem a expressão órgão/tecido-específica, ou tem sua expressão induzida pelo meio (Walden & Wingender, 1995). Os mecanismos que regulam a atividade de promotores que conferem padrões de expressão tecido- ou desenvolvimento-específicos em plantas são geralmente pouco compreendidos (Tian *et al.*, 2005). Em parte, isso ocorre em função do número limitado de promotores com tais características a terem sido isolados e caracterizados funcionalmente.

Promotores que garantem a expressão de um transgene em um ambiente particular, numa fase do desenvolvimento ou de maneira específica em um determinado órgão/tecido, são extremamente úteis. Há uma série de vantagens em se restringir a expressão do transgene em determinada célula ou tecido-alvo através do emprego de promotores tecido-específicos. A expressão de uma proteína heteróloga em sementes ou em

tubérculos, por exemplo, evita o seu acúmulo em órgãos vegetativos, o que poderia provocar a intoxicação da planta hospedeira ou a morte de organismos não-alvos (Ma *et al.*, 2003). Paralelamente, sistemas baseados em promotores induzidos, que respondam a estímulos externos químicos (Padidam, 2003) ou físicos (Cramer *et al.*, 1999), também podem ser usados para restringir a expressão do gene exógeno numa base temporal.

Atualmente, várias seqüências regulatórias que conferem padrões de expressão dos mais diversos foram identificadas e clonadas a partir de diferentes organismos, permitindo a obtenção de construções quiméricas que atendem a inúmeros objetivos (Tabela 1).

7.4.1. Promotores constitutivos

O promotor constitutivo mais comumente utilizado para a obtenção de plantas geneticamente modificadas é o promotor do rRNA 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV - *Cauliflower Mosaic Virus*) (Odell *et al.*, 1985; Ow *et al.*, 1987; Jefferson *et al.*, 1987; Benfey & Chua, 1990; Medberry *et al.*, 1992; Potenza *et al.*, 2004). O CaMV é um vírus cujo genoma é constituído por uma molécula de DNA fita dupla. A partícula viral é não envelopada, de simetria icosaédrica, tendo cerca de 50 nm de diâmetro. O CaMV pode ser transmitido por afídeos ou mecanicamente. Possui como principais hospedeiras plantas da família Brassicaceae, porém, também é capaz de infectar plantas das famílias Solanaceae e Resedaceae. O genoma viral possui dois promotores responsáveis por produzir os transcritos virais nas plantas infectadas: o 19S e o 35S. O promotor 35S é ativo em protoplastos isolados tanto de plantas monocotiledôneas como dicotiledôneas (Benfey & Chua, 1990; Lam *et al.*, 2001). Trata-se de um promotor forte que apresenta expressão constitutiva na maioria dos órgãos/tecidos de plantas transgênicas, mesmo sendo estas não susceptíveis ao vírus CaMV (Ow *et al.*, 1987).

Tabela 1. Exemplos de promotores caracterizados para a expressão de genes quiméricos em plantas.

Promotor	Produto do gene intacto	Referência
Expressão constitutiva		
<i>pCaMV 35S</i>	rRNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor	Neff & Binns, 1985
<i>pAct1</i>	Actina 1 de arroz	McElroy <i>et al.</i> , 1990
<i>pNOS</i>	Nopalina sintetase de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ebert <i>et al.</i> , 1987
<i>pOCS</i>	Octopina sintetase de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Leisner & Gelvin, 1988
<i>pUBI</i>	Poli-ubiquitina 1 do milho	Christensen & Quail, 1996
<i>pTUB</i>	α -tubulina de <i>Coffea arabica</i>	Gaitan & Aldwinckle, 1997
<i>pPAL</i>	Fenilalanina amônia-liase de <i>Coffea arabica</i>	Gaitan & Aldwinckle, 1997
Expressão em folhas		
<i>pNMT</i>	N-metiltransferase de <i>Coffea canephora</i>	Satyanarayana <i>et al.</i> , 2005
<i>prbcS1</i>	Rubisco – subunidade menor de <i>Coffea arabica</i>	Marraccini <i>et al.</i> , 2003
Expressão em sementes		
<i>pFASEOLINA</i>	Proteína de reserva de feijão	Sengupta-Gopalan <i>et al.</i> , 1985
<i>pCONGLICINA</i>	Subunidade alfa de proteína de reserva de soja	Chen <i>et al.</i> , 1986
<i>pLECITINA</i>	Lecitina de feijão	Voelker <i>et al.</i> , 1987
<i>pGLUTELINA</i>	Proteína de reserva de trigo	Colot <i>et al.</i> , 1987
<i>pHORDEÍNA- B1</i>	Proteína de reserva de cevada	Marris <i>et al.</i> , 1988
<i>pGT3</i>	Proteína de reserva (glutelina) de arroz	Leisy <i>et al.</i> , 1989
<i>pZEÍNA</i>	Proteína de reserva de milho	Matzke <i>et al.</i> , 1993
<i>p11S</i>	Proteína de reserva 11S de <i>Coffea arabica</i>	Acuña <i>et al.</i> , 1999; Marraccini <i>et al.</i> , 1999
<i>pOLE</i>	Oleosina de <i>Coffea arabica</i>	Simkin <i>et al.</i> , 2006
<i>pCcDH2</i>	Dehidrina de <i>Coffea canephora</i>	Hinniger <i>et al.</i> , 2006
Expressão em frutos		
<i>pRBCS2</i>	Rubisco de tomate	Baum <i>et al.</i> , 1997
Expressão induzida por patógenos		
<i>pPR1</i>	PR1 de <i>Arabidopsis</i>	Lebel <i>et al.</i> , 1998
<i>pPR1a</i>	PR1 de tabaco	Grüner & Pfitzner, 1994 Uknes <i>et al.</i> , 1993b
<i>pβ-1,3-glucanase</i>	PR2 de tabaco	Hennig <i>et al.</i> , 1993
<i>pGIII</i>	PR2 de cevada	Li <i>et al.</i> , 2005
<i>pgn1</i>	β -1,3-glucanase de tabaco	Kooshki <i>et al.</i> , 2003
<i>pOSMOTIN</i>	PR5 de tabaco	Nelson <i>et al.</i> , 1992
<i>pCALTPI</i>	<i>Basic lipid transfer protein</i> de <i>Capsicum annuum</i>	Jung <i>et al.</i> , 2005
<i>pPAL</i>	Fenilalanina amônia-liase de salsa	Lois <i>et al.</i> , 1989
<i>p5B</i>	Quitinase de feijão	Roby <i>et al.</i> , 1990
<i>pQUITINASE</i>	Quitinase ácida de <i>Arabidopsis</i>	Samac & Shah, 1991
<i>pCaPIP2</i>	<i>Pepper pathogen-induced protein</i>	Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>pSCaM-4</i>	Calmodulina de soja	Park C.Y. <i>et al.</i> , 2004
<i>pCaPIMP1</i>	<i>Pepper pathogen-induced membrane protein</i>	Hong & Hwang, 2009
<i>pwin3.12T</i>	<i>Wound-inducible poplar promoter</i>	Yevtushenko <i>et al.</i> , 2004
<i>pBs3</i>	<i>Pepper Bs3 resistance gene</i>	Römer <i>et al.</i> , 2007
<i>pWRKY1</i>	Fator de transcrição WRKY 1 de salsa	Eulgem <i>et al.</i> , 1999
<i>pCF1</i>	<i>Tomato Cf9 resistance gene</i>	Hennin <i>et al.</i> , 2001
<i>pCHC1</i>	Chalcona sintetase de feijão	Dron <i>et al.</i> , 1988 Loake <i>et al.</i> , 1991
<i>pHRGP4.1</i>	<i>Hydroxyproline-rich glycoprotein</i> de feijão	Wycoff <i>et al.</i> , 1995
<i>pCaIRL</i>	<i>Isoflavona reductase-like</i> de café (<i>C. arabica</i>)	Brandalise <i>et al.</i> , 2009
<i>pEAS4</i>	<i>Sesquiterpene cyclase</i> de tabaco	Yin <i>et al.</i> , 1997
<i>phsr203J</i>	<i>Defense-related gene hsr203J</i> de tabaco	Pontier <i>et al.</i> , 1999 Keller <i>et al.</i> , 1999

Apesar dos avanços obtidos com o uso deste promotor, os padrões de expressão dos transgenes sob seu controle são variados e baixos em alguns casos (Zheng & Murai, 1997; Green *et al.*, 2002; Shou *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2005; Wu & Birch, 2007), não havendo garantia de expressão no órgão/tecido adequado (Neuteboom *et al.*, 2002; Petrasovits *et al.*, 2007).

Outro promotor também utilizado em biotecnologia vegetal é o promotor do gene *UBQ3* que codifica uma poli-ubiquitina de *Arabidopsis thaliana* (Callis *et al.*, 1995). A ubiquitina é uma proteína encontrada em células de eucariotos e sua seqüência é altamente conservada entre diversos organismos. Essa proteína está envolvida em processos como degradação de proteína, controle do ciclo celular, reparo do DNA e respostas a estresses como, por exemplo, choque térmico (Christensen & Quail, 1996).

Os promotores dos genes *Ubi1* (*poli-ubiquitina 1*) de milho e *Act1* (*actina 1*) de arroz, apesar de serem considerados promotores constitutivos fortes, não podem ser utilizados em experimentos de transformação estável em todas as monocotiledôneas (Wilmink *et al.*, 1995; Kamo *et al.*, 1995; Kamo *et al.*, 2000; Joung & Kamo, 2006).

Embora exista um grande número de promotores constitutivos isolados e potencialmente aplicáveis na obtenção de plantas transgênicas, a identificação de novos promotores ainda se faz necessária. Entretanto, o uso de promotores constitutivos, como os citados acima ou aqueles derivados de espécies não relacionadas, tem sido alvo de contestação, sobretudo do ponto de vista do consumo humano/animal e efeito no meio ambiente. Tentando minimizar esse problema, promotores constitutivos têm sido isolados e caracterizados em diferentes espécies tais como arroz (McElroy *et al.*, 1990), cana-de-açúcar (Wei *et al.*, 2003), maçã (Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2005), medicago (Xiao *et al.*, 2005), milho (Christensen & Quail, 1996), entre outras.

7.4.2. Promotores de fruto- e/ou semente-específicos

A identificação e caracterização de promotores de genes envolvidos no desenvolvimento e amadurecimento de frutos têm recebido atenção considerável devido à importância destes na dieta humana. Segundo Greenberg (1996) essas etapas representam os maiores problemas da produção, uma vez que o amadurecimento é relativamente rápido em algumas espécies. Muitos genes específicos de maturação estão sendo isolados e utilizados para alterar a expressão dos padrões de maturação dos frutos. Dentre esses já foram identificados genes relacionados à desestruturação da parede celular, mudanças no conteúdo de açúcares solúveis, biossíntese de pigmentos, produção das vitaminas, antioxidantes, sabor, e compostos aromáticos (Giovannoni, 2004). Entretanto, há muitas perguntas não respondidas a respeito das regiões regulatórias que controlam estes processos. Análise de promotores de genes relacionados ao amadurecimento de frutos foi realizada principalmente em tomate (Carrington *et al.*, 1993). Esta espécie foi usada também como sistema heterólogo para estudar promotores frutos-específicos de outras plantas, tais como a maçã, pimenta e kiwi (Atkinson *et al.*, 1998; Kuntz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000).

Em sementes, os genes que codificam proteínas de reserva como a zeína do milho (*Zea mays* L.), a faseolina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e a legumina da *Vicia faba* foram os primeiros a serem caracterizados (Wienand *et al.*, 1981; Pedersen *et al.*, 1982; Slightom *et al.*, 1983; Bäumllein *et al.*, 1986). Seus promotores foram analisados funcionalmente expressando os genes completos ou em fusões com um gene repórter (Sengupta-Gopalan *et al.*, 1985; Bäumllein *et al.*, 1991). Esses estudos mostraram que tais promotores são tecido-específicos, ou seja, são expressos somente nas sementes. Análises mais detalhadas dessas regiões regulatórias revelaram elementos específicos que controlam esta especificidade (Wobus *et al.*, 1995). O promotor da faseolina é o mais utilizado nos experimentos de engenharia genética visando à expressão

semente-específica (Altenbach *et al.*, 1989), mas outros promotores com tal padrão de expressão já foram relatados na literatura (Fiedler *et al.*, 1993; Shutov & Bäumllein, 1999; Heim *et al.*, 2001; Saalbach *et al.*, 2001; Contim *et al.*, 2003). Chen *et al.* (2007), por exemplo, isolaram e caracterizaram o promotor do gene da subunidade menor da AGPase (ADP-glucose pyrophosphorylase) de endosperma de milho. Este promotor foi capaz de regular a expressão de maneira específica em sementes de tabaco.

De acordo com Delaney (2002), promotores fruto- e semente-específicos são mais vantajosos para a produção de proteínas recombinantes nas plantas do que sistemas usando a folha ou raiz. Estes órgãos normalmente apresentam um pequeno número de proteínas armazenadas, as quais se acumulam em organelas específicas e altamente estáveis, fato que inviabiliza o emprego dos mesmos como bioreatores ideais para a produção de proteínas recombinantes (Hood, 2004).

7.4.3. Promotores induzidos por patógenos

Plantas transgênicas foram introduzidas em programas de melhoramento na tentativa de melhorar ou fortalecer os mecanismos de defesa contra patógenos (Rommens & Kishore, 2000; Prins *et al.*, 2008). Nesse contexto, o uso de promotores apropriados é importante para o controle da quantidade, localização e tempo de expressão de um gene exógeno. A princípio, os cassetes de expressão construídos para expressar genes de defesa eram constituídos por promotores constitutivos fortes, o que resultava em plantas de baixa qualidade (Stuiver & Custers, 2001; Hammond-Kosack & Parker, 2003; Michelmore, 2003). Como forma de reduzir os gastos energéticos da expressão constitutiva de genes de defesa em células não infectadas, optou-se pelo uso de promotores induzidos por patógenos, os quais apresentam níveis basais de expressão em condições normais (sem infecção) (Figura 11) (Gurr & Rushton, 2005).

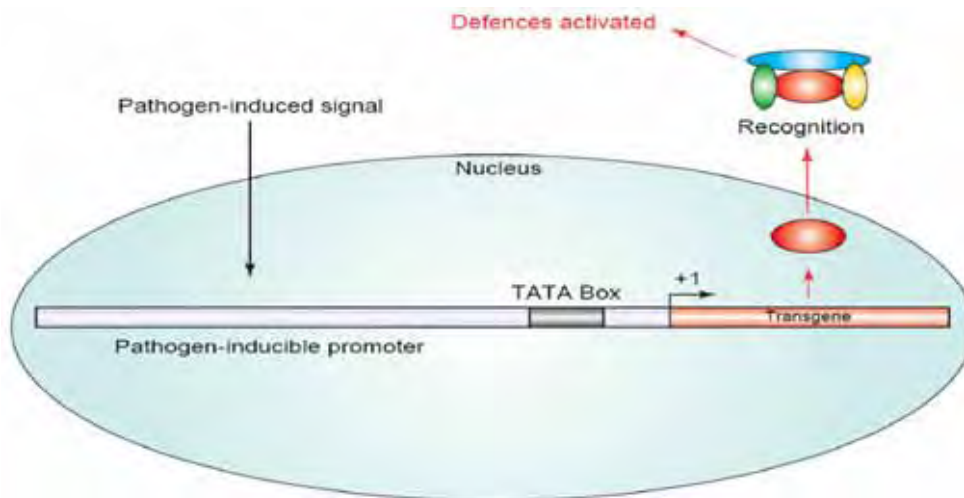


Figura 11 - Estratégia para a produção de plantas transgênicas com resistência a diversos tipos de patógenos. Através deste mecanismo é possível expressar transgenes codificando moléculas elicitoras, proteínas de avirulência ou até mesmo genes de resistência, ou relacionados aos mecanismos de defesa, sob o controle de um promotor induzido somente na presença de um patógeno. Fonte: adaptado de Gurr & Rushton (2005).

Um promotor induzido por patógeno ideal é aquele que pode ser ativado rapidamente em resposta a diversos tipos de patógenos, e ser efetivo no processo de defesa da planta. Como os patógenos apresentam diferentes mecanismos de infecção (biotróficos, hemibiotróficos ou necrotróficos), cada tipo de interação pode exigir um promotor específico a ser induzido. Tal promotor também deve ser inativo em condições livres do patógeno, para garantir que não ocorram investimentos desnecessários em respostas de defesa induzidas pela expressão do transgene (McDowell & Woffenden, 2003). Adicionalmente, o promotor não deve ser regulado pelo transgene, pois isto poderia levar a um descontrole na expressão do gene. Infelizmente, poucos promotores reúnem todas essas características (Hammond-Kosack & Parker, 2003; Michelmore, 2003). Nesse caso, pode-se perguntar se de fato existem poucos promotores que agregam estas características (provavelmente por que um único *cis*-elemento é

normalmente alvo de diversas rotas de sinalização) (Eulgem, 2005), ou se na verdade, poucos foram testados. A indisponibilidade de promotores adequados foi evidenciada em pesquisas com os promotores *DRR206* de ervilha e *GSTF8* de *Arabidopsis*. Observou-se nesses trabalhos que nenhum promotor apresentou as características necessárias para viabilizar o seu uso em programas visando o aumento de resistência contra patógenos, pois os promotores testados eram, ou induzidos por ferimentos, ou não eram induzidos por todos os patógenos (Choi *et al.*, 2004; Perl-Treves *et al.*, 2004).

Um promotor induzido por patógeno promissor é o promotor do gene *hsr203J* (Keller *et al.*, 1999; Belbahri *et al.*, 2001). Este promotor foi usado por De Wit (1992) para o desenvolvimento de plantas transgênicas que possuíam um gene que codificava um elicitor altamente ativo (Figura 11). A produção do elicitor nos locais de infecção foi suficiente para direcionar as defesas naturais da planta, impedindo o desenvolvimento do patógeno. O promotor *hsr203J* também foi usado para a obtenção de plantas transgênicas de tabaco contendo, como transgenes, os elicitores criptogeína ou popA. Plantas expressando criptogeína apresentaram um amplo espectro de resistência a doenças (Keller *et al.*, 1999). No entanto, as plantas expressando popA não se mostraram tão promissoras e algumas linhagens apresentaram um descontrole da expressão, resultante possivelmente de uma regulação do transgene sobre o promotor. Adicionalmente, o tratamento com patógenos virais levou à ativação sistêmica do transgene, comprometendo o desenvolvimento das plantas (Belbahri *et al.*, 2001). Desta forma, a aplicabilidade do promotor *hsr203J* visando resistência a doenças ainda não foi totalmente estabelecida.

Muitos promotores disponíveis atualmente e induzidos por patógenos apresentam padrões basais de expressão que os tornam inadequados como ferramentas biotecnológicas. No entanto, as análises de transcriptoma associadas a outras técnicas, como o *genome walking*, se mostram promissoras no sentido de viabilizar a identificação e clonagem de promotores induzidos por patógenos. Através da análise transcricional, vários genes diferencialmente expressos (induzidos ou reprimidos) durante a

interação planta-patógeno podem ser identificados. Nesse contexto, a técnica de *genome walking* permite amplificar, através de PCR, regiões localizadas à montante de determinada seqüência (Devic *et al.*, 1997) empregando-se, respectivamente, oligonucleotídeos complementares aos adaptadores e à seqüência conhecida (na maioria dos casos ESTs - *expressed sequence tags*). Uma vez clonados, os promotores dos genes validados serão potencialmente úteis para emprego em programas que objetivam aumentar a resistência das plantas às doenças. Estudos recentes de análise de transcriptoma sugerem que aproximadamente 50 promotores de *Arabidopsis* podem ser considerados bons candidatos para o aumento da resistência de plantas contra patógenos (Eulgem *et al.*, 2004; Eulgem, 2005).

7.5. Caracterização de regiões promotoras de genes de café

Em café a enzima endo- β -mananase ([1 \rightarrow 4]- β -mannan endohidrolase, EC 3.2.1.78) está implicada no metabolismo de açúcares do tipo mananose presentes em paredes celulares durante a germinação dos grãos (Reid & Meier, 1973). Marraccini *et al.* (2001) isolaram e sequenciaram dois cDNAs codificando endo- β -mananases em café arábica. De acordo com este trabalho, os transcritos destas enzimas somente são encontrados durante a germinação da semente, ou seja, os mesmos não são encontrados durante a maturação dos grãos ou em tecidos como raiz, caule, folhas ou flores. Esse gene representa, portanto um potencial candidato para a clonagem de sua região promotora.

Dada à importância da identificação e caracterização de promotores fruto-específicos, Marraccini *et al.* (1999) e Acuña *et al.* (1999) analisaram a região regulatória de genes específicos de endosperma de *C. arabica*. No primeiro caso, Marraccini *et al.* (1999) isolaram aproximadamente 1 kb da região 5' do gene *csp1*, codificador da proteína de reserva 11S - globulina, e relataram diversos motivos com similaridade aos elementos *cis*-regulatórios previamente descritos como específicos de semente (endosperma) em outras plantas. Neste trabalho também foi

realizada uma análise funcional do promotor, onde se observou tecido-especificidade e “força” quando comparado com o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Acuña *et al.* (1999) clonaram aproximadamente 2,5 kb da região 5' do gene codificador da proteína de reserva 11S - legumina (acesso No. AF055300, GenBank). De acordo com os autores, este promotor apresenta o motivo *legumin-box*, característico de proteínas de reserva de leguminosas (Bäumlein *et al.*, 1986). Entretanto, no café os transcritos sob a regulação deste promotor acumularam-se no endosperma, enquanto que nas leguminosas estão presentes no cotilédone.

Os elementos regulatórios envolvidos no controle da expressão do gene *oleosin*, que apresenta atividade específica em endosperma de semente de café, foram identificados e caracterizados *in silico* por Simkin *et al.* (2006).

A região reguladora da transcrição dos genes α -*tubulina* (gene constitutivo) e *fenilalanina amônia-liase* (PAL, gene induzido mediante a presença de patógenos) foram isolados de *C. arabica* e caracterizados por Gaitan & Aldwinckle (1997). Os promotores foram avaliados através de expressão transiente em sistema heterólogo.

Outro exemplo de promotor clonado em café refere-se à seqüência promotora do gene que codifica uma N-metiltransferase, uma enzima essencial na síntese de cafeína em plantas de café. Essa seqüência de 2,7 kb, obtida de *C. canephora*, foi suficiente para dirigir a expressão de um gene repórter em plantas transformadas de tabaco (Satyanarayana *et al.*, 2005). Ainda em *C. canephora*, um potente promotor grão-específico, de aproximadamente 1 kb, associado ao gene *CcDH2* (*dehydrins - late abundant proteins*) foi isolado e caracterizado (Hinniger *et al.*, 2006).

Marraccini *et al.* (2003) identificaram e caracterizaram a região promotora do gene *rbcS* (*small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase - EC.4.1.1.39*) de *C. arabica*. Este gene apresenta expressão específica em folhas e é regulado pela intensidade de luz.

Promotores tecido-específicos de folha e raiz foram identificados por Brandalise (2007). Segundo o autor, a região promotora do gene com expressão específica em folha, isolada de *C. 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.

Brandalise *et al.* (2009) caracterizaram o promotor do gene que codifica uma *isoflavona reductase-like* em café arábica (*CaIRL*), cuja expressão é específica em folha e induzida por estresses. Uma análise de deleção do promotor *CaIRL* em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgênicas demonstrou que a versão integral desse promotor (0.9 kb) é capaz de garantir uma expressão basal do gene repórter, sendo a mesma induzida por estresse mecânico. Por outro lado, uma expressão bastante reduzida do gene repórter, e não mais induzida por estresse mecânico, foi observada nas plantas transformadas com a versão menor do promotor (0.4 kb). A atividade do promotor *CaIRL* foi portanto bastante afetada pela deleção efetuada, e uma possível explicação para esse fato está na ausência de elementos *cis*-regulatórios do tipo W-box na versão menor.

A obtenção de plantas geneticamente modificadas com genes de interesse agrônomo (relacionados com resistência a pragas, doenças, seca, geada, etc.) isolados de espécies selvagens de *Coffea* representa um avanço significativo, pois permite acelerar o processo de obtenção de novos cultivares (Brandalise, 2007). Nesse contexto, a disponibilidade de promotores da própria espécie apresentando padrão de expressão constitutivo e/ou específico de determinado tecido/órgão 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 viabiliza um controle efetivo da expressão do gene introduzido de forma localizada e altamente

regulada, respeitando os níveis de biossegurança e a opinião pública. Assim, a busca por promotores com tais características tem sido uma prioridade em programas biotecnológicos que visam à produção e liberação comercial de organismos geneticamente modificados.

8. Mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de patógenos

As plantas apresentam diversos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos (bactérias, fungos, vírus e nematóides). Estes mecanismos incluem barreiras físicas e químicas pré-existentes, assim como a indução de genes de defesa contra o agente infeccioso (Heath, 2000a; Kortekamp & Zyprian, 2003).

A primeira linha de defesa da planta contra patógenos é a superfície das folhas. As barreiras estruturais incluem tanto a quantidade quanto a qualidade das ceras e cutícula que recobrem as células epidérmicas, além da estrutura das paredes celulares e a presença de tricomas especializados que inibem a penetração dos patógenos (Agrios, 1997; Kaloshian, 2004).

Vários compostos podem estar presentes, ou então serem rapidamente produzidos a partir de precursores (Poiatti, 2007). Van Etten *et al.* (1994), propuseram o termo fitoanticipinas para distinguir os compostos que são rapidamente sintetizados a partir de compostos pré-formados (Osbourn, 1996), das fitoalexinas, cujas vias biossintéticas são ativadas em resposta ao ataque de patógenos, fazendo parte da defesa induzida. A distribuição dos compostos pré-formados é quase sempre tecido-específica. Em geral, acumulam-se em tecidos mais externos onde funcionam como barreiras bioquímicas primárias contra patógenos. Patógenos eficientes teriam nesse cenário a capacidade de contornar o efeito desses compostos (Medeiros *et al.*, 2003). Segundo Roda *et al.* (2003), a superfície da folha de *Nicotiana attenuata* Torr. ex S. Wats. é rica em metabólitos secundários que diminuem os danos causados por herbívoros, patógenos e estresses abióticos. Como exemplo é possível destacar a nicotina, que ocorre tanto

nos tricomas epidérmicos como no mesófilo foliar; os diterpenos, que ocorrem exclusivamente no mesófilo; e a quercetina, que ocorre nos tricomas e parece ser excretada em toda a superfície da folha. Esses mesmos autores relatam que a composição dos metabólitos secundários nesta espécie muda com o desenvolvimento foliar, em resposta ao ataque de herbívoros e ao estresse ambiental. Em videira, a resistência ao fungo *Plasmopara viticola* é maior nas folhas mais velhas, da base dos brotos, do que nas folhas mais jovens, do ápice dos brotos (Kortekamp & Zyprian, 2003).

Do ponto de vista evolutivo, através da seleção natural e co-evolução com os agentes patogênicos, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos de defesa. As defesas identificadas em plantas resistentes estão também presentes nas suscetíveis. Provavelmente, a diferença entre resistência e suscetibilidade pode ser o resultado de uma variação de tempo, autonomia celular ou intensidade das respostas de defesa das plantas (Moraes, 1998).

Segundo Medeiros *et al.* (2003), o contato entre o patógeno e o protoplasma da célula hospedeira desencadeia reações de síntese de compostos tóxicos para o patógeno. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, encontra as defesas da planta. Estas são rapidamente ativadas, impedindo a multiplicação do patógeno e produzindo resistência. Primeiramente ocorre o reconhecimento genético entre a planta e o patógeno; a segunda fase corresponde ao processo de transdução de sinal, e a terceira à ativação de genes culminando na resistência da planta. Na interação compatível o patógeno invade o tecido vegetal, multiplica-se e provoca doença na planta. Na resistência não específica à raça não se sabe como ocorrem estes eventos primários de sinalização, mas acredita-se que uma interação entre os elicitores do patógeno com receptores nas plantas também deva acontecer. Estes elicitores são classificados como gerais (Kaku *et al.*, 2006) e são diferentes dos genes de avirulência, podendo ser proteínas secretadas e fragmentos da parede celular do patógeno, ou ainda produtos da própria planta originados pela degradação provocada pelo

agente patogênico. As plantas capazes de reconhecer tais elicitores parecem ter uma resistência mais ampla, pois estes não são específicos a uma única raça (Montesano *et al.*, 2003).

O termo elicitador (*elicitor*) foi utilizado originalmente para se referir às moléculas e outros estímulos que induziam a síntese ou acúmulo de compostos antimicrobianos (fitoalexinas) nas células da planta (Poiatti, 2007). Atualmente, o termo elicitador é utilizado para moléculas que estimulam algum mecanismo de defesa na planta, como o acúmulo de fitoalexinas antimicrobianas, a indução da morte celular (reação de hipersensibilidade) e a síntese de proteínas que inibem as enzimas de degradação produzidas por patógenos (Hahn, 1996). Elicitores, geralmente, são moléculas da superfície de um microrganismo patogênico da planta, as quais, quando aplicadas em plantas hospedeiras ou não hospedeiras induzirão sintomas de reações de resistência típicas do sistema patógeno-planta estudado (Kortekamp & Zyprian, 2003).

Portanto, o reconhecimento rápido de patógenos invasores pelas células vegetais e a indução rápida das respostas de defesa são essenciais para a manifestação da resistência (Yamamizo *et al.*, 2006).

8.1. Reconhecimento genético ente a planta e o patógeno

As plantas reconhecem o parasita através de receptores especializados que desencadeiam as respostas de defesa após a detecção do agente patogênico (Jones & Dangl, 2006). Assim, a resistência basal é desencadeada por receptores presentes na membrana vegetal capazes de reconhecer sinais moleculares associados aos micróbios ou agentes patogênicos (MAMPs ou PAMPs - *Microbial-* ou *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Como exemplos desses sinais destacam-se os fragmentos de paredes celulares, a quitina ou motivos peptídicos do flagelo das bactérias (Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006; Nürnberger & Kemmerling, 2008). Para contornar a defesa básica, os agentes patogênicos desenvolveram proteínas efetoras de virulência que são emitidas nas células

da planta hospedeira (Jones & Dangl, 2006; Catanzariti *et al.*, 2007). Na etapa seguinte do ciclo evolutivo, as plantas desenvolveram meios para reconhecer estas proteínas efetoras e responder ao ataque de patógenos através de um mecanismo de defesa robusto e rápido. Esta segunda frente de defesa é conhecida como imunidade desencadeada por efetores (ETI - *Effector-Triggered Immunity*) e é controlada por genes de resistência (denominados genes *R*) (Jones & Dangl, 2006; Tameling & Takken, 2007; Boller & He, 2009).

8.1.1. O conceito de reconhecimento “gene a gene”

A ETI funciona de acordo com o conceito de reconhecimento descrito por Flor (1955). Este conceito postula que o reconhecimento do patógeno pela planta ocorre através da existência de interações “gene a gene”. Trata-se de um modelo receptor-ligante no qual o produto do gene de resistência (*R*) atua como receptor que detecta o gene correspondente de avirulência (*Avr*) do patógeno (Ellis *et al.*, 2000). Um exemplo desse tipo de interação foi demonstrada entre a proteína quinase Pto de tomate e *AvrPto* de *Pseudomonas syringae* em leveduras (Tang *et al.*, 1996).

Essa interação entre a planta e o patógeno poderá resultar na resistência raça-específica, qualitativa ou monogênica (Figura 12) (Kaloshian, 2004; Ruiz *et al.*, 2005; Yamamizo *et al.*, 2006; Rauscher *et al.*, 2006). No entanto, nem toda interação patógeno-planta hospedeira encaixa-se nesse modelo (Medeiros *et al.*, 2003). Segundo Kaloshian (2004) a interação direta das proteínas *R* com suas respectivas proteínas efetoras *Avr* como proposto, tratar-se-ia de uma exceção, ao invés de regra. Neste caso, a interação da proteína *Avr* do patógeno ocorreria com uma proteína alvo na planta hospedeira, cuja mudança conformacional seria importante para a sua ligação com a proteína *R*, e conseqüente desencadeamento das respostas de defesa (Poiatti, 2007).

Nos últimos anos, vários genes *R* foram clonados, o que representa um avanço significativo nos estudos de resistência das plantas no nível molecular (McDowell & Woffenden, 2003; Glazebrook, 2005). Do mesmo modo, vários genes de avirulência (*Avr*) foram caracterizados e estudados em vírus, bactérias e fungos (Espinosa & Alfano, 2004; Armstrong *et al.*, 2005; Catanzariti *et al.*, 2007).

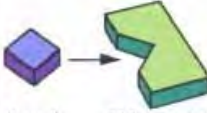
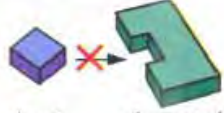

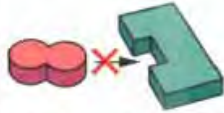
Pathogen genotype	Host plant genotype	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 Avr1 R1 protein No disease (Plant and pathogen are incompatible .)	 Avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible .)
<i>avr1</i>	 avr1 R1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible .)	 avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible .)

Figura 12 - Modelo de reconhecimento “gene a gene” entre planta-patógeno proposto por Flor. Para a resistência ocorrer (interação incompatível) é necessário genes dominantes complementares, ou seja, um gene *R* na planta e um *Avr* no patógeno. Uma alteração ou perda do gene de resistência da planta (*R* mudando para *r*), ou do gene de avirulência do patógeno (*Avr* mudando para *avr*) resulta em doença (interações compatíveis). *R*, *Avr*: genes dominantes; *r*, *avr*: genes recessivos; R: produto do gene de resistência; Avr: produto do gene de avirulência. Fonte: Hammond-Kosack & Jones (2000).

8.1.2. Genes *R*

Apesar da grande diversidade de patógenos, os genes *R* são agrupados em oito classes de proteínas (Tabela 2). Análises das seqüências deduzidas de aminoácidos dos produtos resultantes demonstraram que alguns compartilham domínios conservados mesmo em espécies diferentes (Figura 13) (Staskawicz, 2001; Nürnberger & Kemmerling, 2006).

Tabela 2. Alguns genes *R* caracterizados em plantas.

Classe	Gene	Estrutura protéica
1A	<i>I2, Mi, RPS5, Pib, BS2, Dm3</i>	NB-LRR
1B	<i>L, M, N, P, RPP1, RPP4, RPP5, RPS4, Prf</i>	TIR-NB-LRR
1C	<i>Gpa2/Rx1, Mla, Rp1, RPP8/HRT, RPP13, Rx2, Sw-5, Xal, RPS2, R1, RPM1</i>	CC-NB-LRR
1D	<i>RRS-1</i>	TIR-NB-LRR-NLS-WRKY
1E	<i>Pi-ta</i>	NB-LRD
2A	<i>Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9</i>	eLRR-TM-sCT
2B	<i>Ve1</i>	CC-eLRR-TM-ECS
	<i>Ve2</i>	eLRR-TM-PEST-ECS
3	<i>Pto, Fen, PBS1</i>	LRR-Nmir-CAT
4	<i>Xa21, Xa26, FLS2</i>	eLRR-TM-CAT
5	<i>RPW8, Xa13</i>	TM-CC
6	<i>Rpg1</i>	CAT-CAT
7	<i>Asc-1</i>	TM-LAG1
8	<i>HM1</i>	Toxina redutase

Abreviações: NB, domínio de ligação a nucleotídeos; LRR, domínio de repetição rica em leucina; TIR, região com homologia ao domínio citoplasmático dos receptores Toll de *Drosophila* e interleucina-1 de humanos; CC, domínio *coiled-coil*; NLS, sinal de localização nuclear; WRKY, domínio de ligação ao DNA típico de fatores de transcrição do tipo WRKY; LRD, domínio rico em leucinas; TM, domínio transmembrana; sCT, *single cytoplasmic tail*; ECS, sinal de endocitose; PEST, Pro-Glu-Ser-Thr; Nmir, sítio de N-miristilação; CAT, domínio catalítico; e LAG1, motivo análogo ao *yeast longevity assurance gene*.

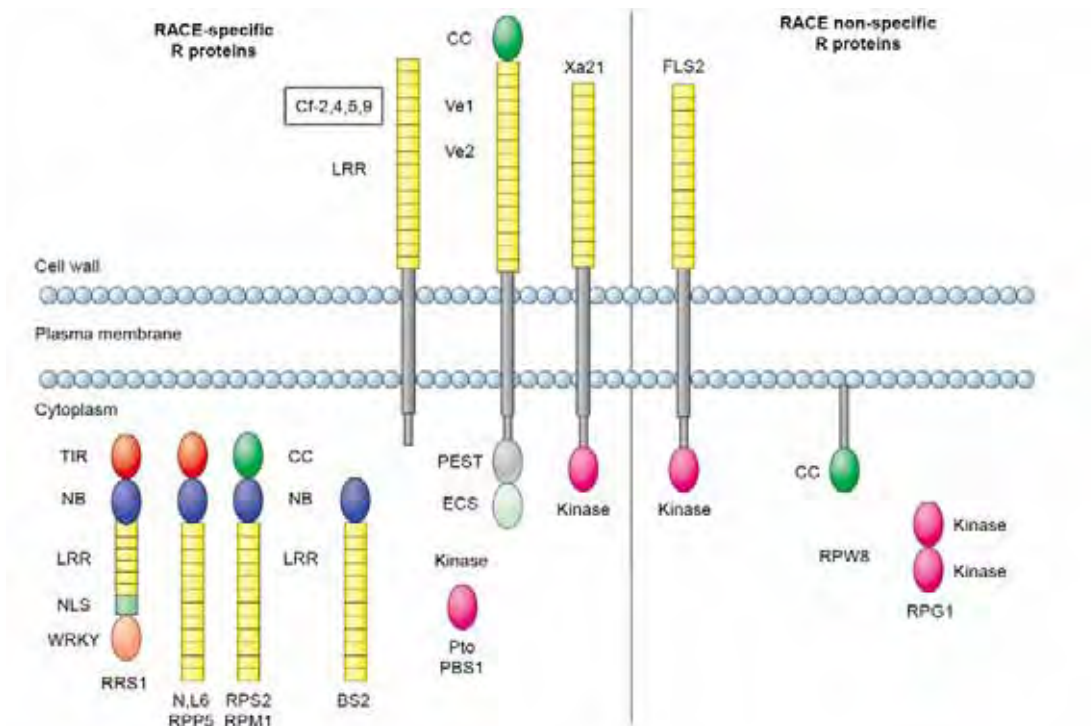


Figura 13 - Representação da localização e estrutura das proteínas R que conferem resistência do tipo raça-específica ou raça não-específica. Os domínios aqui apresentados (abreviados) estão descritos na Tabela 2. Proteínas Cf-X, Ve1 e Ve2, Xa21 e FLS2 apresentam o domínio transmembrana e LRR extracelular. O produto do gene *RPW8* apresenta um sinal de ancora na extremidade amino (N) terminal. Os genes *Pto* e *PBS1* codificam proteínas do tipo serina-treonina quinase citoplasmática, mas podem estar associadas à membrana através de um sítio de miristilação em sua porção N-terminal. A maior classe de proteínas R, NB-LRR, apresenta-se no citoplasma e podem apresentar diferentes domínios em sua porção N-terminal ou C-terminal. Fonte: adaptado de Hammond-Kosack & Parker (2003).

A primeira classe, chamada *Nucleotide-Binding site plus Leucine Rich Repeat* (NB-LRR), é a mais estudada. Proteínas NB-LRR apresentam uma seqüência de ligação a nucleotídeos ATP e GTP na região NB, enquanto o domínio LRR está implicado no reconhecimento de efetores e/ou perturbações ao nível celular causadas pelos agentes patogênicos (De Wit, 2007). O domínio LRR corresponde a um motivo com variações no número de repetições de leucinas (Baker *et al.*, 1997; Staskawicz, 2001). Domínios semelhantes à NB e LRR são encontrados em diversas proteínas, e podem funcionar como sítios de interação proteína-proteína, ligação de peptídeos-ligantes e interação proteína-carboidrato (Baker *et al.*, 1997; Staskawicz, 2001; Dangl & Jones, 2001; Belkhadir *et al.*, 2004).

Os domínios NB e LRR são intracelulares e podem apresentar variações em suas posições N-terminal ou C-terminal. Assim, a família de proteínas NB-LRR é subdividida de acordo com a presença ou ausência da região N-terminal TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*), assim chamada por ser análoga aos domínios intracelulares sinalizadores das proteínas Toll de *Drosophila* e receptor interleucina de mamíferos. A similaridade na função de proteínas que contêm a região TIR sugere que as mesmas podem estar envolvidas em vias de sinalização comuns a muitos organismos, além de possivelmente terem uma ligação com processos celulares e vias fundamentais de resistência (Martin *et al.*, 2003; Torii, 2004; Hu *et al.*, 2005). As proteínas R do tipo NB-LRR também podem apresentar os domínios *coiled-coil* (CC) ou zíper de leucina (LZ) na região N-terminal (Tameling & Takken, 2007). Membros do grupo CC/LZ-NB-LRR também podem apresentar domínios suplementares em sua porção N-terminal (Tuskan *et al.*, 2006; Rairdan & Moffett, 2006). Esses domínios apresentam funções relacionadas com a resposta imune e transdução de sinal (Dangl & Jones, 2001). Por outro lado, na região C-terminal de algumas proteínas R do tipo NB-LRR foi identificado um domínio de ligação ao DNA típico de fatores de transcrição do tipo WRKY (Deslandes *et al.*, 2003; Lahaye, 2004). Esta proteína (TIR-NB-LRR-WRKY) é codificada pelo gene *RRS1-R* de *Arabidopsis*, que confere resistência a *Ralstonia solanacearum*, cujo fator de

avirulência é *PopP2*. De acordo com Deslandes *et al.* (2003), o complexo protéico RSS1-R/PopP2 é transportado ao núcleo e o domínio WRKY ativa genes de defesa.

O gene *RPS2* em *Arabidopsis* oferece resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *P. syringae* pv. *maculicola* (portadoras do gene *AvrRpt2*); o gene *N* do fumo confere resistência ao vírus do mosaico do tabaco; o gene *L6* do linho oferece resistência a certas raças de fungos da ferrugem (*Melampsora lini*) portadoras do gene de avirulência *Avr6*. Esses genes de resistência são ativados pelos genes de avirulência correspondentes dos patógenos, cujos produtos constituem os elicitores das respostas de hipersensibilidade (Agrios, 1997).

Estudos de genética clássica mostram que grande parte dos genes *R* é encontrada em *clusters* (grupos de genes) nos genomas de plantas. O rearranjo desses *clusters* pode ser crítico para a geração de modelos de resistência específica e recombinação gênica (Camillo, 2006). O genoma de *Arabidopsis* é um exemplo da diversidade desses genes; nele foi verificada a existência de, aproximadamente, 100 genes contendo domínios TIR-NB-LRR, um número considerado pequeno para mediar o reconhecimento de inúmeras proteínas *Avr* ligantes (Marathe & Dinesh-Kumar, 2003; Meyers *et al.*, 2003). O gene de resistência *RPM1* de *Arabidopsis*, por exemplo, reconhece dois genes *Avr* não homólogos denominados *Avrpm1* e *AvrB*, porém esse “duplo reconhecimento” foi demonstrado em poucos casos (Grant *et al.*, 1995; Dangl & Jones, 2001).

Devido às semelhanças bioquímicas e estruturais, uma nova estratégia tem sido utilizada para a identificação de genes *R* do tipo NB-LRR (Orsi, 2003). Esta estratégia está baseada no estabelecimento de oligonucleotídeos degenerados, obtidos a partir do alinhamento de seqüências de diversos genes já identificados e caracterizados, contendo seqüências que codificam para os domínios NB e LRR (Altschul *et al.*, 1990; Staskawicz, 2001). Essa abordagem é viável devido à presença de regiões conservadas principalmente dentro do domínio NB. Os genes identificados através desta estratégia têm sido genericamente chamados de análogos de

genes de resistência (RGA - *resistance gene analogs*). A identificação de RGAs por amplificação utilizando-se de primers heterólogos já foi realizada em trigo e cevada (Seah *et al.*, 1998), em soja (Yu *et al.*, 1996), em tomate (Leister *et al.*, 1996), em milho (Collins *et al.*, 1998), em arroz (Mago *et al.*, 1999) entre outros. Até o presente mais de 500 seqüências foram identificadas como RGAs em diferentes espécies de plantas (Staskawicz, 2001). Em *C. arabica* e *C. canephora*, algumas famílias de RGAs do tipo NB-LRR foram identificadas por esta estratégia de amplificação direta (Noir *et al.*, 2001).

A segunda classe de genes *R* (do tipo eLRR-TM-sCT) inclui os genes *Cf* de tomate que apresentam receptores transmembrana com domínios LRR extracelulares (Rivas & Thomas, 2005). Os genes *Cf* do tomateiro conferem resistência ao fungo *Cladosporium fulvum*.

A terceira classe (LRR-Nmir-CAT) inclui o gene *Pto* do tomateiro que codifica uma serina-treonina quinase (Martin *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2002). Este gene foi o primeiro gene *R* a ser isolado e confere resistência à bactéria *P. syringae* pv. *tomato*, sendo que Pto-AvrPto representa um modelo característico de reconhecimento “gene a gene” (Fritig *et al.*, 1998). Estes tipos de receptores estão relacionados à percepção de PAMPs (Nürnberg & Kemmerling, 2006).

A quarta classe (eLRR-TM-CAT) é representada pelo gene de arroz *Xa21* que confere resistência ao patógeno bacteriano *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *Xa21* (Sun *et al.*, 2004). Este gene codifica um receptor transmembrana com um domínio extracelular do tipo LRR e um domínio intracelular serina-treonina quinase.

Na quinta classe (TM-CC) está presente o gene *RPW8* de *Arabidopsis*, que confere resistência contra fungos biotróficos (Xiao *et al.*, 2001).

A sexta classe inclui o gene *Rpg1* de cevada que apresenta dois domínios catalíticos do tipo serina-treonina quinase (CAT-CAT). Este gene confere resistência específica contra o fungo biotrófico *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Brueggeman *et al.*, 2002).

Na sétima classe encontra-se o gene *Asc-1* de tomate, o qual codifica uma proteína com os motivos TM-LAG1 (Brandwagt *et al.*, 2000). Este gene confere resistência contra o fungo necrotrófico *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*.

A oitava e última classe inclui o gene *HM1*, que confere resistência ao fungo *Cochliobolus carbonum*. *HM1* codifica uma redutase dependente de NADPH que inativa a toxina produzida pelo fungo. Este último gene é diferente dos outros citados devido a não dependência de um componente Avr na degradação da toxina por *HM1* (Baker *et al.*, 1997; Dangl & Jones, 2001).

8.1.3. Fatores Avr

Os patógenos são classificados em dois tipos: patógenos virulentos e avirulentos. Os patógenos virulentos não possuem gene *Avr*, cujo produto gênico é reconhecido por uma proteína de resistência da planta. Desta forma, o patógeno esquiva-se da ativação rápida do mecanismo de defesa, podendo se multiplicar e produzir doença. Já os patógenos avirulentos possuem gene *Avr*, cujo produto é reconhecido por uma proteína de resistência (R) da planta, culminando na ativação rápida do processo de defesa (Cordeiro & Grossi-de-Sá, 1999). A especificidade e a complexidade genética deste mecanismo são grandes, e já foi relacionada com àquela do complexo maior de histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) nos animais (Dangl, 1992).

Os genes *Avr* são diversos e codificam proteínas com baixa similaridade (exceto na família de genes *AvrBs3/PthA* de *Xanthomonas*) (Lahaye & Bonas, 2001). Vários genes *Avr* já foram caracterizados em diferentes patógenos (Cordeiro & Grossi-de-Sá, 1999; Espinosa & Alfano, 2004; Armstrong *et al.*, 2005; Catanzariti *et al.*, 2007). Os genes caracterizados codificam proteínas hidrofílicas de 20-100 kDa (Lummerzheim *et al.*, 1993). Tais genes foram identificados em bactérias fitopatogênicas por induzirem uma resposta de hipersensibilidade em plantas

não hospedeiras. Embora os genes *Avr* proporcionem um efeito negativo na aptidão da bactéria como patógeno em plantas contendo genes *R* correspondentes, eles desempenham papel fundamental na virulência e conferem vantagem seletiva nas interações compatíveis (Lahaye & Bonas, 2001). Estes genes são encontrados essencialmente em plasmídeos, e sua transferência para cepas adaptadas a um determinado hospedeiro pode gerar avirulência se detectado pelo sistema de defesa da planta (Chan & Goodwin, 1999; Gabriel, 1999; Brunings & Gabriel, 2003).

Os fungos patogênicos biotróficos produzem estruturas de infecção (haustório) capazes de penetrar na parede celular e estabelecer sítios de assimilação de alimento e água através da invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira (Hahn & Mendgen, 2001). É também pelos haustórios que os fungos emitem os sinais responsáveis pela supressão das respostas de defesa que resulta em desenvolvimento da doença nas plantas sensíveis (Panstruga, 2003; Vogele & Mendgen, 2003), ou a ativação da reação de hipersensibilidade nas plantas resistentes (Heath, 1997) (Figura 14).

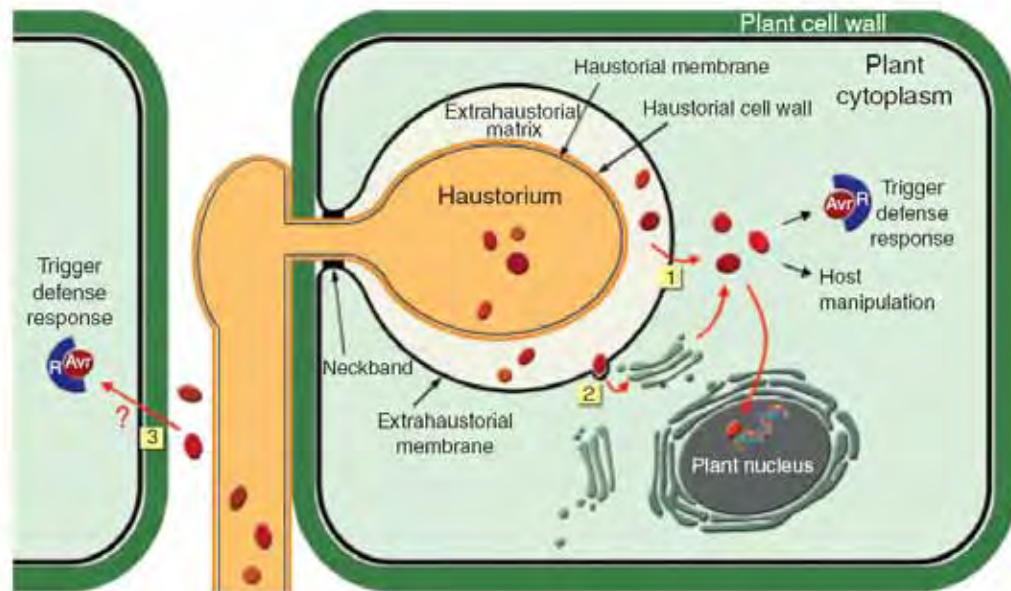


Figura 14 - Interface hospedeiro-haustório. Esquema de um haustório, na célula hospedeira apresentando a membrana extra-haustorial e a matriz extra-haustorial. As proteínas efetoras são segregadas pelo haustório na matriz extra-haustorial e exportadas para o citoplasma da célula vegetal através da membrana extra-haustorial (1) ou por vesículas presentes no sistema de membrana (2). Uma vez no citoplasma, as proteínas efetoras podem alterar o metabolismo e as vias de sinalização ligadas as defesas da planta hospedeira. As proteínas efetoras, que são reconhecidas pelas proteínas codificadas pelos genes de resistência (*R*), são chamadas de proteínas de avirulência (*Avr*). As proteínas *Avr* do patógeno são responsáveis pelo desencadeamento das respostas de defesa da planta. Proteínas efetoras também podem ser segregadas a partir de hifas dos fungos no apoplasto e entrar nas células vegetais por um mecanismo ainda desconhecido (3). Fonte: Catanzariti *et al.* (2007).

Alguns fatores Avr foram caracterizados em fungos patogênicos, a maior parte usando como modelo a interação do linho (*Linum usitatissimum* L.) com a ferrugem do linho (*Melampsora lini*). Foi mostrado que o gene *AvrL567* do *M. lini* é expresso nos haustórios e seu produto é exportado para as células vegetais infectadas a partir da matriz extra-haustorial (Dodds *et al.*, 2004; Dodds *et al.*, 2006). O linho apresenta 19 genes *R* clonados (Lawrence *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1997; Dodds *et al.*, 2001), os quais codificam proteínas citoplasmáticas do tipo TIR-NB-LRR. Estes dados sugerem que os genes *Avr* codificam proteínas que são exportadas para o interior da célula vegetal (Catanzariti *et al.*, 2006). A partir desta descoberta, vários fatores de avirulência foram clonados através de bibliotecas de cDNA oriundas de haustórios purificados e análise *in silico* de peptídeo sinal de exportação extracelular (HESP, *Haustorially Expressed Secreted Proteins*). Esta abordagem permitiu a identificação de 21 HESPs, entre os quais, 3 que apresentam co-segregação com os genes de avirulência *AvrM*, *AvrP123* e *AvrP4* da ferrugem do linho (Catanzariti *et al.*, 2006). A expressão transitória destes genes induz respostas de hipersensibilidade em folhas de linho que possuem os genes *R* correspondentes (*M*, *P4* e *P1/P2*, respectivamente). Segundo Catanzariti e colaboradores (2006), *AvrM* é um locus complexo que codifica pelo menos seis proteínas homólogas. As proteínas *AvrM* não apresentam similaridade com outras proteínas ou motivos protéicos conhecidos. *AvrP123* é um locus complexo correspondendo aos genes de resistência *P1*, *P2* e *P3*. Um dos genes desse locus, denominado *AvrP123-A*, codifica uma proteína exportada rica em cisteínas que possui uma seqüência característica dos inibidores de proteases do tipo Kazal Ser, sugerindo um papel na virulência do *M. lini*. *AvrP4* corresponde a um gene presente nas diferentes raças da ferrugem do linho e apresenta-se como um alelo de avirulência (*Avr*) ou de virulência (*avr*). Codifica também uma proteína de exportação rica em cisteínas que possui uma estrutura similar a um nó de cisteínas (*Cys knot structure*) característico de alguns inibidores de receptores ou proteases.

Em *Uromyces fabae*, um total de 62 proteínas secretadas pelos haustórios foi identificado, mas a função efetora destas proteínas ainda não foi estabelecida (Kemen *et al.*, 2005; Link & Voegelé, 2008). Segundo Duplessis S. (comunicação pessoal), trabalhos de identificação de fatores Avr estão sendo conduzidos para as ferrugens do *Populus* (*M. larici-populina*) e do trigo (*Puccinia graminis*), a partir do seqüenciamento dos genomas.

Além do produto do gene *Avr*, os patógenos avirulentos também sintetizam produtos a partir de genes chamados *hrp* (*hypersensitive response and pathogenecity*) (Lindgren *et al.*, 1986), que estão relacionados com a hipersensibilidade e patogenicidade. As proteínas Hrp estudadas estão relacionadas com quimiotaxia, transporte de moléculas da planta para a bactéria, síntese e exportação de fatores de virulência, indução do mecanismo de defesa na planta e sistema de secreção tipo III de bactérias fitopatogênicas (Baker *et al.*, 1997; Van Gijsegem *et al.*, 2000; Van Gijsegem *et al.*, 2002; Lahaye & Bonas, 2001; Büttner & Bonas, 2002; Alfano & Collmer, 2004; Chisholm *et al.*, 2006). Além dessas proteínas, o sistema secretório tipo III de fitopatógenos bacterianos é capaz de secretar harpinas, pilinas e outras proteínas (Figura 15) (Alfano & Collmer, 2004; Pieterse *et al.*, 2009). Essas bactérias também transferem ácidos nucleicos e complexos protéicos durante a conjugação bacteriana através do TFSS (*Type Four Secretion System*) (Christie & Vogel, 2000).

Evolution of Plant Innate Immunity

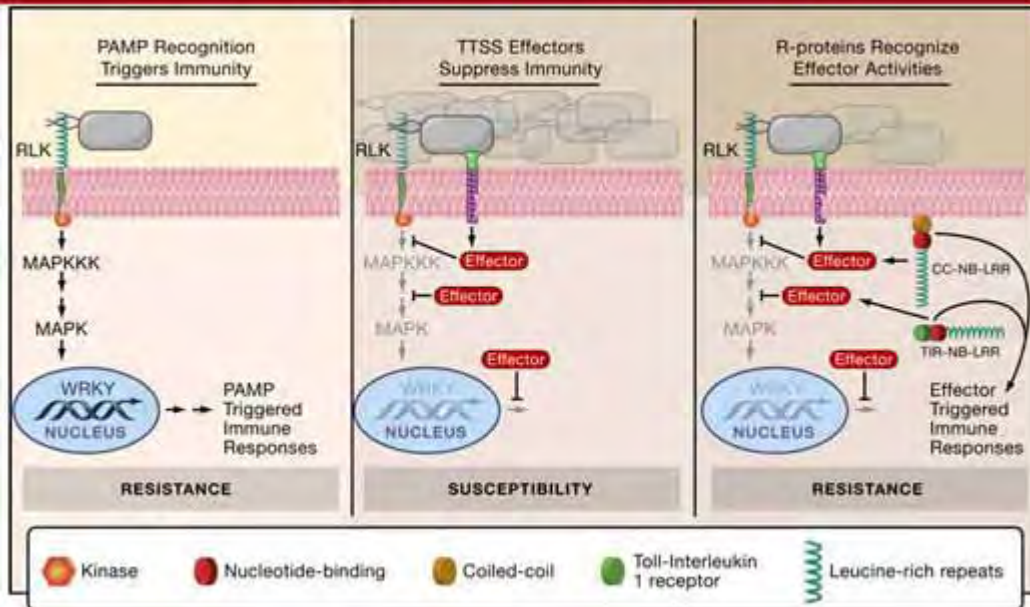


Figura 15 - Modelo proposto para a evolução da resistência bacteriana em plantas. Da esquerda para a direita, o reconhecimento de sinais moleculares associados aos agentes patogênicos (PAMPs) por receptores extracelulares do tipo quinase (RLKs) ativa o sistema de defesa basal que requer proteínas MAP (*Mitogen-Activated Protein*) quinases para a transdução de sinais e fatores de transcrição do tipo WRKY para a reprogramação transcricional. Bactérias patogênicas utilizam o sistema de secreção do tipo III (TTSS) para a exportação de proteínas efetoras para o interior da célula vegetal, modificando os sinais celulares em benefício da bactéria e suprimindo os mecanismos basais de defesa, permitindo uma acumulação significativa de bactérias no apoplasto da planta. Proteínas de resistência da planta (representada pela CC-NB-LRR e TIR-NB-LRR, ver item 8.1.2) reconhecem proteínas efetoras e inibem a sua atividade, restaurando a resistência da planta e a acumulação limitada de bactérias nos espaços extracelulares da célula vegetal. Fonte: adaptado de Chisholm *et al.* (2006).

8.1.4. Modelos de reconhecimento

Existem diferentes hipóteses para explicar os mecanismos moleculares de reconhecimento entre planta e patógeno. A seguir serão apresentados os dois principais modelos (Figura 16).

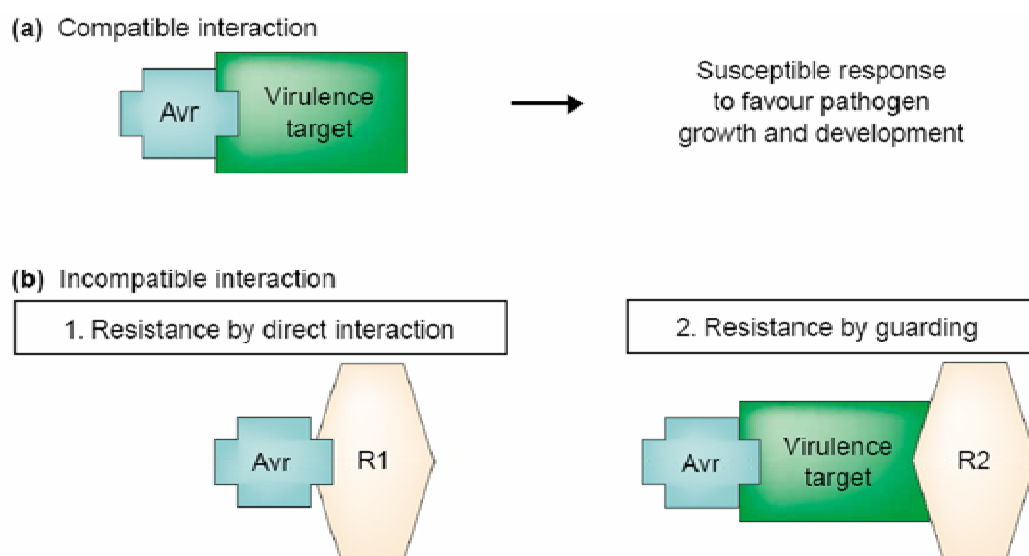


Figura 16 - Mecanismos de reconhecimento planta-patógeno. (a) Interação compatível: a proteína Avr pode se ligar a uma determinada proteína, na ausência de genes *R*, induzindo a virulência do agente patogênico e a sensibilidade da planta hospedeira. (b) Interação incompatível: na presença da proteína *R*, o reconhecimento se dá de forma direta entre proteínas *R* e Avr, ou de forma indireta. Neste caso, proteínas Avr interagem e ou modificam proteínas alvos no hospedeiro, e este complexo é reconhecido por proteínas *R*. Fonte: adaptado de Hammond-Kosack & Parker (2003).

8.1.4.1. Reconhecimento direto (Avr-R)

O primeiro modelo de reconhecimento proposto é do tipo ligante-receptor, que corresponde a uma interação direta entre as proteínas Avr e R (Figura 16b1) (Flor, 1955; Keen, 1982). O modelo ligante-receptor foi proposto para explicar a interação “gene a gene”. Neste modelo, o gene *Avr* é responsável pela produção de um elicitor (molécula que desencadeia os mecanismos de defesa na planta) que interage com um receptor específico, o produto do gene de resistência. A formação deste complexo induz um sinal cuja transmissão conduz a resistência.

Este tipo de interação foi observado em quatro casos. Um deles foi constatado na interação *Arabidopsis/Ralstonia solanacearum*, onde a bactéria possui um gene *Avr* que codifica uma cisteína-protease (PopP2) que é reconhecida diretamente pela proteína RRS1-R, uma proteína R que possui um domínio TIR-NB-LRR associado a um motivo WRKY, característico dos fatores de transcrição presentes nas plantas (Deslandes *et al.*, 2003). Na interação linho/*M. lini*, um reconhecimento direto ocorre entre as proteínas polimórficas *AvrL567* do fungo e cada um dos produtos dos três alelos do gene *L* (Dodds *et al.*, 2004). Os genes *L* codificam proteínas receptoras intracelulares da classe NB-LRR (Dodds *et al.*, 2004). Do mesmo modo, na interação entre o tomate e a bactéria *Pseudomonas syringae* observa-se uma interação direta entre proteínas R (Pto) e Avr (*AvrPto* e *AvrPtoB*) (Balmuth & Rathjen, 2007). O gene *Pto* codifica uma proteína do tipo serina-treonina quinase, enquanto que os genes *AvrPto* e *AvrPtoB* codificam proteínas de função desconhecida (Shan *et al.*, 2000). Por último, na interação arroz/*Magnaporthe oryzae*, o produto do fator de avirulência *AvrPita* do fungo, uma metaloprotease que possui um peptídeo sinal de exportação na posição N-terminal, é reconhecido diretamente por uma proteína citoplasmática do tipo NB-LRD codificada pelo gene *R Pi-ta* do arroz (Jia, 2007).

8.1.4.2. Reconhecimento indireto (Avr-X-R)

O segundo modelo de reconhecimento proposto é chamado “modelo de guarda” (Figura 16b2) (Dangl & Jones, 2001). Neste tipo de interação, proteínas Avr interagem e ou modificam proteínas alvos no hospedeiro, e este complexo é reconhecido por proteínas R, que estão “de guarda”. Como resultado, os mecanismos de resposta de hipersensibilidade são desencadeados (Dangl & Jones, 2001). As proteínas alvo podem estar envolvidas em processos fisiológicos importantes, e a modificação causada pela proteína Avr pode suprimir o mecanismo de defesa basal do hospedeiro criando um ambiente favorável para o patógeno. Esses alvos também podem incluir, por exemplo, componentes de defesa ou proteínas da planta que podem ter suas funções modificadas a fim de nutrir o meio extracelular da colônia bacteriana (Dangl & Jones, 2001; Xia, 2004).

Este tipo de reconhecimento ocorre na interação entre os genes *R* de *Arabidopsis* *RPM1* (Resistência contra *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* 1) e *RPS2* (Resistência contra *P. syringae* 2) que “guardam” a proteína RIN4 (*RPM1-interacting protein 4*), alvo dos fatores de avirulência AvrRpm1, AvrB e AvrRpt2 da bactéria (Mackey *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2003). *RPM1* é uma proteína de resistência do tipo NB-LRR que pode ser ativada pelos fatores de avirulência AvrRpm1 e AvrB de *P. syringae*. *RPS2* também é uma proteína do tipo NB-LRR que é ativada pela atividade proteolítica de AvrRpt2. É sabido que o gene *RIN4* controla negativamente a expressão dos genes *RPM1* e *RPS2* (Belkhadir *et al.*, 2004). Assim, quando os fatores de avirulência AvrRpm1 e/ou AvrB da bactéria estão presentes na célula hospedeira, estes induzem a fosforilação de RIN4, o que permite a ativação (ou a desinibição) de *RPM1*, desencadeando os mecanismos de defesa da planta. Já o fator AvrRpt2 cliva a proteína RIN4, o que induz a ativação de *RPS2* e conduz à reação de hipersensibilidade. Na ausência de *RPS2*, AvrRpt2 cliva RIN4 e outros substratos, desempenhando o papel de fator de virulência (Jones & Dangl, 2006).

Kjemtrup e colaboradores (2000) mostraram que a maior parte das proteínas Avr são fatores de virulência requeridos para desenvolver a doença quando a planta não possui os receptores necessários para o reconhecimento específico do agente patogênico. Assim, a presença de genes *R* nas plantas pode ter evoluído de modo a identificar a função dos fatores de virulência dos parasitas. Consequentemente, no “modelo de guarda”, as proteínas R não evoluíram para reconhecer especificamente as proteínas Avr, mas para detectar a ação destes fatores de virulência, que alteram ou perturbam alvos na célula vegetal. As proteínas R teriam, por conseguinte, um papel na homeostase celular (Dangl & Jones, 2001).

A grande implicação desse novo modelo frente às estratégias de obtenção de plantas transgênicas resistentes aos agentes patogênicos é que a transferência de genes *R* entre espécies pode não ser suficiente se os respectivos alvos dos genes *Avr* não estiverem também presentes (Camillo, 2006). Portanto, a transferência de genes *R* entre espécies relacionadas pode ser mais realística; por exemplo, genes *R* de tabaco podem funcionar em tomate, mas não em *Arabidopsis* ou arroz (Marathe & Dinesh-Kumar, 2003).

8.2. Processo de transdução de sinal

A transdução de sinal ocorre nos primeiros momentos após o reconhecimento específico do patógeno pela planta (De Torres-Zabala *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007; Tameling & Takken, 2007). Uma vez iniciada, observa-se um fluxo de íons, a produção de espécies reativas de oxigênio e a ativação da via de transdução de sinais, conduzindo à morte celular localizada e a ativação de genes de defesa (Heath, 1998; Heath, 2000b; Nürnberger *et al.*, 2004). A morte celular localizada é um processo que limita o agente patogênico no local da infecção, e a ativação de genes de defesa na zona infectada constitui-se em um sinal de alerta que é emitido para a planta inteira. Assim, a eliminação das células em contacto com o agente patogênico permite à planta proteger-se contra o agressor, criando uma

barreira física que limita o acesso aos recursos nutritivos necessários para o desenvolvimento do patógeno (Greenberg & Yao, 2004). Os sinais transmitidos permitem uma resposta mais eficaz perante uma nova agressão, potencializando os meios de defesa da planta ou ativando mecanismos de defesa preventivos (Heath, 2000b).

8.3. Mecanismos de resistência

As plantas são capazes de reconhecer os patógenos e induzir os mecanismos de resistência. Essa resistência induzida envolve, dentre outros fatores, a construção de barreiras histológicas para evitar a entrada ou progressão dos patógenos, principalmente reforçando a parede celular das células. Além disso, barreiras químicas na forma de moléculas antimicrobianas são sintetizadas *de novo*, incluindo proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PRs, *Pathogenesis-Related proteins*) e fitoalexinas (metabólitos secundários - como derivados fenólicos). A resistência basal das plantas também pode ser aumentada pela imunização temporária das plantas a uma subsequente infecção patogênica, a qual pode ser expressa localmente ou de maneira sistêmica em tecidos não afetados das plantas (Bonato, 2007).

Os mecanismos de resistência relacionados com a interação incompatível envolvem dois processos: resposta de hipersensibilidade (HR, *Hypersensitive Response*) e resistência sistêmica adquirida (SAR - *Systemic Acquired Resistance*). (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

8.3.1. Resposta de hipersensibilidade

A resistência ativa das plantas aos agentes patogênicos do tipo ETI (imunidade desencadeada por efetores - *Effector-Triggered Immunity*) traduz-se em uma reação de hipersensibilidade (HR). A HR é associada a dois processos: (1) morte celular programada rápida e localizada, que permite limitar o agente patogênico no local da infecção; e (2) ativação de

genes de defesa na zona infectada e, posteriormente, na planta inteira. A eliminação das células em contato com o agente infeccioso pode se constituir em um processo eficaz para a contenção de patógenos biotróficos, que necessitam de células vivas para obtenção de nutrientes durante seu desenvolvimento (Pascholati & Leite, 1995; Greenberg & Yao, 2004; Zeier, 2005). Mesmo no caso de organismos necrotróficos, a morte celular pode ser nociva ao patógeno, pois o colapso da célula vegetal acarreta a liberação de compostos pré-formados que são estocados no vacúolo e são tóxicos a estes microrganismos (Hammond-Kosack & Jones, 1996). A geração dos sinais que serão transmitidos à planta permitirá uma resposta mais eficaz perante uma nova agressão, potencializando os meios de defesa da planta ou ativando os mecanismos de defesa preventivos (Heath, 2000b).

A HR é observada quando o agente patogênico é reconhecido de forma específica, e precocemente, pela planta (Tameling & Takken, 2007). Após o reconhecimento específico do parasita, numerosos componentes da cascata de sinalização são ativados, ocorrendo, assim, uma reprogramação transcricional das células vegetais (Figura 17) (de Torres-Zabala *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007). Entre os acontecimentos celulares que evidenciam a HR é possível citar a modificação dos fluxos iônicos, a produção de formas reativas de oxigênio (ROS), a ativação do sistema de transdução de sinais para conduzir à morte celular e a ativação de genes de defesa (Schaller & Oecking, 1999; Heath, 2000b; Kaloshian, 2004; Liu Y. *et al.*, 2007; Maffei *et al.*, 2007; Stange *et al.*, 2008). Estes acontecimentos fisiológicos contribuem para a ativação transcricional de vários genes que intervêm não só na morte celular, mas também no sistema de defesa básico da planta. Muitos dos produtos formados controlam a produção de compostos antimicrobianos e contribuem para o reforço das barreiras naturais de defesa da planta (Jones & Dangl, 2006). Contudo, mesmo que a HR seja eficiente contra um grande número de agressores, este mecanismo de defesa pode, em certos casos, ser menos eficaz. A morte das células durante a infestação por um agente patogênico necrotrófico pode facilitar o desenvolvimento da doença (Govrin & Levine, 2000). Segundo Glazebrook (2005), nas interações envolvendo

patógenos hemibiotróficos ou necrotróficos, o papel da HR ainda não está totalmente esclarecido, visto que estes patógenos podem obter nutrientes a partir de células mortas.

Morfologicamente, a HR é reconhecida como uma clorose localizada que aparece aproximadamente 24 horas após a infecção, progredindo para uma lesão necrótica. Durante a reação de hipersensibilidade, alguns genes são ativados, havendo o estabelecimento de um meio altamente antimicrobiano ao redor de células infectadas (Sticher *et al.*, 1997; Hammerschmidt *et al.*, 2001).

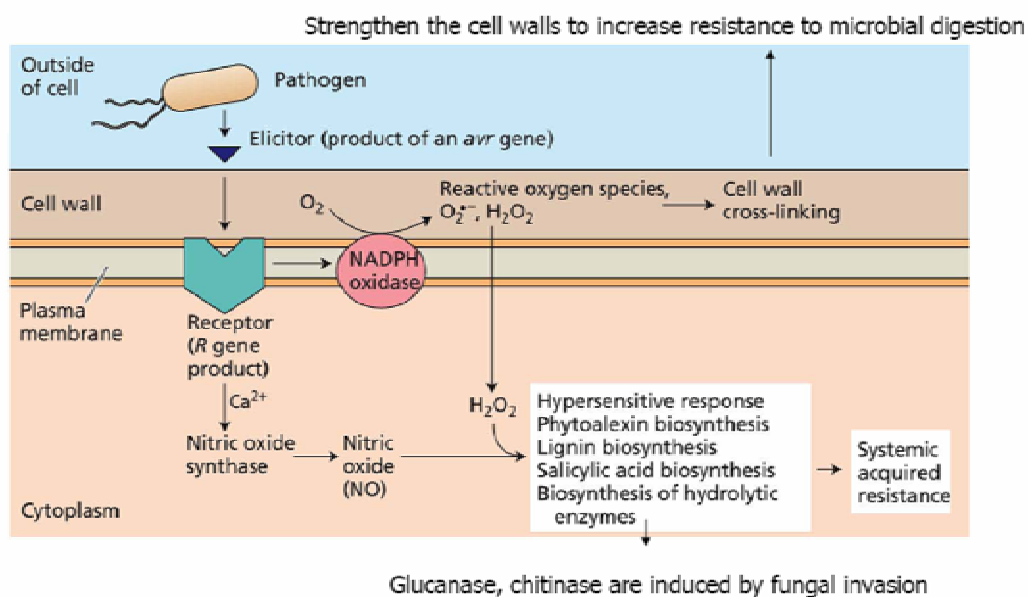


Figura 17 - Mecanismos de defesa da planta induzidos mediante infecção por agentes patogênicos. Moléculas elicitoras do patógeno (proteínas Avr) são reconhecidas por receptores específicos (proteínas R) da planta e uma complexa cascata de transdução de sinais é ativada, culminando no acionamento transcricional de genes de defesa. Fonte: Taiz & Zeiger (2006).

A HR está associada a alterações estruturais que podem reter compostos antimicrobianos como fenóis e fitoalexinas no local da infecção. Uma marca histoquímica de lesões necróticas associadas com a resistência vegetal é a presença de material autofluorescente (Poiatti, 2007). A autofluorescência resulta da biossíntese de compostos fenólicos solúveis como as fitoalexinas, e de compostos ligados à parede celular que são responsáveis pelo seu reforço através da suberificação e lignificação (Snyder & Nicholson, 1990; Herbers *et al.*, 1996).

Genes de defesa contra diferentes patógenos têm sido associados com a HR, incluindo os genes envolvidos na produção de proteínas relacionadas com a patogênese (PR) (Snyder & Nicholson, 1990). A HR também é relacionada com o aumento da atividade de várias enzimas, tais como: lipoxigenases (LOX), fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidases (POD) e polifenoloxidases (PPOs) (Guzzo, 2004).

Existem estudos relacionando genes envolvidos no mecanismo de morte celular programada e na HR, como por exemplo, os genes *acd1* e *acd2* (*accelerated cell death*) (Greenberg & Ausubel, 1993; Greenberg, *et al.*, 1994). O mecanismo de morte celular programada ocorre em diferentes processos, como durante o desenvolvimento, a senescência ou na manifestação da HR. Os mecanismos regulatórios deste processo não são totalmente conhecidos, mas a peroxidação lipídica, o acúmulo de oxigênio ativo e o influxo citoplasmático de cálcio, parecem estar presentes nas etapas iniciais deste processo. A degradação do DNA é também uma característica marcante. Diferentes modelos, como mutantes que produzem lesões espontâneas similares à HR, vêm sendo estudados na tentativa de melhor compreender este processo (Wang *et al.*, 1996; Levine *et al.*, 1996). Além dos mutantes *acd*, também foram caracterizados genes chamados de *lsd* (*lesion simulating disease resistance*). Existem pelo menos quatro *loci* gênicos para este gene; e seis tipos de mutantes já foram estudados. A produção de lesões espontâneas do tipo HR também é observada nestes mutantes (Dietrich *et al.*, 1994).

De acordo com Romeiro (2001), foi observado que isolados fitopatogênicos, independentemente do gênero a que pertençam, costumam incitar a HR em algumas plantas não-hospedeiras. Certas plantas, como o fumo, exibem facilmente resposta hipersensível a fitobactérias incompatíveis, sendo universalmente usadas para o teste de HR. A ocorrência de HR confirma a patogenicidade uma vez que bactérias saprófitas não levam a essa resposta.

Análises em larga escala da expressão gênica (*microarrays*) indicam que os genes de defesa são ativados mais rapidamente, e em níveis mais altos, em interações incompatíveis se comparada com interações compatíveis (Kaloshian, 2004).

8.3.2. Resistência sistêmica adquirida

Após o reconhecimento genético entre a planta e o patógeno, e a subsequente ativação do processo de transdução de sinal que culmina em morte celular programada rápida e localizada e na ativação de genes de resistência da planta, observa-se a indução da resistência de longa duração e de amplo espectro contra infecções subsequentes, seja no local da infecção ou nas partes das plantas não infectadas (Yu *et al.*, 1997; Navarre & Mayo, 2004). Esta resposta de resistência induzida a doenças é conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR - *Systemic Acquired Resistance*) (Ross, 1961). Desta forma, se ocorrer uma nova infecção, a planta responderá rapidamente através de alterações físicas na parede celular, como lignificação ou formação de papilas e ainda, na acumulação de proteínas relacionadas com a patogênese (PRs) (Nürnbergger *et al.*, 2004; Bonato, 2007).

O termo SAR foi inicialmente proposto em função da resposta induzida após a necrose local causada pela infecção dependente do composto fenólico ácido salicílico (AS) (Mauch-Mani & Métraux, 1998). Mais tarde, observou-se que agentes não-patogênicos, como por exemplo rizobactérias do solo, também podem ativar os mecanismos sistêmicos de

defesa em plantas (Lynch & Whipps, 1991). Esta forma de resistência independente do AS é denominada resistência sistêmica induzida (ISR - *Induced Systemic Resistance*) para distinguir da SAR (Figura 18) (Pieterse *et al.*, 1998; Pieterse & Van Loon, 1999; Pieterse *et al.*, 2003; Hossain *et al.*, 2007). Assim, ISR é proposto como um termo genérico, e SAR utilizado nas respostas sistêmicas induzidas por patógenos mediadas por AS (Bonato, 2007).

Estudos mostram que o AS induz os mecanismos de defesa quando a planta é atacada por patógenos biotróficos, como a *P. syringae*. Entretanto, patógenos necrotróficos, como *Alternaria brassicicola* e insetos herbívoros, induzem os mecanismos de defesa via ácido jasmônico (JA) (McDowell & Dangl, 2000; Thomma *et al.*, 2001; Glazebrook, 2005; Spoel *et al.*, 2007). Estes dados são corroborados por experimentos usando plantas mutantes que não apresentam habilidade de acumular um destes compostos, ou então mutantes que os superacumulam. Alguns exemplos destes mutantes são: *non immunity 1 (nim1)*, não responde à presença de AS); *suppressor of SA insensitivity (ssi)*; *SA-insensitive 1 (sai1)*; *constitutive expressor of PR proteins (cep1)*, superexpressa SA); *SA-induction deficient 2 (sid2)*; *fatty acid desaturase (fad3-2, fad7-2, fad8)*, JA deficiente); *JA-insensitive 1 (jar1)*; *coronatine insensitive 1 (coi1)*; *enhanced disease susceptibility 16 (eds 16)*; *ET-insensitive 2 (ein 2)*; *non-race specific disease resistance (ndr)* e *phytoalexin deficient (pad)* (Dong, 1998; Devadas *et al.*, 2002; Shah, 2003; Ryu *et al.*, 2003; Cipollini *et al.*, 2004).

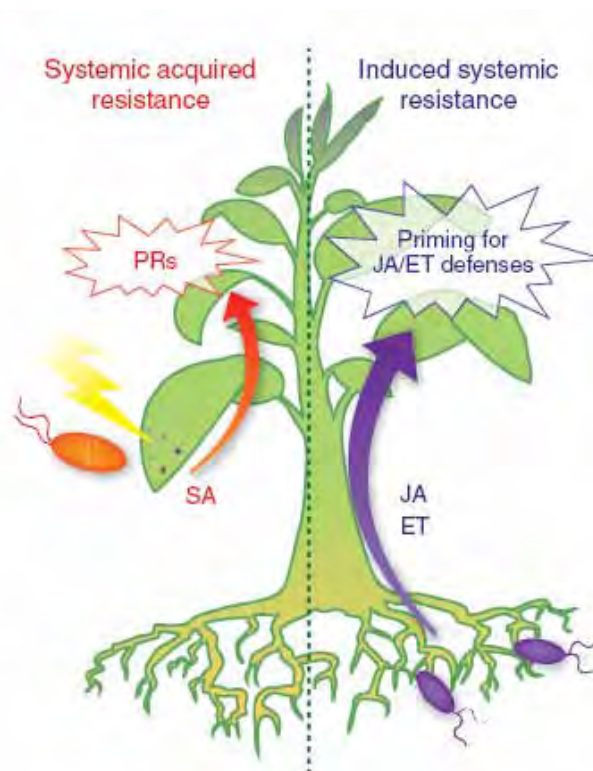


Figura 18 - Esquema representando tipos de respostas de defesa sistêmica induzida por microorganismos em plantas. SAR (*Systemic Acquired Resistance*) é ativada em tecidos saudáveis da planta a partir do local infectado. Após a infecção, sinais móveis são emitidos através do sistema vascular para ativar respostas de defesa nos tecidos sadios, distantes do local infectado. Neste processo, o ácido salicílico (AS) é a molécula chave para o desenvolvimento da SAR, uma vez que esta molécula é requerida para a ativação de vários genes, como por exemplo, genes codificadores de proteínas relacionadas com a patogênese (PRs - *Pathogenesis-Related proteins*), que apresentam atividade antimicrobiana. ISR (*Induced Systemic Resistance*) é ativada mediante colonização das raízes por microorganismos benéficos (não-patogênicos). Como na SAR, sinais são enviados à longa distância através do sistema vascular para ativar o sistema de defesa na parte aérea do vegetal. ISR é dependente das vias biossintéticas do ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), e não está associada com a ativação direta de genes PRs. Neste mecanismo, plantas expressando ISR estão “em alerta” e a defesa fica evidente somente após o ataque por patógenos. Fonte: Pieterse *et al.* (2009).

8.3.2.1. O ácido salicílico

De acordo com Dempsey *et al.* (1999), o AS é um fitohormônio que participa da ativação e potencialização de compostos secundários envolvidos no mecanismo de defesa das plantas. O AS é sintetizado a partir da conversão do ácido benzóico, formado a partir do ácido *trans*-cinâmico, pela enzima ácido benzóico-2-hidroxilase (BA2H), principalmente (Horváth *et al.*, 2007). Este é um dos primeiros compostos formados na via de síntese dos fenilpropanóides (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

Segundo Summermatter *et al.* (1995), após a atividade oxidativa nas etapas iniciais da resposta de defesa das plantas (HR) há o início da síntese e acúmulo de ácido salicílico (AS), um dos compostos relacionados com a indução da SAR (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Mur *et al.*, 1996; Durrant & Dong, 2004; Van Loon *et al.*, 2006; Loake & Grant, 2007).

8.3.2.1.1. Modo de ação do ácido salicílico

Os modos de ativação e regulação do AS em plantas infectadas por agentes patogênicos ainda estão sendo estabelecidos. Foi sugerido que a ativação de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) está implicada no modo de ação do AS. De acordo com Van Loon *et al.* (2006), a produção ROS num tecido danificado acompanha a síntese de AS.

Foi observado que o AS é capaz de inibir a enzima catalase, que é responsável pela conversão do H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) em H₂O e O₂ (Chen *et al.*, 1993; Vernooij *et al.*, 1994; Conrath *et al.*, 1995). A inibição da catalase favorece o aumento da taxa de H₂O₂ citoplasmático. Como o H₂O₂ é formado durante o processo de HR, acredita-se que esta etapa seja crucial para a acumulação do AS e indução da resposta de defesa sistêmica das plantas (Vranová *et al.*, 2002).

Alguns elementos reguladores da via de sinalização do AS foram identificados. Estudos sugerem que para que ocorra a acumulação de AS é necessário a presença dos genes *EDS1* (*Enhanced Disease Susceptibility 1*), que contribui inicialmente, e *PAD4* (*PhytoAlexin Deficient 4*), recrutado por *EDS1* para maior acúmulo de AS (Shah, 2003). O gene *EDS5* (*Enhanced Disease Susceptibility 5*) é também necessário para a biossíntese de AS (Nawrath & Metraux, 1999). Este gene codifica uma proteína de transporte da família MATE (*Multidrug And Toxin Extrusion*) que pode estar implicada no transporte de componentes intermediários da via de sinalização do AS (Nawrath *et al.*, 2002). Em *Arabidopsis*, a mutação de *EDS5* bloqueou o acúmulo de AS e tornou as plantas mais sensíveis a infecção por agentes patogênicos (Wildermuth *et al.*, 2001). Além disso, a superexpressão do gene *EDS5* aumentou a resistência contra vários tipos de vírus em *Arabidopsis* (Ishihara *et al.*, 2008). De acordo com Nawrath *et al.* (2002), a expressão do gene *EDS5*, após a inoculação de um parasita, é positivamente regulada pela atividade dos genes *EDS1* e *PAD4*.

A proteína NPR1 (*Nonexpressor of PR genes*), também conhecida como NIM1 (*Non IMMunity 1*), de *A. thaliana* é um regulador positivo essencial para a expressão de proteínas PR e da SAR, ambos induzidos pelo AS (Weigel *et al.*, 2005). Antes da indução da SAR, NPR1 está presente no citoplasma sob forma oligomérica. Com a indução da SAR ocorre um aumento dos níveis endógenos de AS citossólico, o que altera o potencial de oxido-redução (Garreton *et al.*, 2002) e provoca a dissociação dos oligômeros de NPR1 para a forma monomérica (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). Os monômeros de NPR1 deslocam-se para o núcleo e interagem com fatores de transcrição do tipo TGA ativando a transcrição dos genes codificadores de proteínas PR-1 (ver Figura 1 do *Résumé Long*) (Kinkema *et al.*, 2000; Després *et al.*, 2003; Mou *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Dong, 2004; Kogel & Langen, 2005; Tada *et al.*, 2008).

A expressão do gene *PR-1* é frequentemente associada ao acúmulo de AS e a ativação da SAR (Anand *et al.*, 2008). Este gene é ativado pelo AS produzido endogenamente ou aplicado de forma exógena (Van Loon *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis*, a superexpressão de uma PR-1 básica de *Capsicum annuum* tornou as plantas mais resistentes a *P. syringae* e ao estresse oxidativo (Hong & Hwang, 2005; Hong & Hwang, 2006). Em plantas transgênicas de tabaco foi mostrado que a expressão constitutiva da isoforma PR-1a (forma ácida da proteína) aumenta ligeiramente a resistência contra os oomicetos *Peronospora tabacina* e *Phytophthora parasitica* var. *nicotinae* (Alexander *et al.*, 1993). Entretanto, a superexpressão desta proteína não permitiu reduzir a sensibilidade do tabaco ao *Tobacco mosaic virus* (TMV), o que sugere que estas proteínas não apresentam atividade antiviral (Linthorst *et al.*, 1989).

Recentemente foi evidenciado em arroz que o AS ativa o promotor do gene *PR-10* (Hwang *et al.*, 2008). Os autores mostraram que a supressão do motivo W-box presente neste promotor (conhecido como sítio de ligação dos fatores de transcrição do tipo WRKY) anula a síntese de proteínas PR-10 após aplicação de AS. Este resultado sugere que os fatores de transcrição são aliados do AS e desempenham um papel chave na ativação das proteínas PRs.

8.3.2.2. Sinalização na SAR

O AS tem sido proposto como a molécula sinalizadora da SAR devido ao aumento considerável da sua concentração após a infecção por um agente patogênico. O nível endógeno de AS aumenta, tanto localmente quanto sistemicamente, em plantas de fumo inoculadas com o TMV, o que é consistente com o seu papel ativador da SAR (Yu *et al.*, 1997; Siegrist *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 2003). O papel mediador do AS foi bem evidenciado em *Arabidopsis*, fumo e pepino, mas pouco se sabe sobre o seu papel em plantas que possuem altos níveis basais deste sinalizador, como na batata e no arroz. Sugere-se que, embora a planta de batata apresente altos níveis

constitutivos de AS, alterações nos níveis de AS livre podem tornar os tecidos responsivos a este sinalizador (Landgraf *et al.*, 2002; Navarre & Mayo, 2004).

Estudos baseados em moléculas de AS marcadas revelaram que mais de 60% do AS medido nas zonas não infectadas da planta provinham do transporte de AS inicialmente sintetizado nas zonas infectadas (Shulaev *et al.*, 1995). Entretanto, o AS não é o único sinal móvel da SAR (Vernooij *et al.*, 1994). Os grupos de Shulaev (1997) e Seskar (1998) propuseram a hipótese de que o metil salicilato (MeAS), um composto volátil, também pode induzir a SAR por via aérea ou por transporte pelo floema. Esta hipótese foi recentemente confirmada por Park *et al.* (2007). De acordo com estes autores, o MeAS é sintetizado a partir do AS pela enzima AS metil-transferase e mobilizado pelo floema de plantas de tabaco inoculadas com o TMV. A supressão da atividade da AS metil transferase bloqueia a SAR, a qual pode ser restaurada pela aplicação exógena de MeAS. Uma vez nos tecidos sistêmicos, o MeAS é convertido em AS pela α/β hidrolase SABP2 (*SA binding protein 2*). A supressão da atividade de SABP2 compromete não só a SAR como o aumento dos níveis de MeAS em folhas infetadas, floema e tecidos sistêmicos de tabaco (Park *et al.*, 2007). Estes sinais induzem a produção de proteínas PR em tecidos distante do ponto de infecção (Sels *et al.*, 2008; Parker, 2009; Jung *et al.*, 2009).

A evidência mais indicativa de que o AS é um sinal na SAR é proveniente de experimentos que fizeram uso de plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis* capazes de expressar constitutivamente o gene *NahG* (gene codificador da salicilato hidroxilase, enzima que catalisa a degradação do AS em catecol inativo em *Pseudomonas putida*) (Yasuda *et al.*, 2003). Essas plantas geneticamente modificadas não acumulam AS em resposta a infecção por patógenos e são incapazes de induzir a SAR (Gaffney *et al.*, 1993; Lawton *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1995). Consequentemente, pouca ou nenhuma expressão de genes *PRs* foi observada na ausência de indução de origem exógena. Contudo, foi encontrada uma quantidade significativa de proteínas PR-1 em plantas de *Solanum tuberosum* transformadas com o

gene *NahG*, independente de ocorrer indução por elicitores, sugerindo que esse processo pode estar relacionado com a presença de altos níveis basais de AS que ocorre nesta espécie (Jeun *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2001; Navarre & Mayo, 2004; Halim *et al.*, 2004; Block *et al.*, 2005; Halim *et al.*, 2007).

Os mutantes recessivos *sid1*, *sid2* e *pad4*, os quais não acumulam AS, são incapazes de desenvolver a SAR e não apresentam ativação de genes PR mediante infecção por patógenos (Gaffney *et al.*, 1993; Lawton *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998; Nawrath & Métraux, 1999).

Em experimentos realizados com plantas transgênicas, ou plantas mutantes de *Nicotiana tabacum* ou *Arabidopsis thaliana*, foi observado que a SAR é ativada por uma via de transdução de sinal dependente de AS e da proteína reguladora NPR1 (Pieterse *et al.*, 2001). Plantas deficientes no acúmulo de AS ou da proteína NPR1 são incapazes de desencadear a SAR e de ativar a síntese das proteínas PR associadas a essa resposta (Delaney *et al.*, 1995; Nawrath & Métraux, 1999).

Friedrich *et al.* (1996) relataram que a SAR também pode ser ativada por tratamentos exógenos com o ácido T-aminobutírico (BABA), o ácido salicílico (AS) e seus respectivos análogos funcionais como o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), o ácido *benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic S-methyl ester* (BTH), também conhecido como acibenzolar-S-metil (ASM), e o 2,2,2,2'-tetra-fluoroacetophenone (tetraFA) (Cao *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1995; Ryals *et al.*, 1996; Görlach *et al.*, 1996; Herbers *et al.*, 1996; Guzzo, 2004; Anand *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009).

Verificou-se que em *Arabidopsis* e no arroz, a aplicação exógena de AS é suficiente para estabelecer a defesa sistêmica na planta e ativar proteínas PRs, resultando em uma resistência contra vários parasitas (Dempsey *et al.*, 1999; Iwai *et al.*, 2007).

O AS e seus análogos ativos inibem especificamente a atividade da catalase. Como a catalase converte H₂O₂ a H₂O e O₂, a sua inibição resultaria em acúmulo de ROS que podem agir como mensageiros secundários na indução dos genes envolvidos na SAR. Consistente com

esta idéia, inibidores da catalase não relacionados com o AS, como o próprio H₂O₂, podem induzir a expressão dos genes relacionados com a SAR. Dessa maneira, a inibição da catalase deve ter efeitos diretos na redução do crescimento do patógeno (Ryals *et al.*, 1994).

Além disso, a SAR pode ser induzida por diferentes moléculas, como carboidratos, glicoproteínas, proteínas e lipídeos (Ricci *et al.*, 1993; Hahn *et al.*, 1996). Essas moléculas podem ser originadas de lipopolissacarídeos extracelulares de bactérias, glicoproteínas da parede celular de fungos patogênicos, carboidratos da parede celular de fungos não patogênicos e outros (Hahn & Albersheim, 1978; Koch *et al.*, 1998; Coventry & Dubery, 2001). Neste sentido, Wulff e Pascholati (1999) realizaram a purificação parcial e a caracterização bioquímica de um elicitor glicoprotéico presente na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, e capaz de induzir a síntese de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo.

Em *Solanum tuberosum*, a SAR pode ser induzida por componentes da parede celular das hifas do fungo *Phytophthora infestans*, como o oligopeptídeo Pep-13 (Halim *et al.*, 2004), ocorrendo o acúmulo de ROS local e sistêmico. Desta forma, o tratamento com o elicitor nos folíolos das folhas compostas da planta induziu a formação de ROS no local, em regiões subsistêmicas (isto é, em outros folíolos não tratados das mesmas folhas) e também de forma sistêmica (Park *et al.*, 1998; Vleeshouwers *et al.*, 2000).

De acordo com Poiatti (2007), nas interações com fitopatógenos incompatíveis, onde a planta resiste à agressão, o sistema de defesa vegetal é eficientemente ativado, conduzindo à resistência. Contudo, esse sistema é tardiamente ativado ou não ativado em interações compatíveis, causando a doença (Resende *et al.*, 2003). Desta forma, a inoculação de bactérias avirulentas da espécie *P. syringae* pv. *maculicola* nas folhas de *S. tuberosum*, levou ao desenvolvimento de necroses e ativação sistêmica de genes de defesa, com a redução dos sintomas da doença (Landgraf *et al.*, 2002). Em tecidos distantes do local de inoculação de folhas de *Arabidopsis* com o patógeno avirulento *Pseudomonas syringae*,

a SAR desenvolveu-se mais efetivamente nas folhas mais jovens e esta resposta foi associada com forte acúmulo do ácido salicílico (Zeier, 2005).

A indução ou o aumento da expressão dos genes relacionados ou marcadores da SAR, leva à codificação de proteínas com atividades diversas que agem em conjunto para restringir a invasão do patógeno (Van Loon & Van Strein, 1999). Entre essas proteínas estão aquelas relacionadas com a patogênese (PRs) e enzimas do metabolismo secundário vegetal (Fritig *et al.*, 1998). Segundo Hammerschmidt *et al.* (2001), a importância dessas proteínas está no fato de que algumas delas possuem uma intensa atividade antifúngica e antimicrobiana, sugerindo que as mesmas atuam na SAR. Em tabaco a SAR está ligada à ativação coordenada de pelo menos 16 genes, inclusive os que codificam proteínas PRs. A natureza do sinal que leva à ativação dos genes envolvidos na SAR ainda não está clara (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999). Estes genes constituem uma família gênica e codificam proteínas β -1,3-glucanases, quitinases em suas formas ácidas e básicas, e outras de função desconhecida (Ward *et al.*, 1991; Yalpani *et al.*, 1991; Willits & Ryals, 1998).

9. Regulação da expressão de proteínas PR

9.1. Genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese

As proteínas de defesa de plantas que são induzidas após infecções por agentes patogênicos são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (PR - *Pathogenesis Related*) (Van Loon *et al.*, 2006). Elas conferem resistência local e sistêmica em resposta a patógenos, após o reconhecimento dos elicitores por receptores da planta (Dixon & Harrison, 1990; Scherer, 2002).

Van Loon e Van Kammen, em 1970, identificaram pela primeira vez em folhas de tabaco (*Nicotiana glutinosa*) o aparecimento de PRs específicas expressas *de novo* após a reação hipersensível à infecção pelo *Tobacco mosaic virus* (TMV). A partir deste trabalho, proteínas PR foram

descritas em muitas plantas, tais como tomate (Benhamou *et al.*, 1991), batata (Schröder *et al.*, 1992), feijão (Dann *et al.*, 1996), pepino (Strobel *et al.*, 1996), cafeeiro (Guzzo & Martins, 1996), videira (Busam *et al.*, 1997), pimenta (Hwang *et al.*, 1997), melão (Buzi *et al.*, 2004) e citrus (Campos *et al.*, 2007). Descobriu-se também que podiam ser induzidas por vários microorganismos, e até mesmo por insetos e nematóides (Van Loon *et al.*, 2006). As proteínas PRs também são ativadas em resposta à estresses abióticos, como déficit hídrico e alterações de salinidade ou temperatura (Markovic-Housley *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2003; Van Loon *et al.*, 2006).

Localizadas no espaço intercelular, no vacúolo e/ou parede da célula vegetal, as proteínas PRs são encontradas em várias espécies de plantas mono e dicotiledôneas, pertencentes a pelo menos 13 diferentes famílias vegetais (Parent & Asselin, 1984; Cutt & Klessig, 1992; Van Loon *et al.*, 2006). Apresentam algumas características gerais como baixo peso molecular, estabilidade em meio ácido e resistência à proteases (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999; Pavin, 2005). A maioria possui um peptídeo-sinal na região N-terminal, responsável por sua translocação através da membrana do retículo endoplasmático para o vacúolo ou para o espaço intercelular (Bol *et al.*, 1990). Muitas apresentam atividade antimicrobiana comprovada ou podem ativar outras respostas de defesa em plantas (Kombrink & Hahlbrock, 1986; Roulin & Buchala, 1995).

As proteínas PR foram muito estudadas em tabaco, mas seu papel na resistência às agressões ainda não está totalmente claro. Em alguns casos, é difícil interpretar a falta de harmonia entre o surgimento da HR ou SAR e a síntese dessas proteínas. O tratamento de tabaco com glucanas da parede do fungo *Phytophthora megasperma*, por exemplo, pode induzir a SAR contra o TMV sem estimular a produção de PRs (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999). Por causa desse padrão pouco específico, tem sido sugerido que a indução de tais proteínas faz parte de alguma etapa comum a todas as respostas de defesa (Pavin, 2005).

9.1.1. Classificação

Originalmente descritas em folhas de tabaco submetidas à infecção por vírus, as proteínas PRs foram classificadas em cinco classes (PR-1 a PR-5) de acordo com suas propriedades sorológicas (Scherer, 2002; Campos *et al.*, 2007). As PRs geralmente apresentam duas subclasses: as PRs ácidas, que são secretadas para o espaço extracelular; e as PRs básicas, que são acumuladas nos vacúolos (Van Loon & Van Kammen, 1970; Stintzi *et al.*, 1993; Kitajima & Sato, 1999). Com o passar dos anos, vários grupos de proteínas PRs foram recomendados para inclusão nestas classes. Atualmente as PRs estão classificadas em 17 famílias distintas, baseando-se na similaridade das seqüências de aminoácidos, relação sorológica e/ou atividade enzimática ou função biológica (Tabela 3) (Van Loon *et al.*, 2006).

Tabela 3. Tipos de proteínas relacionadas à patogênese (PR).

FAMÍLIA	REPRESENTANTE	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
PR-1	PR-1a de tabaco	antifúngica	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-2	PR-2 de tabaco	β -1,3-glucanase	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-3	P, Q de tabaco	quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII	Van Loon, 1982
PR-4	"R" de tabaco	quitinase tipo I, II	Van Loon, 1982
PR-5	S de tabaco	taumatina	Van Loon, 1982
PR-6	inibidor I de tomate	inibidor de proteinase	Green & Ryan, 1972
PR-7	P ₆₉ de tomate	endoproteinase	Vera & Conejero, 1988
PR-8	quitinase de pepino	quitinase tipo III	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR-9	peroxidase formadora de lignina de tabaco	peroxidase	Lagrimini <i>et al.</i> , 1987
PR-10	"PR-1" de salsa	ribonuclease	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR-11	quitinase da "classe V" de tabaco	quitinase, tipo I	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR-12	Rs-AFP3 de rabanete	defensina	Terras <i>et al.</i> , 1992
PR-13	THI2.1 de <i>Arabidopsis</i>	tionina	Epple <i>et al.</i> , 1995
PR-14	LTP4 de cevada	proteína de transferência lipídica	García-Olmedo <i>et al.</i> , 1995
PR-15	germin-OxOa de cevada	oxalato-oxidase	Zhang <i>et al.</i> , 1995
PR-16	OxOLP de cevada	oxalato-oxidase-like	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR-17	PRp27 de tabaco	desconhecida	Okushima <i>et al.</i> , 2000

Atividade antimicrobiana direta tem sido demonstrada *in vitro* para membros de famílias de proteínas PRs que apresentam atividade hidrolítica na parede celular e toxicidade por contato (Campos *et al.*, 2007). Entretanto, segundo Van Loon *et al.* (2006), a atividade indireta destas proteínas pode estar relacionada com a sinalização de defesa em plantas. Existem pelo menos 10 famílias de proteínas PRs cujos membros apresentam atividade direta contra fungos patogênicos (famílias PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-8, PR-11, PR-12, PR-13 e PR-14). Entretanto, proteínas PR-1 e PR-5 também apresentam atividade direta especificamente contra oomicetos (Van Loon *et al.*, 2006). De acordo com Uknes *et al.* (1993a), proteínas da família PR-1 são fortemente induzidas no início da SAR em tabaco, entretanto, os mecanismos de ação destas proteínas permanecem desconhecidos (Campos *et al.*, 2007). Já em relação aos membros da família das proteínas PR-5, sabe-se que estão envolvidas na SAR e na resposta a vários tipos de estresses (Pavin, 2005). Sua ação está relacionada com permeabilidade de membrana, ligação e atividade hidrolítica de glucanas e apoptose (Melchers *et al.*, 1994; Abad *et al.*, 1996; Narasimhan *et al.*, 2001; Osmond *et al.*, 2001; Anzlovar & Dermastia, 2003; Van Loon *et al.*, 2006). Nesta família encontram-se a taumatina e a osmotina (Singh *et al.*, 1989), duas formas de PRs de tabaco induzidas após a infecção por vírus, o inibidor alfa-amilase de tripsina, e proteínas P21 e PWIR2 de soja e trigo, respectivamente (Rebmann *et al.*, 1991). Foi demonstrado que a superexpressão de proteínas PR-5 reduz a infecção provocada por vários agentes patogênicos em arroz, trigo, tabaco e cenoura (Van Loon *et al.*, 2006). Atividade hidrolítica de glucanas foi demonstrada em membros da família das proteínas PR-2 (Grover & Gowthaman, 2003); β -1,3-glucanases podem hidrolisar glucanas presentes na parede celular de fungos e oomicetos (Henrissat, 1991). Membros das famílias PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11 são endoquitinases (Simmons, 1994; Rohini & Rao, 2000) que podem hidrolisar quitinas da parede celular de fungos e insetos, mas membros da família das proteínas PR-8 também exibem atividade lisozima e antimicrobiana (Métraux *et al.*, 1988; Melchers *et al.*, 1994; Abad *et al.*, 1996;

García-Olmedo *et al.*, 1998). Proteínas das famílias PR-12, PR-13 e PR-14 são defensinas, tioninas e LTPs (*lipid-transfer proteins*) respectivamente (Terras *et al.*; 1992; Molina *et al.*, 1993; Epple *et al.*, 1995; García-Olmedo *et al.*, 1995). As defensinas, caracterizadas primeiramente em rabanete (Terras *et al.*, 1992), são proteínas de reconhecida atividade antifúngica. A Thi2.1, tionina de *A. thaliana*, isolada por Epple *et al.* (1995), é marcadamente induzida por patógenos e certos elicitores químicos, mas não por salicilatos (indutor comum de SAR), indicando que o gene correspondente possui uma rota de ativação, ao menos parcialmente, diferente das outras PRs. As LTPs são ativas *in vitro* contra uma série de bactérias e fungos; entretanto, o mecanismo de sua ação como PR ainda não é conhecido. Sugere-se que elas se introduzam na membrana celular do patógeno e a sua cavidade hidrofóbica central forme um poro, causando a saída de íons intracelulares, o que acarreta na morte do microrganismo (Selitrennikoff, 2001).

A proteção de plantas contra o ataque de nematóides e insetos herbívoros tem sido associada com membros da família de proteínas PR-6, as quais são inibidoras de proteinase (Ryan, 1990). Os inibidores de proteinase são capazes de inibir enzimas proteolíticas de origem microbiana e de insetos, sem que exerçam essa função sobre as proteínas da própria planta (Van Loon *et al.*, 2006). Como exemplos encontram-se as *cysteine protease inhibitors*, *serine protease inhibitors (serpins)*, *trypsin inhibitors*, *Kunitz Soybean Trypsin Inhibitors (STI) protease inhibitor*, *threonine protease inhibitors*, *aspartic protease inhibitors* e *metalloprotease inhibitors* [[http://en.wikipedia.org/wiki/Protease_inhibitor_\(biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Protease_inhibitor_(biology))]. As proteínas PR-7 são endoproteinases com atividade antifúngica (Vera & Conejero, 1988) que agem na dissolução da parede celular (Van Loon & Van Strien, 1999). Membros da família PR-10 são proteínas intracelulares de estrutura semelhante as ribonucleases e parecem ser as únicas proteínas PRs com atividade antiviral (Somssich *et al.*, 1986; Zhou *et al.*, 2002). Seus membros são descritos como os principais alérgenos de plantas, como Betv1 de *Betula verrucosa*, Mald I da maçã, ABR 17 e DRRG49-D do pêssigo, e Cora I da avelã (Breiteneder *et al.*, 1989; Breiteneder *et al.*, 1995). A família de

proteínas PR-9 compreende as peroxidases formadoras de lignina (Lagrimini *et al.*, 1987), que são fortemente ativadas após infecções. Estas isoenzimas catalisam a formação dos polímeros de lignina que depositados na parede celular das plantas constituem uma barreira física impermeável que serve como proteção nos casos de infecção (Lagrimini *et al.*, 1997). As proteínas PR-9 também apresentam uma atividade específica de peroxidases, atuando indiretamente contra os microorganismos, pois catalisam a insolubilização de proteínas e de compostos fenólicos que permitem o reforço da parede celular (Fritig *et al.*, 1998). As famílias de proteínas classificadas como PR-15 e PR-16 são germin oxalato-oxidases e oxalato-oxidases respectivamente, com atividade superóxido dismutase e induzidas mediante a infecção por agentes patogênicos. As oxalato-oxidases são enzimas que catalisam a degradação oxidativa do oxalato em carbonato e peróxido de hidrogênio (Lane *et al.*, 1993). Estas famílias de proteínas PRs parecem estar envolvidas no mecanismo de transdução de sinais para a regulação da HR, bem como os membros da família de proteínas PR-17. Esta última família de proteínas PR, classificada recentemente (Van Loon *et al.*, 2006), é caracterizada por apresentar um domínio ativo para zinco-metaloproteinases, sendo possivelmente enzimas proteolíticas. Os transcritos correspondentes são induzidos mediante ataque por patógenos e tem um padrão característico de acumulação de proteína (Zhang *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Okushima *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2002; Park C.J. *et al.*, 2004; Van Loon *et al.*, 2006).

9.2. Co-fator de transcrição NPR1

Usando genes *PR* como repórteres, duas classes de mutantes de *Arabidopsis thaliana* foram identificadas. Uma classe expressa genes *PR* constitutivamente, enquanto a outra não expressa genes *PR* depois da indução da SAR (Lawton *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1994; Bowling *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997; Bowling *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1998). O interessante foi que somente um loco

genético foi identificado na segunda classe. Esses mutantes receberam o nome de *npr1* (*nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*), *nim1* (*non-inducible immunity 1*) ou *sai1* (*salicylic acid-insensitive 1*) (Dong, 2004).

O gene *NPR1* codifica uma proteína com dois domínios de interação proteína-proteína (repetições do tipo ankirina e BTB/POZ - *broad complex, tramtrack, and bric à brac/poxviruses and zinc finger*) (Michaely & Bennet, 1992; Bork, 1993; Li *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1997; Aravind & Koonin, 1999; Becerra *et al.*, 2004; Rochon *et al.*, 2006) e um sinal de localização nuclear (NLS) (Figura 19) (Kinkema *et al.*, 2000). Segundo Cao *et al.* (1998), este gene é expresso constitutivamente, podendo aumentar até duas vezes os níveis do transcrito correspondente quando as plantas são tratadas com AS.



Figura 19 - Representação esquemática dos três domínios conservados que caracterizam as proteínas NPR1. BTB/POZ - *broad complex, tramtrack, and bric à brac/poxviruses and zinc finger*; ANK - repetições do tipo ankirina; e NLS - sinal de localização nuclear.

Em estudo conduzido por Mou *et al.* (2003), foram encontrados 10 resíduos de cisteína conservados nas seqüências de proteínas NPR1. Estes resíduos presentes principalmente dentro das repetições do tipo ankirina, estão relacionados à forma inativa da proteína NPR1, ou seja, na formação de oligômeros presentes no citoplasma. Resíduos de cisteína também estão presentes na região de sinalização nuclear. Assim, alterações do potencial redox celular causam a oxidação de pontes bissulfídricas presentes no domínio ankirina da proteína (liberando-as em monômeros) e

na região de sinalização nuclear, fazendo com que as proteínas entrem no núcleo (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). Mutações nestes resíduos conduzem a uma monomerização constitutiva destas proteínas seguida por uma translocação para o núcleo. Além dessas, outras alterações estruturais foram evidenciadas (Tada *et al.*, 2008). Já o domínio BTB/POZ está relacionado com a interação de NPR1 com outras proteínas (Bardwell & Treisman 1994; Cao *et al.*, 1997), principalmente com fatores de transcrição do tipo TGA (Rochon *et al.*, 2006).

O mapeamento do gene *NPR1* através do cruzamento entre o mutante *npr1-1/npr1-1* e a espécie selvagem *NPR1/NPR1*, tem ajudado na obtenção de informações a respeito da localização deste gene no genoma de *Arabidopsis* (Cao *et al.*, 1997). Estas análises revelaram que o gene *NPR1* localiza-se no cromossomo 1 (Cao *et al.*, 1997).

Proteínas *NPR1* têm sido consideradas um componente chave na expressão de genes *PR* regulados por AS. Entretanto, estas proteínas não se ligam diretamente ao DNA, conseqüentemente não ativam a expressão gênica. Plantas mutantes *npr1-1* e *nim1-2* acumularam níveis normais de AS depois da infecção, mas diminuíram as suas habilidades de expressar genes *PR* (*PR-1*, *PR-2*, e *PR-5*) e de responder a SAR, indicando que *NPR1* age abaixo do AS na rota metabólica de SAR (Cao *et al.*, 1994).

De acordo com Liu G. *et al.* (2005), seis genes parálogos foram identificados em *Arabidopsis* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Estes genes foram denominados *NPR1*, *NPR2*, *NPR3*, *NPR4*, *blade-on-petiole 1* (*BOP1*) e *blade-on-petiole 2* (*BOP2*) (*Accession numbers* At1g64280 At4g26120, At5g45110, At4g19660, At3g57130 e At2g41370, respectivamente) (Hepworth *et al.*, 2005; Liu G. *et al.*, 2005). Estes seis genes *NPR1-like* de *Arabidopsis* controlam vários eventos metabólicos na planta. *NPR1*, *NPR2*, *NPR3* e *NPR4* estão envolvidos no mecanismo de defesa (Cao *et al.*, 1997; Liu G. *et al.*, 2005; Zhang Y. *et al.*, 2006). *BOP1* e *BOP2* são correlacionados com a morfogênese ou modulação da atividade meristemática (Ha *et al.*, 2004; Hepworth *et al.*, 2005). O gene *NPR1* também foi isolado e caracterizado em *Nicotiana tabacum* (Liu *et al.*, 2002;

Weigel *et al.*, 2005), *Brasica juncea* (mostarda-marrom) (Meur *et al.*, 2006), *Malus x domestica* (maçã) (Malnoy *et al.*, 2007), *Gossypium hirsutum* L. (algodão) (Zhang Y. *et al.*, 2008), em árvores da família Rosaceae (Pilotti *et al.*, 2008), em *Vitis vinifera* (uva) (Henanff *et al.*, 2009) e em *Glycine max* (soja) (Sandhu *et al.*, 2009).

Pouca informação encontra-se disponível a respeito do isolamento, expressão e função de proteínas NPR1 em monocotilidôneas, com exceção do arroz. Genes *NPR1-like* foram isolados em *Triticum aestivum* (trigo) (Wang *et al.*, 2001; Da Silva, 2006), *Zea mays* (milho) (Crane III *et al.*, 2003), *Sorghum bicolor* (sorgo) (Kogel & Langen, 2005), *Hordeum vulgare* (cevada) (Kogel & Langen, 2005) e em *Musa sp.* (banana) (Endah *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009). Em arroz, cinco genes *NPR1* homólogos foram identificados (*OsNPR1 homolog 1 - NH1*; *OsNPR2 - NH2*; *OsNPR3*; *OsNPR4* e *OsNPR5*) (Yuan *et al.*, 2007). Destes cinco genes *NPR1* de arroz, somente *OsNPR1*, *OsNPR2* e *OsNPR3* foram isolados, mas só *OsNPR1* foi bem caracterizado (Chern *et al.*, 2001; Chern *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007). De maneira similar a proteína NPR1 de *Arabidopsis*, NH1 de arroz apresenta resíduos de cisteína conservados nas posições 76 e 216, que são essenciais para a monomerização. Além disso, *OsNPR1* é induzido não somente após tratamento com patógenos de arroz (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Magnaporthe grisea*), mas também por aplicação exógena de AS, metil jasmonato (MeJA) e etileno (ET) (Yuan *et al.*, 2007). Contudo, plantas transgênicas de *Oryza sativa* expressando um gene *NPR1* de *Arabidopsis* apresentaram lesões análogas a morte celular (Fitzgerald *et al.*, 2004). Estas plantas são mais sensíveis à luz, resultando em um fenótipo anão (Chern *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que o gene *NPR1* “nativo” de arroz é mais funcional, nestas plantas, em comparação com o gene *NPR1* de *Arabidopsis*.

9.2.1. Expressão do gene *NPR1* durante os mecanismos de defesa

As proteínas NPR1 têm presença marcante em vários processos de defesa sistêmica, conferindo aumento nos níveis de resistência contra múltiplos patógenos e herbívoros (Cao *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 2006; Rayapuram & Baldwin, 2007; Yuan *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que NPR1 é um importante fator de regulação nas respostas de SAR dependentes de AS (Pieterse & Van Loon, 2004; Rochon *et al.*, 2006; Loake & Grant, 2007). Contudo, foram descobertas proteínas NPR1 cuja ativação é dependente de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (Figura 20) (Pieterse *et al.*, 1998; Van Wees *et al.*, 2000; Berroccal-Lobo & Molina, 2004; Pieterse *et al.*, 2005; Leon-Reyes *et al.*, 2009). Para investigar se NPR1 está envolvida na resposta de ISR independente de AS, plantas mutantes de *Arabidopsis* (*npr1*) foram utilizadas. De acordo com Pieterse *et al.* (1998), as plantas mutantes *npr1* foram bloqueadas em suas habilidades de expressar a ISR por *P. fluorescens* WCS417r, indicando que, como na SAR induzida por patógeno, a ISR por rizobactéria é dependente de resposta defensiva. A elucidação da seqüência dos eventos sinalizadores da ISR revelaram que NPR1 age abaixo do JA e ET na rota metabólica de ISR. Evidentemente, NPR1 não é a única proteína requerida para expressão de genes *PRs* dependentes de AS, que são ativados durante a SAR, como também não são os únicos responsáveis pela ativação de respostas de defesas dependente de JA e ET, resultando na ISR por rizobactéria. Estes dados sugerem que a proteína NPR1 é capaz de regular diferencialmente a expressão de genes de defesa, dependendo da rota metabólica que está sendo ativada. De acordo com Pieterse *et al.* (2009), a conexão entre as vias de sinalização permite que a planta tenha capacidade de se defender contra diferentes tipos de invasores. Segundo estes autores, o ET atua após a ação do JA. Sabe-se que o JA e o ET também induzem alguns tipos de genes relacionados com a patogenicidade (*PRs*), como, por exemplo, *PR-3*, *PR-4* e *PR-12* (*PDF1.2*) (Penninckx *et al.*, 1998), todos com atividade antifúngica (Van Loon *et al.*, 2006).

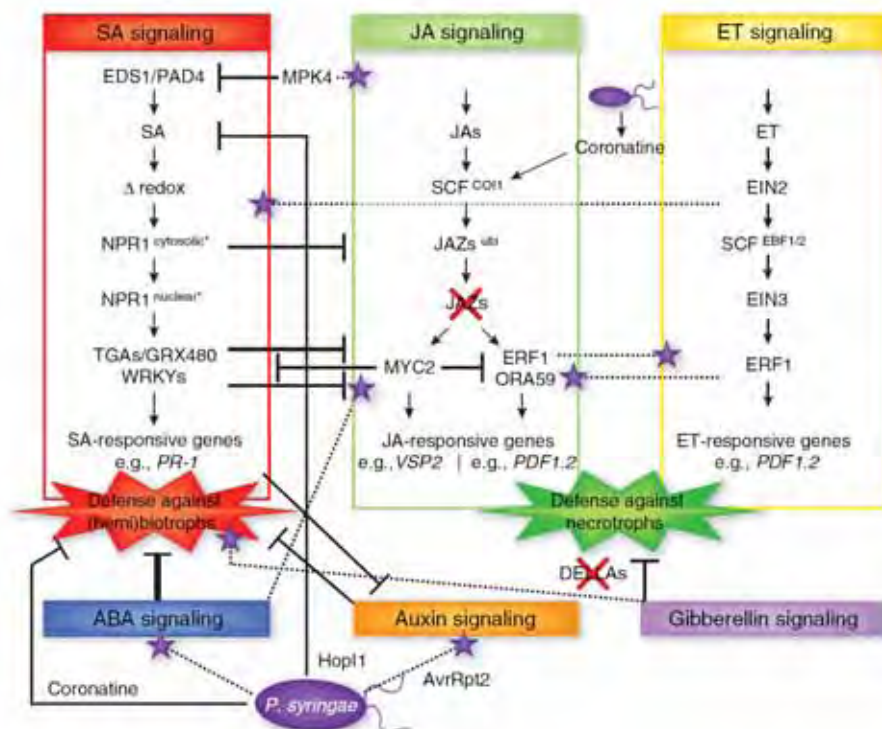


Figura 20 - Ação de fitohormônios nos mecanismos de defesa da planta e a participação de proteínas NPR1 neste processo. No decorrer da evolução, as plantas adquiriram uma sofisticada estratégia defensiva para “perceber” os ataques de patógenos e insetos, traduzindo essa percepção em uma resposta apropriada e de forma adaptativa. Os principais sinais de alarme de ataque são o ácido salicílico (AS), o jasmônico (JA) e o etileno (ET), sendo os demais fitohormônios (ABA, auxinas, giberelinas, citocininas e brassinosteróides) complementos da via central de defesa das plantas. A comunicação entre as diferentes rotas hormonais permite que a planta tenha um grande potencial de regulação para uma defesa refinada. Neste contexto, proteínas NPR1 atuam como moléculas moduladoras da comunicação entre as rotas de sinalização do AS e JA, e desse modo, ajuda a planta a “decidir” qual estratégia de defesa tomar, dependendo do tipo de invasor encontrado. Por outro lado, agentes patogênicos como *P. syringae* produzem proteínas efetoras (por exemplo, *coronatine*, Hop1 e AvrRpt2) que manipulam a rede de sinalização para suprimir a resposta imune do hospedeiro e promover a virulência. ⊥ efeito negativo; ☆ efeito positivo. Fonte: adaptado de Pieterse *et al.* (2009).

De acordo com Spoel *et al.* (2003), os genes de defesa induzidos por AS requerem a presença das proteínas NPR1 no núcleo, onde estas atuam como co-fatores de transcrição (Figura 20), enquanto que a expressão induzida por JA também requer proteínas NPR1, mas não a sua localização nuclear. Neste caso, as proteínas NPR1 teriam uma segunda função citossólica, permitindo a ativação e regulação dos genes de defesa via JA.

Em *Arabidopsis*, a resistência contra *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo & Molina, 2004) e *Verticillium longisporum* (Johansson *et al.*, 2006) depende dos fitohormônios JA e ET (ao invés do AS) e também da proteína NPR1 citossólica. Neste processo vários genes de defesa são ativados como o *PR-1*, *PR-2* e *PR-4* (Johansson *et al.*, 2006).

9.2.2. Interações entre proteínas NPR1 e fatores de transcrição

9.2.2.1. NPR1 e fatores de transcrição do tipo TGA

Fatores de transcrição da família TGA/OBF, que contém um domínio do tipo zíper de leucina (bZIP - *basic leucine zipper*), interagem com proteínas NPR1 para mediar as respostas de defesa (Zhou *et al.*, 2000; Kinkema *et al.*, 2000; Hammond-Kosak & Parker, 2003; Rochon *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis*, constituem uma pequena família multigênica com cerca de 10 membros (Ryals *et al.*, 1997; Dong, 2001). Estes fatores são capazes de reconhecer e se ligar em *cis*-elementos específicos, conhecidos como *activation sequence-1* (as-1), que apresentam a seqüência TGACG. Estes elementos estão presentes na região promotora da grande maioria de genes responsivos a estresses bióticos e abióticos (Zhang *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003). A habilidade destes fatores de transcrição em reconhecer e se ligar nestes *cis*-elementos, ativando a expressão de genes por eles regulados, é dependente de sua ligação com proteínas NPR1 monoméricas presentes no núcleo (Després *et al.*, 2000; Rochon *et al.*, 2006). A partir desta interação, o complexo protéico NPR1/TGA se liga em elementos *cis*-

regulatórios TGACG presentes na região promotora de genes *PRs*, por exemplo, ativando-os e desencadeando a SAR (Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Kinkema *et al.*, 2000; Subramaniam *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003; Dong, 2004).

Consistente com o papel de co-ativador de fatores de transcrição do tipo TGA, demonstrou-se que proteínas NPR1 interagem *in vitro* e *in vivo* com diferentes membros de fatores de transcrição da família TGA. Estas interações foram documentadas em *Arabidopsis*, tabaco, tomate, e arroz (Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Després *et al.*, 2000; Niggeweg *et al.*, 2000; Chern *et al.*, 2001; Subramaniam *et al.*, 2001; Fan & Dong, 2002). Este modo de ação foi demonstrado utilizando-se o fator de transcrição TGA2, que interage com o regulador negativo de genes *PRs* (*SN1*), suprimindo a expressão destes genes (Kesarwani *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que TGA2.1 de *O. sativa* tem ação negativa no mecanismo de defesa com contra bactérias patogênicas (Fitzgerald *et al.*, 2004). Evidências experimentais sugerem que a interação NPR1 com fatores TGA também é controlada pelo potencial redox celular (Després *et al.*, 2003; Pieterse & Van Loon, 2004; Rochon *et al.*, 2006) sendo tal interação essencial para a ativação de genes *PR* (Kesarwani *et al.*, 2007). Segundo Rochon *et al.* (2006), para ocorrer a interação entre fatores de transcrição do tipo TGA e a proteína NPR1 é necessária a presença de uma sequência *core* no domínio BTB/POZ da proteína NPR1 (resíduos 80 - 91) bem como a oxidação dos aminoácidos cisteína-521 e cisteína-529.

A regulação da expressão dos genes *PRs* por NPR1/TGA possivelmente envolve a proteína NIMIN1 (*NIM1-Interacting1*), que é capaz de interagir com NPR1/TGA no sistema triplo-híbrido (Weigel *et al.*, 2005). Neste caso, a superexpressão de *nimin1* em plantas de *Arabidopsis* resulta em redução da expressão de *PR-1*, *PR-2* e *PR-5*, e aumento na suscetibilidade a *P. syringae* pv. *maculicola*. Do mesmo modo, o silenciamento ou nocaute de *nimin1* resulta na hiperativação de *PR-1* após o tratamento com AS, demonstrando que *nimin1* é um regulador negativo da expressão dos genes *PR* (Weigel *et al.*, 2005).

9.2.2.2. NPR1 e fatores de transcrição do tipo WRKY

Embora haja evidências corroborando a interação entre proteínas NPR1 e fatores de transcrição do tipo TGA, domínios de ligação para estes fatores de transcrição são pouco representados em promotores de genes de defesa de *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2002). Segundo estes autores, o domínio TGACG *core* ocorre em 63% de regiões promotoras induzidas por patógenos, enquanto que o motivo *core* para fatores de transcrição do tipo WRKY (W-box) ocorre em 80%. Em promotores induzidos pelo frio, o domínio TGACG *core* ocorre 17% menos em relação ao motivo W-box (Chen *et al.*, 2002; Maleck *et al.*, 2000). Os W-boxes contêm o domínio (C/T)TGAC(T/C) *core* e são reconhecidos pela família de fatores de transcrição do tipo WRKY (Eulgem *et al.*, 2000). Existem aproximadamente 70 membros deste tipo de fator de transcrição em *Arabidopsis*, os quais apresentam um ou dois domínios WRKY conservados (Eulgem *et al.*, 2000). Estudos mostram que esta família de reguladores da transcrição também interage com proteínas NPR1 (Wang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2001). Por exemplo, WRKY 18 regula positivamente a SAR ativando a expressão de genes *NPR1-dependentes*. Outros membros desta família, como WRKY70 e WRKY58, agem como possíveis reguladores para prevenir um acúmulo excessivo de AS (Wang *et al.*, 2006). De acordo com Li *et al.* (2004), a superexpressão do fator de transcrição WRKY70 resulta na ativação constitutiva da SAR, e sua supressão traduz-se numa indução dos genes de resposta ao JA (ISR), de maneira dependente de *coronatine* (*COL1*). A superexpressão ou a supressão do gene *WRKY70* não é afetada pelos níveis endógenos destes hormônios, indicando que este gene pode ser um ponto de integração entre os sinais de defesa ativados pelo AS e pelo JA. Três motivos W-boxes foram relatados, através de análises *in silico*, na região promotora do gene *NPR1* de *Arabidopsis* (Yu *et al.*, 2001). De acordo com estes autores, estes motivos mostraram-se responsivos a proteínas WRKY induzidas por AS, sendo, conseqüentemente, essenciais para a expressão basal do gene *NPR1* bem como para a expressão do gene *PR-1*.

A expressão de pelo menos nove genes *WRKY*, *AtWRKY18*, -38, -53, -54, -58, -59, -62, -66, e -70, é dependente da proteína NPR1, sugerindo que estão sob o controle de fatores de transcrição do tipo TGA (Wang *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2007).

9.2.3. Proteínas NPR1 e a indução de genes *PRs*

Genes *PRs*, também chamados de genes responsivos à SAR, constituem uma família multigênica ativamente envolvida nos processos de defesa das plantas (Van Loon *et al.*, 2006). A maioria das proteínas *PRs* estudadas é expressa constitutivamente nas plantas em condições normais de desenvolvimento (Vidhyasekaran, 1997). Contudo, em condições de estresses bióticos ou abióticos, suas concentrações aumentam (Sagee & Dahan, 1994; Przymusinski *et al.*, 2004; Edreva, 2005; Kim S.T. *et al.*, 2008). Uma vez que a maioria destas proteínas apresenta atividade antimicrobiana, elas podem conferir proteção contra diferentes tipos de invasores, sejam estes fungos, bactérias ou vírus (Vidhyasekaran, 1997), bem como, em alguns casos, proteção contra insetos herbívoros (Van Loon *et al.*, 2006).

Várias moléculas (como, por exemplo, AS, JA e ET) podem induzir a expressão gênica para a produção de proteínas *PRs* (Edreva, 2005). A expressão de algumas proteínas *PRs* é regulada pelo gene *NPR1* através de sua interação com fatores de transcrição do tipo TGA ou *WRKY* (Vidhyasekaran, 1997; Zhou *et al.*, 2000; Loake & Grant, 2007; Kesarwani *et al.*, 2007).

Em *Arabidopsis*, a resistência contra *F. oxysporum* (Berrocal-Lobo & Molina, 2004) e *V. longisporum* é dependente de JA, ET, AS e NPR1 citossólica (Berrocal-Lobo & Molina, 2004; Johansson *et al.*, 2006) e estas moléculas ativam a expressão dos genes *PR-1*, *PR-2* e *PR-4*.

Em *Malus x domestica* (maçã) um gene *NPR1* (*MpNPR1*) foi isolado e caracterizado (Malnoy *et al.*, 2007). A superexpressão deste gene ativa a síntese das proteínas *PR-2*, *PR-5* e *PR-8*.

Em *Oryza sativa*, o gene *NH1*, homólogo de *NPR1*, regula positivamente a expressão do gene *PR-1* após tratamento com benzothiadiazole (BTH, análogo ao AS), MeJA, ET, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ou *Magnaporthe grisea* (Yuan *et al.*, 2007).

Essas observações indicam que as proteínas PR possuem um papel relevante na SAR em plantas, contribuindo, possivelmente, para o efeito protetor observado contra diferentes patógenos. Por outro lado, estudos conduzidos em *Arabidopsis* revelaram que determinadas estirpes da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* induzem resistência sistêmica nesta planta contra diferentes patógenos, ativando uma via sinalizadora independente de AS, mas dependente de JA e etileno (Leon-Reyes *et al.*, 2009). Curiosamente, a resistência induzida mediada por *P. fluorescens* é controlada, também, pelo fator regulador NPR1, embora seja independente da expressão de genes que codificam proteínas PR (Pieterse *et al.*, 2001).

9.2.4. Modo de ação de proteínas NPR1 durante a resposta de defesa

Em 1997, o primeiro gene *NPR1* foi isolado a partir de plantas de *Arabidopsis* (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997). Anos se passaram e o modo de ação deste gene, mediando os mecanismos de defesa, ainda era desconhecido devido à inabilidade da proteína codificada em se ligar diretamente ao DNA (Dong, 2004). Foi especulado que o gene *NPR1* poderia ser um fator de transcrição devido à presença do domínio ankirina, o qual permite interações entre proteínas (Zhou *et al.*, 2000). A partir da descoberta de fatores de transcrição que se ligam a seqüências TGA *core* no DNA (Zhou *et al.*, 2000), um modelo de sinalização mediado por proteínas NPR1 foi proposto (Figura 21).

Em condições normais, *NPR1* é expresso constitutivamente e em baixos níveis (Dong, 2004). Estas proteínas ficam inativadas, na forma de oligômeros, no citoplasma (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003).

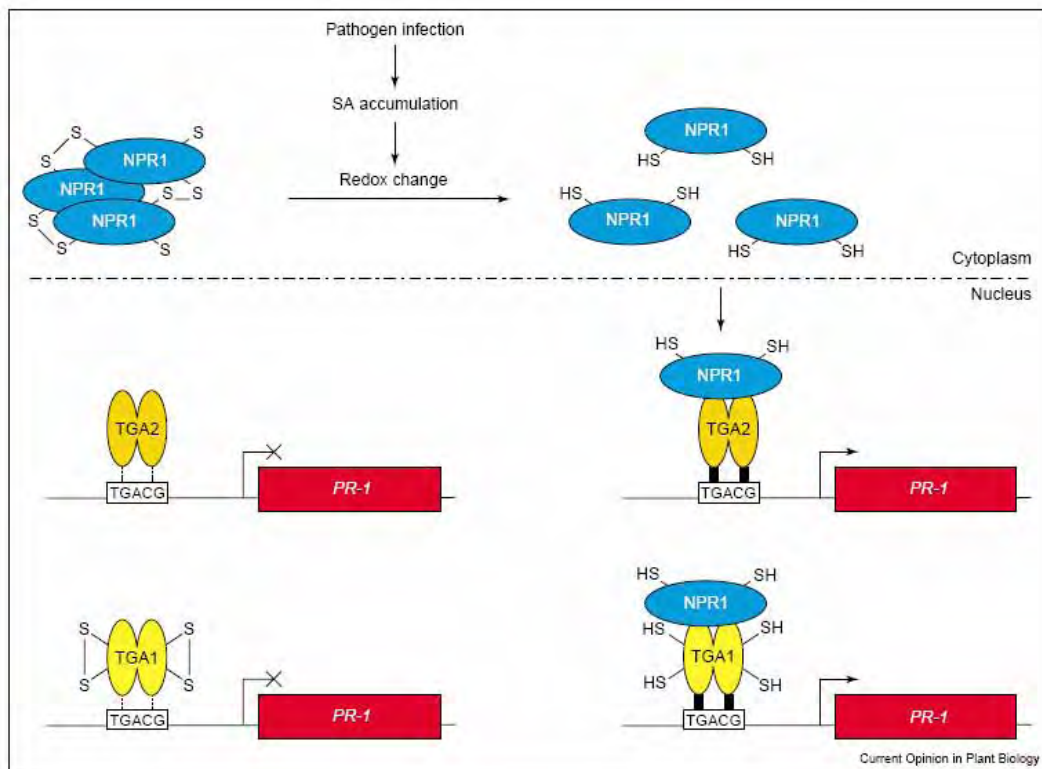


Figura 21 - Modo de ação simplificado de proteínas NPR1 durante a resposta de defesa. Após o reconhecimento do patógeno pela planta ocorre aumento das concentrações citosólicas de AS, causando uma alteração no potencial redox celular. Esta alteração promove a dissociação de pontes bissulfídricas entre os oligômeros da proteína NPR1, tornando-os monômeros que migram para o núcleo da célula. No núcleo, estas proteínas vão interagir com fatores de transcrição do tipo TGA. A partir desta interação, o complexo protéico NPR1/TGA se liga em elementos *cis*-regulatórios TGACG presentes na região promotora de genes *PR*, ativando-os e desencadeando a SAR. Na ausência de monômeros da proteína NPR1 no núcleo, os fatores de transcrição do tipo TGA são incapazes de induzir a expressão de genes PRs e conseqüentemente os mecanismos de defesa. Fonte: Pieterse & Van Loon (2004).

No citoplasma, pontes bissulfídricas mantêm os polímeros de proteínas NPR1, e é sabido que um ambiente oxidado é essencial para manter as ligações intactas (estáveis) (Branden & Tooze, 1999).

Mediante infecção por um patógeno, ocorre o acúmulo de moléculas sinalizadoras de defesa (AS, JA e ET) e a formação de espécies reativas de oxigênio, que alteram o estado redox do citosol na sua forma mais reduzida (Garreton *et al.*, 2002; Noctor *et al.*, 2002). Assim, quando o citoplasma torna-se reduzido, ocorre a dissociação de pontes bissulfídricas entre os oligômeros da proteína NPR1, liberando os monômeros (Mou *et al.*, 2003). De acordo com estes autores, mudanças na relação entre glutatona celular reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) também podem contribuir para a dissociação dos polímeros de proteínas NPR1. O mecanismo exato de como GSH causa redução é desconhecido. Contudo, Mou *et al.* (2003) mostraram que durante os mecanismos de defesa, induzidos por AS ou patógeno, ocorre uma alteração na relação GSH/GSSG, aumentando as concentrações de GSH, sendo suficiente para reduzir proteínas NPR1.

Uma vez em sua forma monomérica, as proteínas NPR1 podem ser translocadas para o núcleo da célula, devido à presença de um domínio de sinalização nuclear (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003).

No núcleo, monômeros de NPR1 reconhecem e interagem com fatores de transcrição contendo um domínio zíper de leucina (bZIP - *basic leucine zipper*) chamados TGA (Kinkema *et al.*, 2000; Hammond-Kosak & Parker, 2003; Rochon *et al.*, 2006). A partir desta interação, o complexo protéico NPR1/TGA se liga em elementos *cis*-regulatórios TGACG presentes na região promotora de genes *PR*, ativando a expressão destes e desencadeando a SAR (Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Kinkema *et al.*, 2000; Subramaniam *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003; Després *et al.*, 2003; Mou *et al.*, 2003; Dong, 2004; Kogel & Langen, 2005; Tada *et al.*, 2008).

9.3. Fatores de transcrição do tipo WRKY

Genes *WRKY* codificam fatores de transcrição pertencentes a uma grande família multigênica (Pandey & Somssich, 2009). Em 2000, Eulgem e colaboradores propuseram que estes fatores de transcrição eram específicos do reino vegetal. Entretanto, trabalhos recentes mostram que genes codificadores de tais proteínas também estão presentes em um eucarioto primitivo (*Giardia lamblia*), em uma ameba (*Dictyostelium discoideum*), e em algas verdes unicelulares (*Chlamidomonas Reinhardtii*) (Zhang & Wang, 2005; Ülker & Somssich, 2004; Pan *et al.*, 2009).

A planta modelo *Arabidopsis thaliana* apresenta 74 membros desta família (Robatzek & Somssich, 2002; Dong *et al.*, 2003; Eulgem & Somssich, 2007) e o arroz 109 (Zhang & Wang, 2005; Ross *et al.*, 2007). Os fatores de transcrição do tipo WRKY estão envolvidos numa variedade de funções em diferentes processos fisiológicos, como senescência, morfogênese, tolerância ao frio, seca, choque térmico, alta salinidade e radiação ultravioleta (Yamasaki *et al.*, 2005). Entretanto, sua principal função está relacionada com a defesa das plantas contra organismos agressores (Pandey & Somssich, 2009).

A denominação WRKY para estas proteínas reguladoras foi atribuída por Rushton *et al.* (1996) devido a presença deste motivo num domínio conservado de 60 aminoácidos. O primeiro fator de transcrição desta família, no entanto, foi identificado em batata doce (*Ipomoea batatas*) por Ishiguro & Nakumara em 1994 sob o nome de *SPF1* (*Sweet Potato Factor 1*).

9.3.1. Estrutura protéica de fatores de transcrição do tipo WRKY

Os fatores de transcrição do tipo WRKY são classificados em cinco grupos de acordo com os diferentes tipos de domínios que apresentam (Zhang & Wang, 2005). Considerando-se o domínio WRKY, estas proteínas podem ser agrupadas da seguinte forma: o primeiro grupo apresenta dois domínios WRKY e um motivo *zinc-finger* do tipo C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₅-H-X-H, e o segundo e terceiro grupos apresentam um único domínio WRKY, mas diferem pela estrutura do motivo *zinc-finger* (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₅-H-X-H e C-X₇-C-X₂₃-H-X-C respectivamente) (Figura 22) (Eulgem *et al.*, 2000).

A maior parte dos fatores de transcrição possui dois domínios principais: um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ativação. Para as proteínas WRKY, o domínio de ligação ao DNA (domínio WRKY) foi bem descrito, entretanto, estudos mostram que o domínio de ativação não se distingue do primeiro (De Pater *et al.*, 1996).

9.3.1.1. Domínio WRKY

O domínio WRKY dos fatores de transcrição do tipo WRKY é caracterizado por uma região conservada de 60 aminoácidos. Este domínio contém um motivo *core* de sete aminoácidos, WRKYGQK, e um motivo do tipo *zinc-finger* (dedo de zinco) (Figura 23).

Em arroz, variações no motivo *core* foram observadas (Zhang & Wang, 2005). Segundo estes autores, nove seqüências variantes, que apresentam modificações em um ou dois aminoácidos, foram encontradas principalmente nos grupos 3 e 2c (de acordo com a nova classificação proposta por estes autores). WRKYGEK e WRKYGKK são os peptídeos mais encontrados. Variações no motivo *zinc-finger* também foram reportadas (Zhang & Wang, 2005).

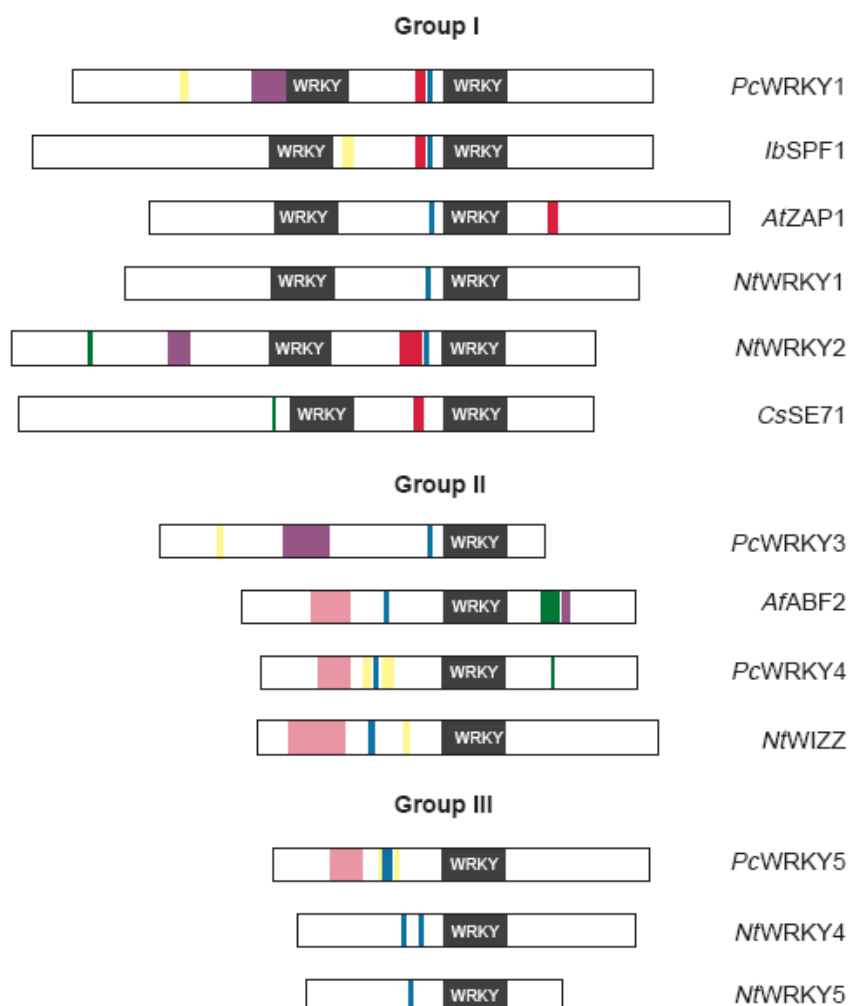


Figura 22 - Classificação dos fatores de transcrição do tipo WRKY de acordo com a estrutura protéica do domínio WRKY. Proteínas obtidas de salsa (*Pc*, *Petroselinum crispum*), batata doce (*Ib*, *Ipomoea batatas*), *Arabidopsis* (*At*), tabaco (*Nt*), pepino (*Cs*, *Cucumis sativus*) e aveia (*Af*, *Avena fatua*). Em preto estão indicados os domínios WRKY, em azul os potenciais sinais de localização nuclear, em rosa os domínios *leucine-zipper*, em amarelo as regiões ricas em serina e treonina, em violeta as regiões ricas em glutamina, em verde as regiões ricas prolina e em vermelho as regiões ácidas. Fonte Eulgem *et al.* (2000).

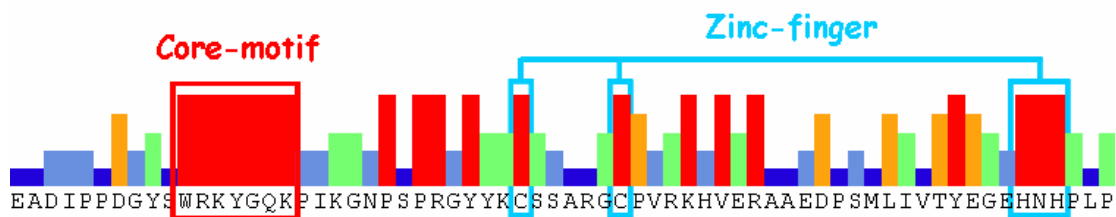


Figura 23 - Estrutura proteica do domínio WRKY dos fatores de transcrição do tipo WRKY. O domínio WRKY é caracterizado por uma região conservada de 60 aminoácidos. Este domínio contém um motivo *core* de sete aminoácidos, WRKYGQK, e um motivo do tipo *zinc-finger* (dedo de zinco). Fonte: adaptado de Eulgem *et al.* (2000).

A estrutura tridimensional do domínio C-terminal de ligação ao DNA da proteína AtWRKY4 foi resolvida por ressonância magnética nuclear (NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*) (Yamasaki *et al.*, 2005). Esta estrutura é constituída de 4 folhas β com uma cavidade para a ligação do íon zinco (Zn^{2+}), formada pelo dedo de zinco (CCHH) (Figura 24). A primeira folha β , na posição N-terminal, contém os resíduos WRKYGQK e é responsável pela fixação da proteína ao DNA (a proteína se intercala no sulco do DNA para interagir com as bases nucleotídicas presentes no *cis*-elemento W-box - YTGACY, onde Y pode ser uma base pirimídica C ou T). A conformação deste domínio é dependente da presença de íons Zn^{2+} . A estrutura da proteína AtWRKY1 também foi revelada, entretanto utilizou-se a técnica de difração por raios X (Duan *et al.*, 2007).

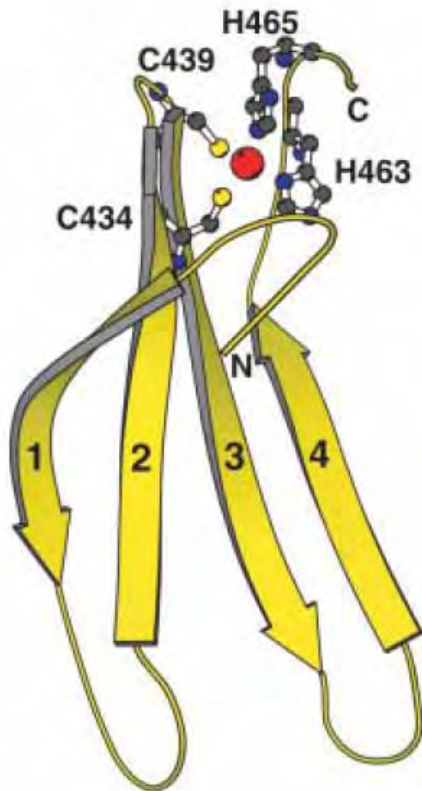


Figura 24 - Estrutura tridimensional (diagrama em fita) do domínio C-terminal da proteína AtWRKY4 resolvida por NMR. As quatro folhas β estão numeradas a partir da extremidade N-terminal. O motivo *zinc-finger* está representado por bastonetes e pequenas esferas. O íon Zn^{2+} está representado por uma esfera vermelha. Fonte: Yamasaki *et al.* (2005).

Certos resíduos do domínio WRKY são indispensáveis à interação DNA-proteína. A deleção de quatro aminoácidos na posição N-terminal do domínio de 60 aminoácidos elimina a capacidade de fixação da proteína NtWRKY9 ao DNA (Maeo *et al.*, 2001). Além disso, mutações pontuais introduzidas em cada um dos aminoácidos correspondentes ao dedo de zinco, ou nos resíduos WKYK do heptapeptídeo WRKYGQK, suprimem completamente a interação entre o DNA e a proteína. Mutações nos aminoácidos R, G e Q do heptapeptídeo também diminuem claramente esta ligação.

No caso das proteínas do grupo 1 que possuem dois domínios WRKY, sugere-se que o domínio C-terminal seja o responsável pela fixação ao DNA (Ishiguro & Nakamura, 1994, De Pater *et al.*, 1996, Eulgem *et al.*, 1999, Maeo *et al.*, 2001). A comparação da estrutura tridimensional dos domínios N- e C-terminal revela que ambos são capazes de interagir com o

DNA, mas o ganho energético na formação do complexo DNA/proteína é menos negativo para o domínio N-terminal (Yamasaki *et al.*, 2005). Este resultado confirma que o domínio C-terminal interage mais fortemente ao DNA.

Os estudos filogenéticos realizados por Zhang & Wang (2005) sugerem que o ancestral dos genes *WRKY* apresentavam um único domínio *WRKY*, e que este foi duplicado para dar origem às proteínas encontradas em *G. lamblia*, *D. discoideum*, algas verdes, e a todas aquelas pertencentes ao grupo 1, codificando dois domínios *WRKY*. Propõe-se que o domínio de C-terminal seja o domínio ancestral, encontrado também nos grupos 2 e 3 (dada sua conservação de seqüências).

Um outro motivo presente no domínio *WRKY* e que caracteriza os fatores de transcrição do tipo *WRKY* é o motivo *zinc-finger* ou dedo de zinco. Diferentes estudos sugerem que este motivo é indispensável para a conformação funcional e interação entre este fator de transcrição e o DNA (Rushton *et al.*, 1995, De Pater *et al.*, 1996, Hara *et al.*, 2000). Segundo Maeo *et al.* (2001), somente na presença do íon Zn^{2+} existe a interação da proteína *WRKY* com o DNA (Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Cd^{2+} não apresentam nenhum efeito). Mutações em resíduos conservados deste motivo, como por exemplo, em cisteínas ou histidinas presentes no dedo de zinco, também impedem a interação deste fator de transcrição com o DNA. Assim, este motivo participa ativamente na conformação estrutural de proteínas *WRKY*, o que propicia sua fixação ao DNA (Maeo *et al.*, 2001).

9.3.1.2. Outros domínios presentes em proteínas *WRKY*

A presença de domínios adicionais nos fatores de transcrição do tipo *WRKY* permitiu a classificação dessas proteínas em 5 diferentes grupos (Zhang & Wang, 2005). No entanto, a função de alguns motivos ainda é desconhecida (domínios ricos em serina-treonina, glutamina, prolina e regiões ácidas) (Figura 22).

Algumas proteínas WRKY do grupo 1 e 2 possuem um dos três sinais de localização nuclear (NLS). O endereçamento destas proteínas para o núcleo foi validado por experimentos de localização subcelular (transformação transitória de protoplastos ou de células por construções fundidas a GFP - *Green Fluorescent Protein*), efetuadas por diferentes equipes (Eulgem *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2000; Robatzek & Somssich, 2001; Asai *et al.*, 2002; Rizhsky *et al.*, 2002; Deslandes *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Contudo, em certos casos, o transporte para o núcleo depende da interação destes fatores com outras proteínas. É o caso da proteína codificada pelo gene *R RRS1*, cuja localização nuclear é dependente da presença da proteína de avirulência de *Ralstonia solanacearum* denominada PopP2 (Deslandes *et al.*, 2003).

Certas proteínas WRKY contêm domínios que permitem interações proteína/proteína, como os motivos zíper de leucina. Este motivo é implicado, geralmente, na formação de dímeros. A proteína de tabaco NtWRKY3 forma de um a dois complexos de baixa mobilidade, enquanto que NtWRKY4 forma um complexo suplementar de alta mobilidade em gel. Assim, Chen & Chen (2000) concluíram que NtWRKY3 é capaz de formar complexos oligoméricos.

Park *et al.* (2005) identificaram um domínio em proteínas WRKY do grupo 2d, designado como motivo C (VAVNSFKKVISLLGRSR), que interage com a calmodulina.

Em *Larrea tridentata*, a proteína LtWRKY21 possui um domínio ainda não descrito nos fatores de transcrição do tipo WRKY, nomeado EAR (*ERF-associated Amphiphilic Repression*, onde ERF é *Ethylene-Responsive element-binding Factor*), que apresenta a seqüência LDLNLNP e é necessário para a ativação de genes induzidos pelo ácido abscísico (ABA) (Zou *et al.*, 2004).

Vários fatores de transcrição do tipo WRKY apresentam um motivo chamado D, relacionado a sítios de fosforilação por MAP (*Mitogen-Activated Protein*) quinases. De acordo com a literatura, foi mostrado que proteínas WRKY podem ser fosforiladas *in vitro* (Kim & Zhang, 2004; Menke

et al., 2005; Eulgem & Somssich, 2007; Popescu *et al.*, 2009). O motivo D de AtWRKY25 e AtWRKY33 é conservado na região N-terminal de vários fatores de transcrição do tipo WRKY do grupo 1 (Eulgem *et al.*, 2000; Eulgem & Somssich, 2007), e pode ser fosforilado por MPK4, uma MAP quinase que reprime a via de sinalização do AS (Andreasson *et al.*, 2005). Um padrão conservado nos motivos D é a presença de dímeros serina-prolina, o sítio preferencial de fosforilação pelas MAP quinases (Davis, 1993).

9.3.2. Características da interação entre proteínas WRKY e o DNA

A maioria das proteínas WRKY fixa-se especificamente a *cis*-elementos denominados W-box, que contêm a seqüência (C/T)TGAC(T/C) (De Pater *et al.*, 1996; Du & Chen, 2000; Kim *et al.*, 2000; Robatzek & Somssich, 2001; Maeo *et al.*, 2001; Yang & Chen, 2001; Chen *et al.*, 2002; Cormack *et al.*, 2002; Huang & Duman, 2002; Marè *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004; Rocher *et al.*, 2005). Estes *cis*-elementos estão presentes nas seqüências promotoras (reguladoras) de genes de plantas. Maleck *et al.* (2000) estudaram a freqüência deste *cis*-elemento em regiões promotoras de 26 genes relacionados com mecanismos de defesa em *Arabidopsis*. Foi observado, em 1,1 Kb, que o motivo TTGAC é encontrado 4,3 vezes e o *core* motivo contendo o hexâmero TTGAC(T/C) é encontrado somente 2,6 vezes. Assim, podem existir determinadas especificidades para a ligação de proteínas WRKY nestes *cis*-elementos. Por exemplo, a proteína WIZZ diminui sua atividade de ligação ao DNA quando o elemento W-box é reduzido a quatro nucleotídeos (TGAC), bem como quando o espaçamento entre dois *cis*-elementos W-box (TTGAC) é alterado (Hara *et al.*, 2000). Frequentemente uma combinação entre dois motivos W-box favorece a interação (Rushton *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999; Chen & Chen, 2000; Hara *et al.*, 2000). Segundo Rushton *et al.* (2002), quando seqüências W-box são arranjadas em múltiplos, existe a interação entre os fatores de transcrição do tipo WRKY e o DNA, viabilizando respostas de defesa contra patógenos, elicitores e ferimentos. Yu *et al.* (2001) identificaram W-boxes na região

promotora do gene *NPR1* e demonstraram que mutações nesses *cis*-elementos promovem redução nos níveis transcricionais deste gene e daqueles por ele regulados. Também foi relatado que promotores de genes *AtWRKY* de *Arabidopsis*, dependentes da interação planta-patógeno e/ou AS, são ricos em W-box (Dong *et al.*, 2003). Por exemplo, o W-box presente na região promotora do gene *AtWRKY18* contém elementos negativamente *cis*-ativados que previnem a sua superexpressão durante a resposta de defesa. Desta forma, o *AtWRKY18* minimiza seus efeitos sobre o desenvolvimento da planta (Chen & Chen, 2002). Já a proteína AtWRKY6 não só ativa a expressão de genes que codificam receptores quinases e que contém W-box em sua região promotora, como também reprime sua própria expressão (Robatzek & Somssich, 2002), embora os mecanismos de ação como repressor ainda não sejam conhecidos.

Fatores de transcrição do tipo WRKY também podem se acoplar a outros tipos de *cis*-elementos (Sun *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2008; Ciolkowski *et al.*, 2008; Van Verk *et al.*, 2008). A primeira proteína WRKY identificada, SPF1, foi isolada por sua capacidade de fixação em duas seqüências diferentes, SP8a (ACTGTGTA) e SP8b (TACTATT), presentes em promotores dos genes *esporamina* e β -*amilase* (Ishiguro & Nakamura, 1994). De acordo com estes autores, a ligação ao DNA é mais significativa na presença do elemento SP8a, que apresenta os nucleotídeos TGAC.

É importante ressaltar que outras proteínas também podem se ligar a elementos W-box. Por exemplo, a proteína SUSIBA2 é capaz de interagir com *cis*-elementos do tipo SURE (*SUgar Responsive Element*), uma seqüência rica em adenosinas, bem como aos elementos W-box (Sun *et al.*, 2003).

Yang & Chen (2001) mostraram que a proteína NtWRKY1 de tabaco necessita dos *cis*-elementos W-box para sua fixação ao DNA. De acordo com este trabalho, os motivos W-box são frequentemente encontrados em repetições. Entretanto, certos clones que apresentavam apenas uma seqüência TTGACT também possuíam uma seqüência de 20 nucleotídeos, CCGCATAGGCCACTAGTGCA, frequentemente repetida.

Segundo os autores, estes elementos (W-box e 20 nucleotídeos) podem derivar da transposição de elementos móveis.

A capacidade de ligação ao DNA de certas proteínas WRKY pode ser dependente do seu estado de fosforilação (Yang *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 2004), enquanto que outras não o são, como AtWRKY22 e AtWRKY29 (Asai *et al.*, 2002) e as proteínas WRKY induzidas por NtMEK2 (Kim & Zhang, 2004). Estes diferentes trabalhos sugerem uma regulação das proteínas WRKY de maneira direta ou indireta através da sinalização pelas proteínas MAP quinases.

9.3.3. Funções biológicas das proteínas WRKY

Nos últimos 10 anos um grande número de fatores de transcrição do tipo WRKY foi identificado, no entanto, o seu papel biológico exato ainda é desconhecido. Vários trabalhos indicam que a maior parte destas proteínas está implicada na defesa das plantas, mas o papel de algumas destas proteínas em outras vias metabólicas parece inegável (Eulgem & Somssich, 2007).

Segundo Park *et al.* (2005), não existe uma relação entre o grupo filogenético da proteína WRKY e sua função biológica. Contudo, a descoberta do domínio de ligação à calmodulina, nos membros do grupo 2c, sugere a sua implicação na percepção no sinal de cálcio.

9.3.3.1. Defesa de plantas

Estudos em *Arabidopsis* demonstraram que fatores de transcrição do tipo WRKY participam de complexas respostas de defesa tanto como reguladores positivos quanto como reguladores negativos (Eulgem & Somssich, 2007). Por exemplo, análises de expressão gênica revelaram 49 genes de *Arabidopsis*, entre 72 genes codificando WRKY analisados, que foram diferencialmente regulados em resposta ao tratamento com AS ou à infecção por bactéria patogênica (Dong *et al.*, 2003).

AtWRKY52 (ou RRS1) é uma proteína de resistência do tipo TIR-NB-LRR-WRKY que confere resistência à bactéria *Ralstonia solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2002). A descoberta de que AtWRKY52 interage fisicamente com proteínas efetoras da bactéria (Avr PopP2) dentro do núcleo celular da planta (Deslandes *et al.*, 2002) resultou em novos estudos que demonstraram a importância do sinal de localização nuclear para a imunidade da planta (Caplan *et al.*, 2008; Liu & Coaker, 2008).

AtWRKY70 age no ponto de convergência que determina o equilíbrio entre rotas de defesa dependentes do JA ou do AS, sendo também necessário para a resistência mediada por genes *R* (Li *et al.*, 2006; Knoth *et al.*, 2007). Da mesma forma, AtWRKY33 age como regulador positivo da resistência contra os fungos necrofíticos *Alternaria brassicicola* e *Botrytis cinerea* (Zheng *et al.*, 2006), e AtWRKY53 e AtWRKY70 regulam positivamente a SAR (Wang *et al.*, 2006). Além disso, a biossíntese do AS e a expressão do gene *NPR1* também parecem ser reguladas por fatores de transcrição do tipo WRKY (Yu *et al.*, 2001).

Dois fatores de transcrição do tipo WRKY proximamente relacionados, AtWRKY3 e AtWRKY4, participam positivamente da resistência contra patógenos necrotróficos. Mutantes *Atwrky4*, *Atwrky3*, e *Atwrky3-Atwrky4* apresentaram crescente susceptibilidade a *B. cinerea*, enquanto a superexpressão de *AtWRKY4* aumentou a susceptibilidade à bactéria biotrófica *Pseudomonas syringae* (Lai *et al.*, 2008).

Muitos fatores de transcrição do tipo WRKY participam como reguladores negativos da sinalização de defesa, tais como AtWRKY7, -11, -17, -18, -23, -25, -27, -38, -40, -41, -48, -53, -58, -60, e -62. Mutantes *Atwrky7*, *Atwrky11* e *Atwrky17* apresentam redundância funcional e são susceptíveis à *P. syringae* (Journot-Catalino *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). Da mesma forma, AtWRKY38 e AtWRKY62 contribuem negativamente para a resistência a esta bactéria (Kim *et al.*, 2008). A expressão de *AtWRKY62* é induzida tanto por AS quanto por JA, sendo dependente da proteína NPR1. Ainda não foi totalmente estabelecido como AtWRKY62 altera a sinalização JA/SA, uma vez que um estudo demonstrou que a perda de função do

AtWRKY62 resultou em maior expressão de genes relacionados à resposta ao JA, enquanto que a superexpressão de *AtWRKY62* inibiu a expressão de genes relacionados à resposta ao JA (Mao *et al.*, 2007). Em um segundo estudo, níveis elevados de transcritos do gene *PR1*, dependente do AS, foram observados em mutantes *Atwrky62*, enquanto a superexpressão do *AtWRKY62* levou à supressão do gene *PR1* (Kim *et al.*, 2008). *AtWRKY48* também influenciou negativamente a resistência a *P. syringae* (Xing *et al.*, 2008): o pequeno crescimento bacteriano em mutantes *Atwrky48* foi associado ao aumento da indução de proteínas PR1, enquanto mutantes superexpressando *AtWRKY48* apresentaram fenótipos opostos. *AtWRKY58* possui ação anterior à atividade de proteínas NPR1, regulando negativamente a SAR (Wang *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a inibição da expressão de *AtWRKY23* resulta em diminuição da susceptibilidade contra o nematóide parasita *Heterodera schachtii* (Grunewald *et al.*, 2008). Uma mutação em *AtWRKY27* resultou em sintomas tardios relacionados à infecção por *R. solanacearum*, possivelmente por afetar a sinalização celular pela formação de espécies reativas de oxigênio (Mukhtar *et al.*, 2008).

Os fatores de transcrição do tipo WRKY proximamente relacionados *AtWRKY18*, -40, e -60 possuem funções parcialmente redundantes na regulação negativa da resistência contra *P. syringae* (Xu *et al.*, 2006). De modo interessante, o duplo-mutante *Atwrky18-Atwrky40* também apresentou aumento da resistência ao patógeno *Golovomyces orontii* (Shen *et al.*, 2007). Por outro lado, mutantes *Atwrky18*, *Atwrky40* e *Atwrky18-Atwrky60* mostraram-se mais suscetíveis a *B. cinerea* (Xu *et al.*, 2006), enquanto *AtWRKY18* parece apresentar funções regulatórias positivas na SAR (Wang *et al.*, 2006). Funcionalidade dupla na sinalização de defesa foi também observada para *AtWRKY53*. Mutantes *Atwrky53* apresentaram sintomas tardios contra *R. solanacearum*, ao mesmo tempo em que apresentaram maior suscetibilidade à *P. syringae* (Murray *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). Funcionalidade dupla também foi sugerida para *AtWRKY41*. Plantas de *Arabidopsis* superexpressando *AtWRKY41*

apresentaram maior resistência a *Pseudomonas*, porém maior suscetibilidade a *Erwinia carotovora* (Higashi *et al.*, 2008). No entanto, mutantes *Atwrky41* não apresentaram fenótipos diferenciais. Curiosamente, a expressão de *AtWRKY41* é especificamente suprimida por uma linhagem compatível de *P. syringae*, de maneira dependente de sua proteína efetora. Por fim, a superexpressão de *AtWRKY25* resultou em aumento dos sintomas de infecção por *P. syringae*, possivelmente pela regulação negativa de respostas de defesa mediadas pelo AS. No entanto, mutantes *Atwrky25* apresentaram um crescimento normal mediante a infecção por uma cepa de *P. syringae* compatível (Zheng *et al.*, 2007). Assim, como no caso de *AtWRKY41*, a relevância destes resultados em sistemas *in vivo* ainda precisa ser mais bem estudada.

9.3.3.2. Transdução de sinais ativados por MAP quinases

Relações entre proteínas WRKY e proteínas MAP quinases foram demonstradas (Figura 25) (Asai *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Kim & Zhang, 2004; Andreasson *et al.*, 2005; Menke *et al.*, 2005; Eulgem & Somssich, 2007; Popescu *et al.*, 2009).

As proteínas *AtWRKY22* e *AtWRKY29* foram identificadas como elementos ativados pela cascata de MAP quinases em *Arabidopsis thaliana*. Uma vez fosforiladas, estas proteínas conferem resistência aos micróbios patogênicos fúngicos e bacterianos (Asai *et al.*, 2002). Além disso, a resistência do tabaco ao TMV, por intermédio do gene de resistência *N*, necessita da expressão de *NtMEK1* e *NtNTF6* (respectivamente MAP2K e MAPK) e de três genes WRKY (Liu *et al.*, 2004).

Análises *in vivo* e *in vitro* mostraram que a proteína *MKS1*, substrato da MAPK *MPK4*, interage fisicamente com os fatores de transcrição *AtWRKY25* e *AtWRKY33* (Andreasson *et al.*, 2005). Os autores sugerem que a proteína *MKS1* desempenha um papel de regulação na fosforilação das proteínas WRKY por *MPK4*. Além disso, a ativação de *AtWRKY33* é responsável pela repressão de genes dependentes da via do

AS. Qiu *et al.* (2008) descreveram que durante a infecção por *P. syringae*, MPK4 é fosforilada, e esta fosforila MKS1 e AtWRKY33, permitindo a ação desse fator de transcrição em regiões promotoras de genes de defesa. Menke *et al.* (2005) mostraram que a proteína NtWRKY1, um fator de transcrição do tipo WRKY do grupo 1 de tabaco, é fosforilada por proteínas MAP quinases (denominadas SIPK) que são ativadas durante o mecanismo de defesa. A fosforilação mediada por SIPK aumenta, *in vitro*, a atividade de ligação de NtWRKY1 a *cis*-elementos do tipo W-box, e a co-expressão de SIPK e NtWRKY1 favorecem uma rápida resposta de hipersensibilidade. Miao *et al.* (2007) demonstraram que MEKK1 (MAP3K) interage e fosforila o fator de transcrição AtWRKY53.

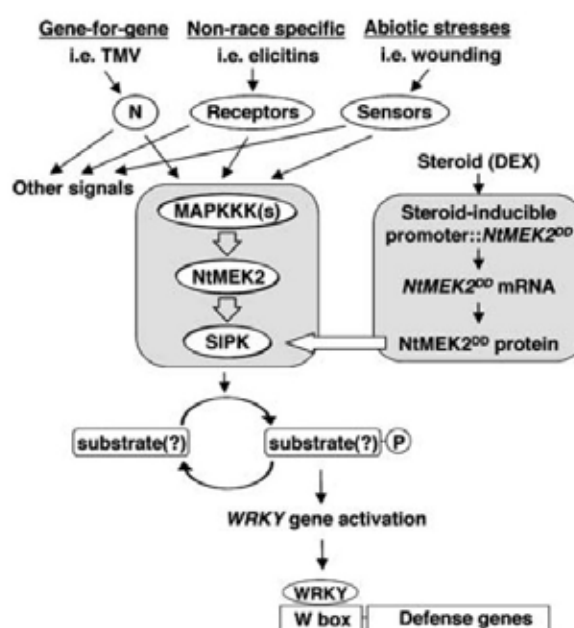


Figura 25 - Diagrama ilustrando o potencial papel de proteínas da cascata de MAP quinases na regulação dos mecanismos de defesa em plantas. Esta via de transdução de sinais é ativada mediante a percepção de diferentes tipos de sinais e podem conduzir a indução de fatores de transcrição do tipo WRKY nos primeiros momentos da defesa local. Fonte: adaptado de Kim & Zhang (2004).

9.3.3.3. Alteração na estrutura da cromatina

Sabe-se que a estrutura da cromatina pode regular a expressão gênica. Kim *et al.* (2008) demonstraram que AtWRKY38 e -62 interagem com a histona deacetilase 19 (HDA19), um fator de remodelação da cromatina que contribui para a repressão transcricional. A superexpressão de *HDA19* aumentou a resistência a *P. syringae*, enquanto que o mutante *hda19* apresentou diminuição na resistência. Esses fenótipos são opostos àqueles obtidos quando AtWRKY38 e -62 foram superexpressos, revelando um outro nível de regulação dos fatores de transcrição do tipo WRKY na resposta de defesa das plantas (Kim *et al.*, 2008).

9.3.3.4. Outras funções das proteínas WRKY

Foi demonstrado que os fatores de transcrição do tipo WRKY também participam de outros fenômenos biológicos. Por exemplo, a expressão de certos genes *WRKY* é controlada em resposta a estresses abióticos, como ferimento mecânico (Hara *et al.*, 2000); alterações nas condições de temperatura e/ou umidade (Huang *et al.*, 2002; Rizhsky *et al.*, 2002; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Marè *et al.*, 2004), e dormência (Pnueli *et al.*, 2002).

Outras implicações destas proteínas nos processos de senescência (Hinderhofer & Zentgraf, 2001; Robatzek & Somssich, 2001; Robatzek & Somssich, 2002; Miao *et al.*, 2004) e no desenvolvimento de tricomas (Johnson *et al.*, 2002) foram evidenciadas.

O seu papel no metabolismo do carbono foi destacado a partir do trabalho de Ishiguro & Nakamura (1994). Como mencionado, estes autores identificaram pela primeira vez um membro das proteínas WRKY, chamado SPF1. Esta proteína foi descrita como reguladora negativa do metabolismo do carbono. Em seguida, outros trabalhos confirmaram a

participação das proteínas WRKY nesta via metabólica (Rushton *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2003).

Além disso, fitohormônios como o ácido abscísico (ABA) ou o ácido giberélico (GA) são responsáveis pela regulação de alguns genes que codificam fatores de transcrição do tipo WRKY (Xie *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

9.3.4. Genes alvos dos fatores de transcrição do tipo WRKY

Os primeiros candidatos potenciais a serem alvos de proteínas WRKY são os genes que contêm um grande número de motivos W-box em sua região promotora. Análises *in silico* do genoma de *Arabidopsis* mostraram uma abundância específica destes elementos *cis*-reguladores na região promotora de genes ligados à defesa, bem como na região reguladora de genes que codificam proteínas de ligação ao DNA induzidas por etileno, produtos de genes de resistência, transcriptase inversa, proteínas quinases (Maleck *et al.*, 2000; Du & Chen, 2000) e especialmente, genes que codificam as proteínas PRs.

O controle da transcrição dos genes alvos de proteínas WRKY geralmente ocorre de maneira positiva. Mas alguns desses fatores de transcrição podem ser, de acordo com os seus alvos, ao mesmo tempo ativadores e repressores. Por exemplo, a proteína AtWRKY6 controla positivamente o gene *PR1*, mas negativamente o seu próprio promotor (Robatzek & Somssich, 2001). Maleck *et al.* (2000) propuseram que as proteínas WRKY co-reprimem a expressão de genes *PR1* na ausência de agentes patogênicos. Contudo, mediante uma infecção, ocorre uma desrepressão da região promotora, e a expressão da proteína PR1 é instaurada (Rowland & Jones, 2001). AtWRKY25 e AtWRKY33 participam direta ou indiretamente na regulação negativa dos genes que dependem do AS (Andreasson *et al.*, 2005). De acordo com Pandey & Somssich (2009), estes efeitos negativos parecem ser devidos à ativação de genes/proteínas WRKY, ou produtos submetidos ao seu controle, por determinados

patógenos. A modulação de proteínas WRKY por moléculas efetoras oriundas de agentes patogênicos pode explicar parcialmente a redundância funcional na família desses fatores de transcrição, que pode atuar como uma medida para “reforçar” as funções regulatórias essenciais. A modulação coordenada de fatores de ação positiva e negativa também permite que a planta possa controlar melhor a amplitude e duração da resposta de defesa.

9.3.4.1. Genes relacionados à patogênese

Genes *PRs* apresentam uma alta frequência de motivos W-box em sua região promotora. Assim, vários trabalhos sugerem que proteínas WRKY regulam a expressão destes genes (Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Dellagi *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2004). Os resultados mais notáveis nesse sentido provêm de experimentos de superexpressão de genes *WRKY* em plantas (Robatzek & Somssich, 2002; Chen & Chen, 2002; Li *et al.*, 2004). Por exemplo, a superexpressão de *AtWRKY18* ativa a expressão dos genes que codificam as proteínas PR1, PR2 e PR5 em *Arabidopsis* (Chen & Chen, 2002). Li *et al.* (2004) destacaram igualmente a ativação da expressão dos genes *PR2* e *PR5* pelo fator de transcrição *AtWRKY70*. Neste trabalho também foi observado que *AtWRKY70* inibe a expressão de genes relacionados com a via do JA, como por exemplo, *AtCOR1*, *AtVSP1* e *AtPDF1.2*. Entretanto, os trabalhos citados acima mostram que os mecanismos de regulação são complexos.

9.3.4.2. Genes relacionados à proteínas quinases

Fatores de transcrição do tipo WRKY são substratos de proteínas quinases (PK) (Andreasson *et al.*, 2005). Entretanto, genes codificadores de PK também podem ser alvos dos fatores de transcrição do tipo WRKY (Ohtake *et al.*, 2000; Du & Chen, 2000; Robatzek & Somssich, 2002; Chen *et al.*, 2003; Rocher *et al.*, 2005).

Du & Chen (2000), na busca por regiões promotoras de genes que continham o motivo W-box, identificaram quatro genes codificadores de PK (PK3, PK4, PK5 e PK6) cuja expressão é induzida por AS e por um agente patogênico em *Arabidopsis*. Estes autores demonstraram que a proteína AtWRKY18 é capaz de fixar-se nestas seqüências *cis*-reguladoras e, sobretudo, que a indução por AS depende dos fatores de transcrição do tipo WRKY. Rocher *et al.* (2005) mostraram que a presença de dois motivos W-box funcionais são indispensáveis para a ativação da transcrição de um gene codificador da PK SFR2 em *Brassica oleracea*.

9.3.4.3. Genes relacionados à proteínas WRKY

Dada a frequente presença de motivos W-box nos promotores dos genes *WRKY*, sugere-se que estes estejam sob controle direto (positivo ou negativo) de fatores de transcrição do tipo WRKY, que atuam por um mecanismo de *feedback* (auto-regulação) (Beckers & Spoel, 2006; Eulgem & Somssich, 2007). Algumas proteínas se auto-regulam de maneira positiva [como AtWRKY22 e -29 (Asai *et al.*, 2002)] ou negativa [como AtWRKY6 (Robatzek & Somssich, 2002); PcWRKY1 (Turck *et al.*, 2004); e AtWRKY53, que pode se auto-regular negativamente, bem como reprimir a expressão de AtWRKY6 (Miao *et al.*, 2004)]. Além disso, a frequência de motivos W-box é claramente superior nos promotores de genes WRKY controlados por AS ou induzidos mediante uma infecção (Dong *et al.*, 2003).

Em salsa (*Petroselinum crispum*), Turck *et al.* (2004) evidenciaram a ligação *in vivo* de PcWRKY1 a seu próprio promotor, bem como sua ligação no gene de defesa *PcPR10*. Estudos adicionais corroboram este tipo de regulação (Eulgem & Somssich, 2007; Lippok *et al.*, 2007). Skibbe *et al.* (2008) demonstraram, em *Nicotiana attenuata*, que a acumulação do transcrito NaWRKY6 durante o ataque por herbívoros é dependente da expressão de NaWRKY3. Xu *et al.* (2006) demonstraram que há uma necessidade da interação física entre fatores de transcrição do tipo WRKY relacionados para que estes desempenhem suas funções de maneira

eficiente. Nesse caso, a formação de homo- e heterodímeros das proteínas AtWRKY18, -40, e -60 em resposta à *P. syringae* foi demonstrada (Xu *et al.*, 2006).

Cai *et al.* (2008) observaram seis proteínas, incluindo OsWRKY13, que se ligam a elementos *cis*-regulatórios importantes no promotor de *OsWRKY13* em arroz.

9.3.4.4. Genes relacionados à pequenos RNAs

Pequenos RNAs (*small RNAs* - smRNAs) também têm sido reportados como reguladores da expressão gênica. Em plantas, os pequenos RNAs são classificados em micro RNAs (miRNAs) e pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNAs* - siRNAs). miRNAs contêm aproximadamente 21 nucleotídeos e derivam de estruturas codificadas por diferentes genes (Voinnet, 2009); siRNAs são derivados de moléculas de RNA em fita dupla, oriundos de um mecanismo de produção que envolve a ação de uma RNA polimerase dependente de RNA, e podem ser classificados em *trans-acting siRNAs*, *repeat-associated siRNAs*, e *natural antisense transcript-derived siRNAs*. Análises revelaram vários tipos de smRNAs acumulados em plantas (Lu *et al.*, 2005; Kasschau *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2008). Estes regulam a expressão gênica a nível pos-transcricional, num processo frequentemente chamado de RNA interferência, silenciamento por RNA, ou silenciamento gênico pós-transcricional.

A importância de tais moléculas em processos relacionados à adaptação da planta a estresses tem se tornado cada vez mais evidente. Estas moléculas estão provavelmente implicadas na regulação de genes de defesa durante a resposta a um ataque por patógenos (Navarro *et al.*, 2006; Pandey & Baldwin, 2007; Voinnet, 2008). Liu *et al.* (2009) demonstraram que o tratamento com fitohormônios induz a expressão de vários miRNAs em arroz.

Segundo Zhang Z. *et al.* (2008), dentre os alvos de vários miRNAs encontram-se genes que codificam proteínas WRKY, sugerindo que estes sofrem uma regulação mediada por smRNA. Entretanto, estes autores também observaram que na região promotora de vários genes codificadores de miRNA existe uma alta frequência de seqüências W-box, implicando portanto a ação de fatores de transcrição do tipo WRKY em sua ativação/repressão.

Outra evidência da interação entre proteínas WRKY e smRNAs foi obtida em estudos envolvendo os fatores de transcrição AtWRKY18 e -40, que modulam as respostas de defesa da planta contra oídios (Pandey & Somssich, 2009). O duplo-mutante *Atwrky18-Atwrky40* é resistente à infecção pelo fungo e apresenta forte expressão do gene *SRO5* (*similar to RCD ONE5*) durante a infecção. *SRO5* encontra-se justaposto ao gene *P5CDH* que codifica uma pyrroline-5-carboxilato desidrogenase, porém em orientação antisense. Quando os transcritos desses genes estão presentes na célula existe a geração de siRNAs de 21- e 24-nucleotídeos, os quais são componentes regulatórios da produção de espécies reativas de oxigênio e da resposta de defesa da planta (Borsani *et al.*, 2005). Estes dados sugerem, portanto que o controle da geração de siRNAs nesse locus é dependente das proteínas AtWRKY18 e -40.

Assim, o ataque de patógenos ativa a expressão de genes *WRKY* que regulam a expressão de certos smRNAs, e estas moléculas por sua vez, modulam os níveis de fatores de transcrição do tipo WRKY ligando-se a seus transcritos. Um esquema deste mecanismo é apresentado na Figura 26.

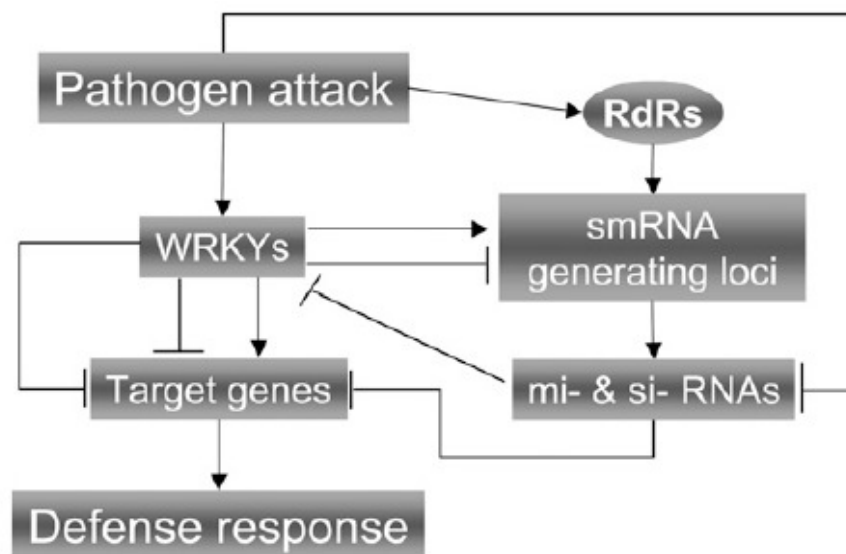


Figura 26 - Esquema da interação entre proteínas WRKY e o pequenos RNAs (smRNA) durante o mecanismo de defesa da planta. Após a infecção por um patógeno, ocorre a síntese de smRNA, que pode estar sob controle de fatores de transcrição do tipo WRKY; ao mesmo tempo, a abundância de proteínas WRKY pode ser regulada pelos smRNAs. RdR, *RNA-directed RNA polymerase*; miRNA, micro RNAs; siRNAs, pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNAs*). Fonte: Pandey & Somssich (2009).

9.3.4.5. Outros genes alvos

Outros genes relacionados às respostas induzidas por estresses podem ser regulados por proteínas WRKY. Entre eles, podemos citar o gene que codifica uma tioredoxina em *Arabidopsis*, *AtTRXh5*, proteína com propriedades antioxidantes (Laloi *et al.*, 2004), e o gene que codifica a (+)- δ -cadiene sintase (*CAD1*), que participa da biossíntese de fitoalexinas do tipo sesquiterpenos (Xu *et al.*, 2004).

Estudos de transcriptoma, principalmente de plantas capazes de superexpressar um fator de transcrição do tipo WRKY, abriram novas perspectivas para a identificação de genes-alvo destas proteínas.

Análises de cDNA-AFLP em plantas que superexpressam *AtWRKY6* revelaram genes diferencialmente expressos implicados na percepção de sinais de cálcio, na defesa, na senescência e em proteínas quinases (Robatzek & Somssich, 2002). Os autores demonstraram que o gene *AtSIRK* (*Senescence-Induced Receptor like Kinase*) é especificamente regulado por *AtWRKY6*.

Análises de microarranjos de DNA mostram que *AtWRKY70* ativa a expressão de genes de defesa (*WRKY*, *PR2*, *taumatina*), de estresse oxidativo (*GST* - *Glutathione-S-Transferase*, peroxidase), de genes de resistência (proteínas contendo o domínio LRR), de senescência ou de modificação de paredes celulares (Li *et al.*, 2004). *AtWRKY70* pode reprimir genes da via do ácido jasmônico (*VSP1* e *VSP2* - *Vegetative Storage Protein*), genes de sinalização, genes que codificam proteínas quinases associadas à parede celular ou a certos fatores de transcrição. *AtWRKY70* também pode influenciar a expressão de outras proteínas *AtWRKYs*, incluindo *AtWRKY53* (Dong *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2004).

Da mesma forma, estudos de imuno-precipitação da cromatina a partir de suspensão celular permitiram identificar *in vivo* complexos DNA/proteína a partir dos quais a seqüência de DNA pode ser identificada por amplificação via PCR. Turck *et al.* (2004) aplicaram esta técnica para identificar genes regulados pela proteína *PcWRKY1* em resposta ao elicitor fúngico *Pep25*. Eles observaram uma interação deste fator de transcrição com seu próprio promotor e com os promotores dos genes *PcWRKY3* e *PcPR10*. Os autores mostraram também que *PcWRKY1* se liga preferencialmente a certos motivos W-box presentes na região promotora de *PcPR10*, independentemente da presença de um agente patogênico ou do elicitor (Figura 27).

A mesma técnica foi aplicada por Miao *et al.* (2004) para identificar os alvos de *AtWRKY53*. Dentre 100 seqüências aleatórias reguladas por *AtWRKY53*, os autores identificaram 8 genes *WRKY* e vários genes que codificam diferentes fatores de transcrição (*MYB*, *ERF*, e proteínas chamadas homeodomínio).

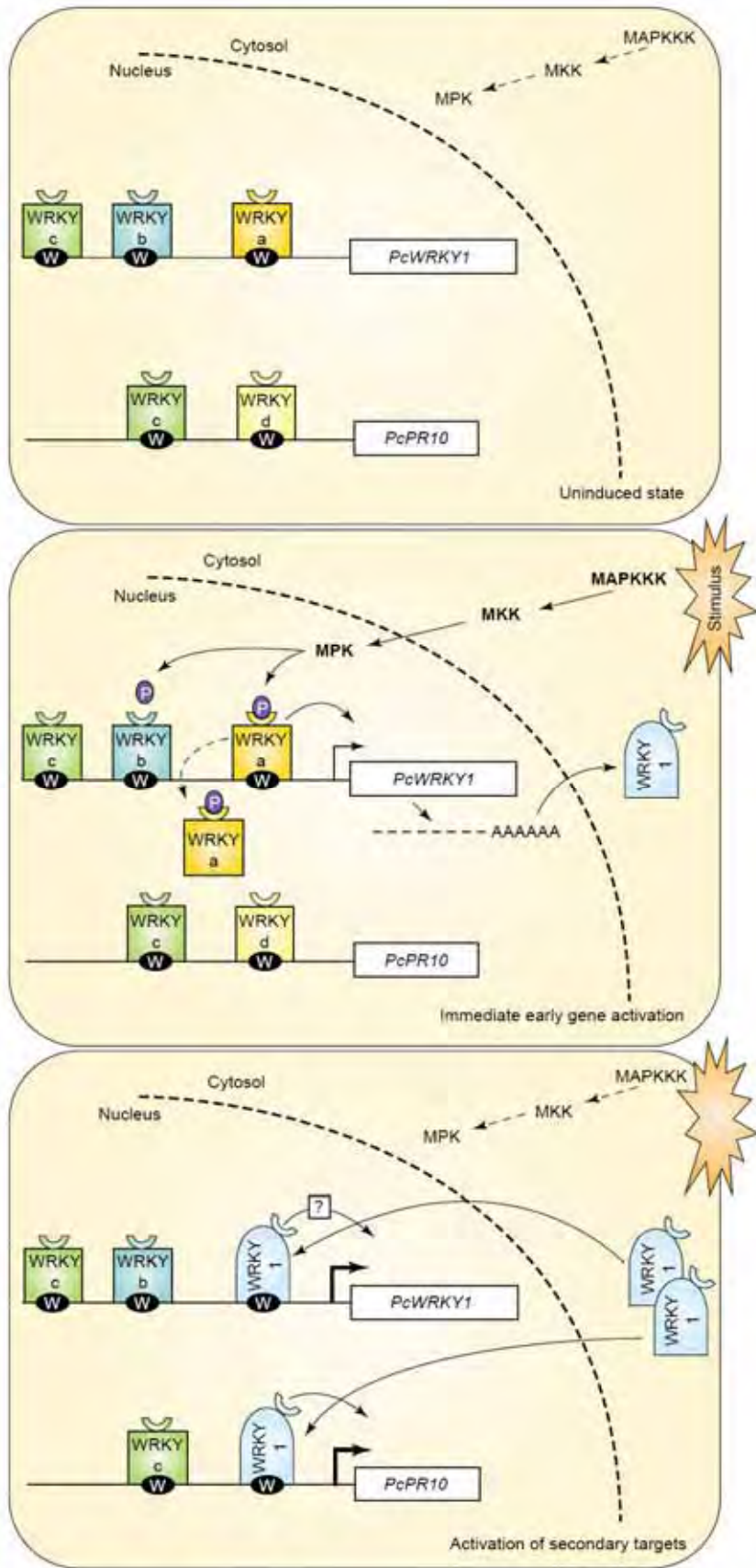


Figura 27

Figura 27 - Esquema hipotético resumindo o modo de interação entre proteínas WRKY e *cis*-elementos W-box que participam da regulação da transcrição gênica. Em células não-induzidas de salsa (*Petroselinum crispum* - Pc), elementos W-box, presentes nos promotores dos genes alvo, estão ligados por um conjunto de fatores de transcrição do tipo WRKY, que inibem ou controlam negativamente (reprimindo) a expressão do gene. Após o reconhecimento de um patógeno, uma cascata de MAP quinases é rapidamente ativada e em última instância resulta na translocação de uma proteína quinase (MPK) para o núcleo. A atividade desta quinase diretamente modifica certos fatores de transcrição do tipo WRKY presentes na região promotora de genes como o do *PcWRKY1*, desreprimindo/ativando a expressão deste gene. Por conseguinte, os níveis de proteínas WRKY1 aumentam na célula, resultando em sua autorregulação (*PcWRKY1*) e na ativação de genes alvo secundários, como por exemplo, *PcPR10*. Fonte: Ülker & Somssich (2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, L.R. *et al.* (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 118:11-23.
- Acuña, R. *et al.* (1999) Coffee seeds contain 11S storage proteins. *Physiologia Plantarum* 105:122-131.
- Agrios, G.N. (1997) How plants defend themselves against pathogens. *Plant Pathology*, 4th edition, Academic Press, San Diego. 635p.
- Alberts, B. *et al.* (2002) Control of Gene Expression. In: Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Science p.375-466.
- Alexander, D. *et al.* (1993) Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-regulated 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:7327-7331.
- Alfano, J.R. & Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385-414.
- Altenbach, S.B. *et al.* (1989) Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 13:513-522.
- Altschul, S.F. *et al.* (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Anand, A. *et al.* (2007) Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 146:703-715.
- Anand, A. *et al.* (2008) Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 146:703-715.
- Anderson, P.A. *et al.* (1997) Inactivation of the flax rust resistance gene M associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell* 9:641-651.
- Andreasson, E. *et al.* (2005) The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J* 24:2579-2589.
- Anthony, F. *et al.* (2001) Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118:53-65.
- Anthony, F. *et al.* (2002) The origin of cultivated *Coffea* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 104:894-900.
- Antoniw, J.F. *et al.* (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J Gen Virol* 47:79-87.
- Antunes Filho, H. & Carvalho, A. (1954) Melhoramento do Cafeeiro. VII - Ocorrência de lojas vazias em frutos de café "Mundo Novo". *Bragantia* 13:165-179.
- Anzlovar, S. & Dermastia, M. (2003) The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins. *Plant Biology* 5:116-124.
- Arabidopsis* Genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.
- Aravind, L. & Koonin, E.V. (1999) Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: Structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J. Mol. Biol.* 285:1353-1361.
- Arlita (2009) Espécies de café. Disponível: <http://www.arlita.com.br/ocafe.htm>. Acesso em 04 de abril de 2009.
- Armelin-Correa, L.M. (2007) Estudo da Região Promotora do Gene do Colágeno XVIII Humano. 204p. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Armstrong, M.R. *et al.* (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 102:7766-7771.
- Arneson, P.A. (2000) Coffee rust. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02. Disponível: <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/Coffeerust/default.htm>. Acesso em 05 de setembro de 2009.
- Asai, T. *et al.* (2002) MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977-983.

- Atkinson, R.G. *et al.* (1998) Apple ACC-oxidase and polygalacturonase: ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. *Plant Molecular Biology* 38:449-460.
- Ausubel, F.M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6:973-979.
- Azinhaira, H.G. (2005) Estudos celulares bioquímicos e moleculares da diferenciação de *Hemileia vastatrix*. PhD Thesis. Universidade Técnica de Lisboa (Instituto Superior de Agronomia).
- Azinhaira, H.G. *et al.* (2001) Development of infection structures of *Hemileia vastatrix* on artificial membranes. In: Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, Évora, Portugal, p.353-355.
- Baker, B. *et al.* (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276:726-733.
- Balmuth, A. & Rathjen, J.P. (2007) Genetic and molecular requirements for function of the Pto/Prf effector recognition complex in tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 51:978-990.
- Bardwell, V.J. & Treisman, R. (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes and Dev.* 8:1664-1677.
- Baum, K. *et al.* (1997) Improved ballistic transient transformation conditions for tomato fruit allow identification of organ-specific contributions of I-box and G-box to the *RBCS2* promoter activity. *The Plant Journal* 12:463-469.
- Bäumlein, H. *et al.* (1986) The legumin gene family: structure of a B-type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acid Research* 14: 2707-2720.
- Bäumlein, H. *et al.* (1991) A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Molecular and General Genetics* 225:459-467.
- Becerra, C. *et al.* (2004) Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*: characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane protein. *Genes* 340:111-121.
- Becker, W.M. *et al.* (2008) The regulation of gene expression. In: Becker, W.M. *et al.* *The world of the cell*. Benjamin Cummings; 7 edition. 912p.
- Beckers, G.J.M. & Spoel, S.H. (2006) Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol* 8:1-10.
- Belbahri, L. *et al.* (2001) A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible. *Plant J.* 28:419-430.
- Belkhadir, Y. *et al.* (2004) Plant disease resistance protein signaling: NB-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:391-399.
- Benfey, P.N. & Chua, N.-H. (1990) The CaMV 35s promoter and combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250:959-966.
- Benhamou, N. *et al.* (1991) Immunogold localization of pathogenesis-related protein P14 in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38:237-253.
- Berrocal-Lobo, M. & Molina, A. (2004) Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:763-770.
- Berthaud, J. (1980) L'incompatibilité chez *Coffea canephora*: Méthode de test et déterminisme génétique. *Café Cacao Thé* 24:267-274.
- Bettencourt, A.J. & Noronha-Wagner, M. (1971) Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk and Br. *Agronomia Lusitana* 31:285-292.
- Bettencourt, A.J. & Rodrigues Jr., C.J. (1988) Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: Clark, R.J. & Macrae, R. (Ed.). *Coffee*, v.4 Agronomy. Elsevier Applied Science, p.199-235.
- Block, A. *et al.* (2005) Systemic acquired tolerance to virulent bacterial pathogens in tomato. *Plant Physiol.* 138:1481-1490.

- Bocóli, P.D. (2008) Avaliação e análise da incidência de ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) em 8 cultivares comerciais no município de Muzambinho. 78p. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior de Tecnologia em Cafeicultura) - Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho.
- Bol, J. *et al.* (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:13-138.
- Boller, T. & He, S.Y. (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324:742-744.
- Bonato, C.M. (2007) Homeopathy in the host physiology. *Fitopatologia Brasileira* 32:79-82.
- Bork, P. (1993) Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: Mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* 17:363-374.
- Borsani, O. *et al.* (2005) Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123:1279-1291.
- Bowling, S.A. *et al.* (1994) A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6:1845-1857.
- Bowling, S.A. *et al.* (1997) The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both *NPR1*-dependent and *NPR1*-independent resistance. *Plant Cell* 9:1573-1584.
- Brandalise, M. (2007) Isolamento e caracterização de promotores tecido específico de raiz e folha de *Coffea arabica*. 141p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista.
- Brandalise, M. *et al.* (2009) The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves. *Plant Cell Rep. in press*. DOI 10.1007/s00299-009-0769-0
- Branden, C. & Tooze, J. (1999) Introduction to protein structure. Garland publishing Inc. N.Y. Second edition. 410p.
- Brandwagt, B.F. *et al.* (2000) A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4961-4966.
- Breiteneder, H. *et al.* (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Betvl is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8:1935-1938.
- Breiteneder, H. *et al.* (1995) Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur. J. Biochem.* 233:484:489.
- Bridson, D. & Verdcourt, B. (1988) *Coffea*. In: Polhill, R.M. (Ed.). *Flora of Tropical East Africa - Rubiaceae (Part 2)*. Balkema (Rotterdam). p. 415-747.
- Brueggeman, R. *et al.* (2002) The barley stem-rust resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9328-9333.
- Brunings, A.M. & Gabriel, D.W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* 4:141-157.
- Busam, G. *et al.* (1997) Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology* 115:1029-1038.
- Butler, J.E.F. & Kadonaga, J.T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16:2583-2592.
- Büttner, D. & Bonas, U. (2002) Getting across – bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* 21:5313-5322.
- Buzi, A. *et al.* (2004) Induction of resistance in Melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia Sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolor-S-Methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *J. Phytopathology.* 152:34-42.
- Cai, M. *et al.* (2008) Identification of novel pathogen-responsive *cis*-elements and their binding proteins in the promoter of OsWRKY13, a gene regulating rice disease resistance. *Plant Cell Environ* 31:86-96.
- Callis, J. *et al.* (1995) Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype columbia. *Genetics* 139:921-939.
- Camargo, A.P. & Camargo, M.B.P. (2001) Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Bragantia* 60:65-68.
- Camargo, A.P. (1985) O clima e a cafeicultura no Brasil. *Informe Agropecuário* 11:13-26.

- Camayo-Velez, G.C. *et al.* (2003) Desarrollo floral dei cafeto y su relacion com las condiciones climáticas de Chinchina-Caldas. *Cenicafé* 54:35-49.
- Camillo, L.R. (2006) Analise da expressão diferencial de genes de citros em resposta a infecção por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Campinas. 78p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas.
- Campos, J.I. (2005) A importância do café nosso de todos os dias. *News Cafeicultura*. Disponível: http://www.newscafeicultura.com.br/category_news.asp?IDCategory=37. Acesso em 04 de setembro de 2009.
- Campos, M.A. *et al.* (2007) *PR* gene families of citrus: their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. *Genetics and Molecular Biology* 30:917-930.
- Cao, H. *et al.* (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*. 6:1583-1592.
- Cao, H. *et al.* (1997) The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88:57-63.
- Cao, H. *et al.* (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:6531-6536.
- Caplan, J. *et al.* (2008) Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* 3:126-135.
- Carrington, C.M.S. *et al.* (1993) Effect of the antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes. *Plant Physiology* 103: 429-434.
- Carvalho, A. & Fazuoli, L.C. (1993) Café. In: Furlani, A.M.C. & Viégas, G.P. (Ed.). O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo. Campinas: Instituto Agrônomo. v.1, p.29-76.
- Carvalho, A. & Mônaco, L.C. (1962) Natural cross-pollination in *Coffea arabica*. In: International Horticultural Congress (Brussels). Proceedings. Toronto: International Horticultural Society, v.4, p.447-449.
- Carvalho, A. *et al.* (1989) Breeding Programs. In: Kushalappa, A.C. & Eskes, A.B. (Ed.) Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and Management. Boca Raton FL. CRC Press, Inc. p.293-336.
- Castro, P.R.C. *et al.* (2005) Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática. Piracicaba: Agrônoma Ceres. 650p.
- Catanzariti, A.M. *et al.* (2006) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18:243-256.
- Catanzariti, A.M. *et al.* (2007) Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:181-188.
- Chan, L.W.Y.F. & Goodwin, P.H. (1999) The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Advances* 17:489-508.
- Charrier, A. & Berthaud, J. (1985) Botanical classification of coffee. In: Clifford, M.N. & Willson, K.C. (Ed.). Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage. The AVI Publishing Company, Inc., Westport, CN. p.13-47.
- Charrier, A. (1978) La structure génétique des caféiers spontanés de la region Malgashe (Mascarocoffea). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea). Paris: ORSTOM. 223p.
- Chen, C. & Chen, Z. (2000) Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol Biol* 42:387-396.
- Chen, C. & Chen, Z. (2002) Potentiation of Developmentally Regulated Plant Defense Response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced *Arabidopsis* Transcription Factor. *Plant Physiol.* 129:706-716.
- Chen, H. *et al.* (2007) Isolation and characterization of *Brittle2* promoter from *Zea mays* and its comparison with *Ze19* promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 88:11-20.
- Chen, K. *et al.* (2003) Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 53:61-74.

- Chen, W. *et al.* (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14:559-574.
- Chen, Z. *et al.* (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883-1886.
- Chen, Z. L. *et al.* (1986) Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8560-8564.
- Chern, M. *et al.* (2001) Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signalling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27:101-113.
- Chern, M. *et al.* (2005) Over-expression of a rice *NPR1* homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:511-520.
- Chevalier, A. (1947) Lês caféiers du globe. III. Systematique dès caféiers. Maladies et insects nuisibles. *Encyclopedie Biologique* 28:1-256.
- Chisholm, S.T. *et al.* (2006) Host-microbe interactions shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814.
- Choi, J.J. *et al.* (2004) A promoter from pea gene DRR206 is suitable to regulate an elicitor-coding gene and develop disease resistance. *Phytopathology* 94:651-660.
- Christensen, A.B. *et al.* (2002) The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol Plant Pathol* 3:135-144.
- Christensen, A.H. & Quail, P.H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5:213-218.
- Christie, P.J. & Vogel, J.P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 8:354-360.
- Ciolkowski, I. *et al.* (2008) Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol Biol* 68:81-92.
- Cipollini, D. *et al.* (2004) Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Mol. Ecol.* 13:1643-1653.
- Clarke, J.D. *et al.* (1998) Uncoupling *PR* gene expression from *NPR1* and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. *Plant Cell.* 10:557-569.
- Clifford, M.N. (1985) Chlorogenic acids. In: Clarke, R.J. & Macrae, R. (Ed.). *Coffee*. London: Elsevier Applied Science. v. 1: Chemistry, p.153-202.
- Collins, N.C. *et al.* (1998) The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol Plant-Microbe Int* 10: 968-978.
- Collins, T.J. *et al.* (2001) Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58:259-266.
- Colot, V. *et al.* (1987) Localisation of sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco. *EMBO J.* 6: 3559-3564.
- Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: Café. Safra 2009. Estimativa janeiro/2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4cafe08.pdf>. Acesso em 04 de setembro de 2009.
- Conagin, C.H.T.M. & Mendes, J.T. (1961) Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Autoincompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Campinas, v.20, n.34.
- Conrath, U. *et al.* (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:7143-7147.
- Contim, L.A.S. *et al.* (2003) The soybean sucrose binding protein gene family: genomic organization, gene copy number, and tissue-specific expression of the SBP2 promoter. *Journal of Experimental Botany* 54:2643-2653.
- Cordeiro, M.C.R.; Grossi-de-Sá, M.F. (1999) Biotecnologia e resistência a patógenos - Interação planta-patógeno e o uso da biotecnologia na obtenção de plantas resistentes. *Biotecnologia* 10.

- Cormack, R.S. *et al.* (2002) Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochim. Biophys. Acta* 1576:92-100.
- Coste, R. (1959) Cafetos y cafés en el mundo. Paris: Maisonneuve et Larose. t. 2, 381p.
- Coutinho, T *et al.* (1995) Teliospores of *Hemileia vastatrix*. *Mycological Research*. 99:932-934.
- Coutinho, T.A. *et al.* (1993) Development of infection structures by *Hemileia vastatrix* in resistant and susceptible selections of *Coffea* and in *Phaseolus vulgaris*. *Can. J. Bot.* 71:1001-1008.
- Coventry, H.S. & Dubery, I.A. (2001) Lipopolysaccharides from *Bulkholderia cepacia* contribute to an enhance defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58:149-158.
- Cramer, C.L. *et al.* (1999) Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118.
- Crane III, E.H. (2003) Maize NPR1 polynucleotides and methods of use. US Patent 650408. Disponível: <http://www.freepatentsonline.com/6504084.html>. Acesso em 11 de setembro de 2009.
- Cutt, J.R. & Klessig, D.F. (1992) Pathogenesis-related proteins. In: Boller T. & Meins Jr., F. (Ed.). *Genes Involved in Plant Defense*. Springer, Vienna. p.209-243.
- Da Silva, P.R. (2006) Identificação de marcadores e caracterização de mecanismos moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo. 137p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Dangl, J.L. & Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Dangl, J.L. (1992) Regulatory elements controlling developmental and stress induced expression of phenylpropanoid genes. In Boller, T. & Meins, F. (Ed.). *Plant Gene Research: Genes Involved in Plant Research*. v.8. Springer-Verlag, Vienna, Austria, p.303-336.
- Dann, E.K. *et al.* (1996) The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and β -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49:307-319.
- Davis, A.P. *et al.* (2006) An annotated checklist of the genus *Coffea* L. (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:465-512.
- Davis, R.J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268:14553-14556.
- De Castro, R.; Marraccini, P. (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:175-199.
- De Pater, S. *et al.* (1996) Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 24:4624-4631.
- De Torres-Zabala M. *et al.* (2007) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO* 26:1434-1443.
- De Wit, P.J.G.M. (1992) Molecular characterisation of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:391-418.
- De Wit, P.J.G.M. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* 64:2726-2732.
- Delaney, D.E. (2002) Choice of crop species and development of transgenic product lines. In: Hood, E.E. & Howard, J.A. (Ed.). *Plants as Factories for Protein Production*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p.139-158.
- Delaney, T.P. *et al.* (1995) *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6602-6606.
- Dellagi, A. *et al.* (2000) A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol Plant Microbe Interact.* 13:1092-1101.
- Dempsey, D. *et al.* (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:547-575.

- Deslandes, L. *et al.* (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2404-2409.
- Deslandes, L. *et al.* (2003) Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and *PopP2*, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8024-8029.
- Després, C. *et al.* (2000) The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12:279-290.
- Després, C. *et al.* (2003) The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 15:2181-2191.
- Devadas, S.K. *et al.* (2002) The *Arabidopsis hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *Plant J* 30:467-480.
- Devic, M. *et al.* (1997) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol. Biochem.* 35:331-339.
- Dietrich, R.A. *et al.* (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease response. *Cell* 77:565-577.
- Dixon, R.A. & Harrison, M.J. (1990) Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv. Genet.* 28:165-234.
- Dodds, P.N. *et al.* (2001) Contrasting modes of evolution acting on the complex N locus for rust resistance in flax. *Plant J.* 27:439-453.
- Dodds, P.N. *et al.* (2004) The *Melampsora lini AvrL567* avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16:755-768.
- Dodds, P.N. *et al.* (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:8888-8893.
- Dong, J. *et al.* (2003) Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51:21-37.
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1:316-323.
- Dong, X. (2001) Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:309-314.
- Dong, X. (2004) NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:547-552.
- Dron, M., *et al.* (1988) Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:6738-6742.
- Du, L. & Chen, Z. (2000) Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA- binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J* 24:837-847.
- Duan, M.R. *et al.* (2007) DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY1 protein. *Nucleic Acids Res* 35:1145-1154.
- Durrant, W.E. & Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185-209.
- Ebert, P.R. *et al.* (1987). Identification of an essential upstream element in the *nopaline synthase* promoter by stable and transient assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5745-5749.
- Edreva, A. (2005) Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 31:105-124.
- Eira, M.T.S. *et al.* (2007) Bancos de germoplasma de café no Brasil: base do melhoramento para produtividade e qualidade. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, 5. Anais. Águas de Lindóia; EMBRAPA, 2007.
- Ellis, J. *et al.* (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:278-284.
- Endah, R. *et al.* (2008) Elicitor and *Fusarium* -induced expression of *NPR1-like* genes in banana. *Plant Physiol Biochem* 46:1007-1014.

- Epple, P. *et al.* (1995) An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* 109:813-820.
- Esques, A.B. (1989) Resistance. In: Kushalappa, A.C. & Esques, A.B. (Ed.). *Coffee rust: epidemiology, resistance and management*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. cap. 6. p.171-292.
- Espinosa, A. & Alfano, J.R. (2004) Disabling surveillance: Bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell. Microbiol.* 6:1027-1040.
- Eulgem, T. & Somssich, I.E. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10:366-371.
- Eulgem, T. (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defence transcriptome. *Trends Plant Sci.* 10:71-78.
- Eulgem, T. *et al.* (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18:4689-4699.
- Eulgem, T. *et al.* (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5:199-206.
- Eulgem, T. *et al.* (2004) Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signalling pathways for downy mildew resistance. *Plant Physiol.* 135:1129-1144.
- Fan, W. & Dong, X. (2002) *In vivo* interaction between *NPR1* and transcription factor *TGA2* leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:1377-1389.
- Fazuoli, L.C. (1986) Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A.B. *et al.* (Ed.). *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Potafós, p.87-113.
- Fazuoli, L.C. (1991) Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência a *Hemileia vastatrix*. 322p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas.
- Fazuoli, L.C. *et al.* (1999) Melhoramento clássico do cafeeiro relacionado com a biotecnologia moderna. In: Seminário internacional sobre biotecnologia na agroindústria cafeeira, 3. Londrina. Anais. Londrina: SIBAC, p.217-229.
- Fazuoli, L.C. *et al.* (2000) Seleção antecipada e sua eficiência no café Icatu. In: I Simpósio Brasileiro de Pesquisas dos Cafés do Brasil. Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café. Poços de Caldas. p.576-582.
- Fazuoli, L.C. *et al.* (2002) Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agronômico de Campinas. In: Zambolim, L. (Ed.). *O estado de arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa: UFV, p.163-215.
- Fazuoli, L.C. *et al.* (2007) A ferrugem alaranjada do cafeeiro e a obtenção de cultivares resistentes. *O Agrônomo*, Campinas, v.59, n.1.
- Fernandez, D. *et al.* (2004) Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* 5:527-536.
- Fiedler, U. *et al.* (1993) A complex ensemble of *cis*-regulatory elements controls the expression of a *Vicia faba* non-storage protein gene. *Plant Molecular Biology* 22:669-679.
- Fitzgerald, H.A. *et al.* (2004). Over expression of (At)NPR1 in rice leads to a BTH- and environment-induced lesionmimic/ cell death phenotype. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:140-151.
- Flavell, R.B. (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3490-3496.
- Flor, H.H. (1955) Host-parasite interaction in *Flax Rust* - Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680-685.
- Fraley, R.T. *et al.* (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-4807.
- Friedrich, L. *et al.* (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol* 29:959-968.
- Friedrich, L. *et al.* (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10:61-70.
- Fritig, B. *et al.* (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10:16-22.
- Gabriel, D.W. (1999) Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiol Mol Plant Pathol* 55:205-214.

- Gaffney, T. *et al.* (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261:754-756.
- Gaitan, A.L. & Aldwinckle, H.S. (1997) Cloning and evaluation of gene promoters in *Coffea arabica*. *Phytopathology* 87(6):S31.
- Ganesh, D. *et al.* (2006) Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Science* 170:1045-1051.
- García-Olmedo, F. *et al.* (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol* 3:72-74.
- García-Olmedo, F. *et al.* (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47:479-491.
- Garreton, V. *et al.* (2002) The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiol* 130:1516-1526.
- Gaspari-Pezzopane, C. (2007) Atributos fenológicos, agronômicos e expressão gênica durante a frutificação do cafeeiro. Piracicaba. 106p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- Geromel, C. *et al.* (2006) Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *Journal of Experimental Botany* 57:3243-3258.
- Giovannoni, J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16 Suppl:S170-180.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43:205-227.
- Glazebrook, J. *et al.* (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143:973-982.
- Godoy, C.V. *et al.* (1997) Doenças do cafeeiro. In: Kimati, H. *et al.* (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. 3 ed., v.2, São Paulo, Agronômica Ceres. p.774.
- Gopalkrishnan, K.S. (1951) Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. *Mycologia* 43:271-282.
- Görlach, J. *et al.* (1996) Bezothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates genes expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-643.
- Gouveia, N.M. (1984) Estudo da diferenciação e crescimento das gemas florais de *Coffea arabica* L.: observações sobre antese e maturação dos frutos. 237p. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
- Govrin, E.M. & Levine, A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology* 10:751-757.
- Grant, M.R. *et al.* (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269:843-846.
- Green, J. *et al.* (2002) 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* 60:197-205.
- Green, T.R. & Ryan, C.A. (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science* 175:776-777.
- Greenberg, J.T. & Ausubel, F.M. (1993) *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J* 4:327-341.
- Greenberg, J.T. & Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6:201-211.
- Greenberg, J.T. (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:12094-12097.
- Greenberg, J.T. *et al.* (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77:551-563.
- Grover, A. & Gowthaman, R. (2003) Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Current Science* 84:330-340.
- Grüner, R. & Pfitzner, U.M. (1994) The upstream region of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* 220:247-255.
- Grunewald, W. *et al.* (2008) A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes. *Plant Physiol* 148:358-368.

- Guerra-Guimarães, L. (2004) Proteínas relacionadas com a patogenicidade na interacção cafeeiro - ferrugem alaranjada. 101p. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Guerra-Guimarães, L. *et al.* (2001) Chitinase activity associated with coffee-rust interaction. In: Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, Évora, Portugal, p.356-358.
- Guerra-Guimarães, L. *et al.* (2003) Chitinase activity in the intercellular fluid of coffee-rust interactions. In: 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand. Abstract, p.199.
- Gurr, S.J. & Rushton, P.J. (2005) Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? *Trends Biotechnol.* 23:283-90.
- Guzzo, S.D. & Harakava, R. (2002) Isolamento de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida em cafeeiros contra a ferrugem. XXVIII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu. p.368-369.
- Guzzo, S.D. & Martins, E.M.F. (1996) Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Phytopathology* 144:449-454.
- Guzzo, S.D. (2004) Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. 236p. Tese (Doutorado) Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.
- Ha, C.M. *et al.* (2004) BLADE-ONPETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45:1361-1370.
- Hahn, M.G. & Albersheim, P. (1978) Host-pathogen interactions-XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Pathology* 62:107-111.
- Hahn, M.G. & Mendgen, K. (2001) Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:322-327.
- Hahn, M.G. (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Phytopathology* 34:387-412.
- Halim, V.A. *et al.* (2004) The oligopeptide elicitor PEP-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64:311-318.
- Hammerschmidt, R. *et al.* (2001) Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology* 107:1-6.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D.G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D.G. (2000) Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B.B. *et al.* (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA. p.1102- 1156
- Hammond-Kosack, K.E. & Parker, J.E. (2003) Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:177-193.
- Hara, K. *et al.* (2000) Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol Gen Genet* 263:30-37.
- Heath, M.C. (1997) Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Ann. Bot.* 80:713-720.
- Heath, M.C. (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:117-124.
- Heath, M.C. (2000a) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol.* 3:315-319.
- Heath, M.C. (2000b) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44:321-334.
- Heim, U. *et al.* (2001) Expression patterns and subcellular localization of a 52 kDa sucrose-binding protein homologue of *Vicia faba* (VfSBPL) suggest different functions during development. *Plant Molecular Biology* 7:461-474.
- Henanff, G.L. *et al.* (2009) Characterization of *Vitis vinifera* *NPR1* homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biology* 9:54.
- Hennig, J. *et al.* (1993) Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of a β -1,3-glucanase/*GUS* gene fusion in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 4:481-493.

- Hennin, C. *et al.* (2001) Resistance to fungal pathogens triggered by the Cf9-Avr9 response in tomato and oilseed rape in the absence of hypersensitive cell death. *Molecular Plant Pathology* 3:31-41.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316.
- Hepworth, S.R. *et al.* (2005) BLADE-ON-PETIOLE dependent signalling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1434-1448.
- Herbers, K. *et al.* (1996) Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: Possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8:793-803.
- Herr, A.J. *et al.* (2005) Polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308:118-120.
- Herrera-Estrella, L. *et al.* (1984) A. Light inducible and chloroplast associated expression of a chimeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector. *Nature* 310:115-120.
- Higashi, K. *et al.* (2008) Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 279:303-312.
- Hinderhofer, K. & Zentgraf, U. (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213:469-473.
- Hinniger, C. *et al.* (2006) Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. *Annals of Botany* 97:755-765.
- Holguin-Melendez, F. (1993) Contribution à la recherche d'une résistance durable du caféier (*Coffea* spp) à la rouille orangée (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). Étude de la variabilité génétique du pathogène. 166p. Thèse de doctorat. Université de Montpellier 2.
- Hong, J.K. & Hwang, B.K. (2005) Induction of enhanced disease resistance and oxidative stress tolerance by overexpression of pepper basic PR-1 gene in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 124:267-277.
- Hong, J.K. & Hwang, B.K. (2006) Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, *CAChi2*, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the *CAChi2*-overexpressing *Arabidopsis*. *Planta* 223:433-448.
- Hong, J.K. & Hwang, B.K. (2009) The promoter of the pepper pathogen-induced membrane protein gene *CaPIMP1* mediates environmental stress responses in plants. *Planta* 229:249-259.
- Hood, E.E. (2004) Bioindustrial and biopharmaceutical products from transgenic plants. Online publication at 4th ICSC, Brisbane Australia [http://www.cropscience.org.au/icsc2004/symposia/3/5/1955_hoode.htm](http://www.cropsscience.org.au/icsc2004/symposia/3/5/1955_hoode.htm).
- Horváth, E. *et al.* (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J. Plant Growth Regul.* 26:290-300.
- Hossain, M.M. *et al.* (2007) The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana* by activation of multiple defense signals. *Plant Cell Physiol.* 48:1724-1736.
- Hu, G. *et al.* (2005) EDS1 in tomato is required for resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene Ve. *Plant J* 42: 376-391.
- Hu, J. *et al.* (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One* 3: e2589.
- Huang, C. *et al.* (1998) The resistance of powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon* species is mainly associated with hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:399-407.
- Huang, J. *et al.* (2002) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 277:39792-39800.
- Huang, T. & Duman, J.G. (2002) Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol.* 48:339-350.
- Hwang, B.K. *et al.* (1997) Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoform, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butylic acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51:305-322.

- Hwang, S.H. *et al.* (2008) Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid. *Planta* 227:1141-1150.
- Ishiguro, S. & Nakamura, K. (1994) Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Mol Gen Genet.* 244:563-571.
- Ishihara, A. *et al.* (2008) The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J* 54:481-495.
- Iwai, T. *et al.* (2007) Probenazole-induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe grisea* in adult rice plants. *Plant Cell Physiol* 48:915-924.
- Jefferson, R.A. *et al.* (1987). GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Jeun, Y.C. *et al.* (2000) Biochemical and cytological studies on mechanisms of systemically induced resistance to *Phytophthora infestans* in tomato plants. *J Phytopathol* 148:129-140.
- Jia, Y. (2007) Understanding the coevolution of rice blast resistance gene *Pi-ta* and *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVR-Pita*. Intl. Rice Blast Conference, October 8-14, Changsha, China. p.27.
- Joët, T. *et al.* (2009) Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds: *Coffea arabica* as a case study. *New Phytologist* 182:146-162.
- Johansson, A. *et al.* (2006) Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:958-969.
- Johnson, C. *et al.* (2003) Salicylic acid and *NPR1* induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1846-1858.
- Johnson, C.S. *et al.* (2002) TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14:1359-1375.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Joung, Y.H. & Kamo, K. (2006) The expression of a *polyubiquitin* promoter isolated from *Gladiolus*. *Plant Cell Rep.* 25:1081-1088.
- Journot-Catalino, N. *et al.* (2006) The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18:3289-3302.
- Jung, H.W. *et al.* (2005) Identification of pathogen responsive regions in the promoter of a pepper *lipid transfer protein* gene (*CALTP1*) and the enhanced resistance of the *CALTP1* transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. *Planta* 221:361-373.
- Jung, H.W. *et al.* (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science* 324:89-91.
- Kaku, H. *et al.* (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:11086-11091.
- Kaloshian, I. (2004) Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. *Journal of Chemical Ecology* 30:2419-2438.
- Kamo, K. *et al.* (1995) Stable transformation of *Gladiolus* using suspension cells and callus. *J. Am. Hortic. Sci.* 120:347-352.
- Kamo, K. *et al.* (2000) Effect of the *cauliflower mosaic virus 35S*, *actin*, and *ubiquitin* promoters on *uidA* expression from a *bar-uidA* fusion gene in transgenic *Gladiolus* plants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 36:13-20.
- Kasschau, K.D. *et al.* (2007) Genome-wide profiling and analysis of *Arabidopsis* siRNAs. *PLoS Biol* 5:e57.
- Keen, N.T. (1982) Specific recognition in gene-for-gene host-parasite systems. *Adv. Plant Pathol.* 1:35-81.
- Keller, H. *et al.* (1999) Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell* 11:223-235.
- Kemen, E. *et al.* (2005) Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol Plant Microbe Interact* 18:1130-1139.
- Kesarwani, M. *et al.* (2007) Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of *pathogenesis-related* genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144:336-346.

- Kim, C.Y. & Zhang, S. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J* 38:142-151.
- Kim, C.Y. *et al.* (2000) Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Mol Plant Microbe Interact* 13:470-474.
- Kim, K.C. *et al.* (2006) Pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY7 is a transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol* 142:1180-1192.
- Kim, K.C. *et al.* (2008) *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell* 20: 2357-2371.
- Kim, S.T. *et al.* (2008) The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Reports* 27:593-603.
- Kim, Y.J. *et al.* (2002) Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* 109:589-598.
- Kinkema, M. *et al.* (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* 12:2339-2350.
- Kitajima, S. & Sato, F. (1999) Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J Biochem* 125:1-8.
- Kjemtrup, A.M. *et al.* (2000) There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *International Journal for Parasitology* 30:1501-1505.
- Knoth, C. *et al.* (2007) *Arabidopsis* WRKY70 is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:120-128.
- Koch, W. *et al.* (1998) Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta* 206:523-532.
- Koga, H. *et al.* (1990) Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* 68:2344-2352.
- Kogel, K.H. & Langen, G. (2005) Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cellular Microbiology* 7:1555-1564.
- Kombrink, E. & Hahlbrock, K. (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from pathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. *Plant Physiol.* 81:216-221.
- Kooshki, M. *et al.* (2003) Pathogen-inducible reporting in transgenic tobacco using a GFP construct. *Plant Sci.* 165:213-219.
- Kortekamp, A. & Zyprian, E. (2003) Characterization of plasmopara-resistance in grapevine using in vitro plants. *Journal of Plant Physiology* 160:1393-1400.
- Kuntz, M. *et al.* (1998) Up-regulation of two ripening-related genes from a non-climacteric plant (pepper) in a transgenic climacteric plant (tomato). *The Plant Journal* 13:351-361.
- Kushalappa, A.C. & Eskes, A.B. (1989). Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology* 27: 503-531.
- Lagrimini, L.M. *et al.* (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7542-7546.
- Lagrimini, L.M. *et al.* (1997) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Mol Biol* 33:887-895.
- Lahaye, T. & Bonas, U. (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.* 6:479-485.
- Lahaye, T. (2004) Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance; *Arabidopsis thaliana* RRS1-R and its interaction with *Ralstonia solanacearum* popP2. *Trends Plant Sci.* 9:1-4.
- Lai, Z. *et al.* (2008) Roles of *Arabidopsis* WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC Plant Biol* 8:68.
- Laloi, C. *et al.* (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.* 134:1006-1016.
- Lam, E. *et al.* (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848-853.

- Landgraf, P. *et al.* (2002) Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. *European Journal of Plant Pathology* 108:279-283.
- Lane, B.G. *et al.* (1993) Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem* 268:12239-12242.
- Lashermes, P. *et al.* (1999) Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics* 261:259-266.
- Laskowski, M.Jr. & Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Ann Rev Biochem* 49:593-626.
- Lawrence, G.L. *et al.* (1995) The L6 gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *Plant Cell* 7:1195-1206.
- Lawton, K. *et al.* (1993) The molecular biology of systemic acquired resistance. In: Fritig, B. & Legrand, M. (Ed.). *Mechanisms of Defence Response in Plants*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands. p.410-420.
- Lawton, K. *et al.* (1995) Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:863-870.
- Lebel, E. *et al.* (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 16:223-233.
- Lee, S.C. *et al.* (2006) Identification and functional expression of the *pepper pathogen-induced* gene, *CAPIP2*, involved in disease resistance and drought and salt stress tolerance. *Plant Mol Biol* 62:151-164.
- Leisner, S.M. & Gelvin, S.B. (1988) Structure of the *octopine synthase* upstream activator sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2553-2557.
- Leister, D. *et al.* (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genet.* 14:421-429.
- Leisy, D.J. *et al.* (1989) Expression of a rice *glutelin* promoter in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 14:41-50.
- Leon-Reyes, A. *et al.* (2009) Ethylene modulates the role of nonexpressor of pathogenesis-related genes1 in cross-talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol* 149:1797-1809.
- Lepelley, M. *et al.* (2007) Chlorogenic acid synthesis in coffee: an analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*. *Plant Science* 172:978-996.
- Levine, A. *et al.* (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* 6:427-437.
- Levine, M. & Tjian, R. (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424:147-51.
- Lewin, B. (2001) *Genes VII* Porto Alegre: Artmed Editora. 955p.
- Li, J. *et al.* (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16:319-331.
- Li, J. *et al.* (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* 46:477-491.
- Li, X. *et al.* (1997) Overexpression, purification, characterization, and crystallization of the BTB/POZ domain from the PLZF oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 272:27324-27329.
- Li, Y.F. *et al.* (2005) Activation of the gene promoter of barley β -1,3-glucanase isoenzyme GIII is salicylic acid (SA)-dependent in transgenic rice plants. *J Plant Res* 118:215-221.
- Lindgren, P.B. *et al.* (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J Bacteriol* 168:512-522.
- Link, T. & Voegelé, R.T. (2008) Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Mol Plant Pathol* 9:59-66.
- Linthorst, H.J.M. *et al.* (1989) Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1:285-291.
- Lippok, B. *et al.* (2007) Expression of AtWRKY33 encoding a pathogen-/PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements. *Mol Plant Microbe Interact* 20:420-429.
- Liu, G. *et al.* (2005) An *Arabidopsis* *NPR1*-like gene, *NPR4*, is required for disease resistance. *Plant J.* 41:304-318.

- Liu, J. & Coaker, G. (2008) Nuclear trafficking during plant innate immunity. *Mol Plant* 1:411-422.
- Liu, Q. *et al.* (2009) Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Lett* 583:723-728.
- Liu, Y. *et al.* (2002) Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* 30:415-429.
- Liu, Y. *et al.* (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 38:800-809.
- Liu, Y. *et al.* (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal* 51:941-954.
- Loake, G. & Grant, M. (2007) Salicylic acid in plant defense: The players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol* 10:466-472.
- Loake, G.J. *et al.* (1991) Phenylpropanoid pathway intermediates regulate transient expression of a chalcone synthase gene promoter. *Plant Cell* 3:829-840.
- Lois, R. *et al.* (1989) A *phenylalanine ammonia-lyase* gene from parsley: Structure, regulation, and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *EMBO Journal* 8:1641-1648.
- Lu, C. *et al.* (2005) Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* 309:1567-1569.
- Lummerzheim, M. *et al.* (1993) Identification of compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and characterization of the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:532-544.
- Lynch, J.M. & Whipps, J.M. (1991) Substrate flow in the rhizosphere. In: Keister, D.L. & Cregan, P.B. (Ed.). *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. p.15-24.
- Ma, J.K.C. *et al.* (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Genetics* 4:794-805.
- Mackey, D. *et al.* (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* Type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743-754.
- Mackey, D. *et al.* (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112:379-389.
- Maeo, K. *et al.* (2001) Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:2428-2436.
- Maffei, M.E. *et al.* (2007) Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci.* 12:310-316.
- Mago, R. *et al.* (1999) Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theor Appl Genet* 99:50-57.
- Malamy, J. *et al.* (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004.
- Maleck, K. *et al.* (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genet.* 26:403-410.
- Malnoy, M. *et al.* (2007) Overexpression of the Apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1568-1580.
- Maniatis, T. *et al.* (1987) Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236:1237-1245.
- Mao, P. *et al.* (2007) WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant Cell Physiol* 48:833-842.
- Marathe, R. & Dinesh-Kumar, S.P. (2003) Plant defense: One post, multiple guards?! *Molecular Cell* 11:284-286.
- Marè, C. *et al.* (2004) Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol Biol.* 55:399-416.
- Margis-Pinheiro, M. *et al.* (1999) A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje* 147:28-32.

- Marín-López, S.M. *et al.* (2003) Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia). *Cenicafé* 54:208-225.
- Markovic-Housley, Z. *et al.* (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier, *J. Mol. Biol.* 325:123-133.
- Marraccini, P. *et al.* (1999) Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37:273-282.
- Marraccini, P. *et al.* (2001) Update on coffee biochemical compounds, protein and gene expression during bean maturation and in other tissues. In: Proceedings of the 19th International Scientific Colloquium on Coffee, Trieste, Italy, Abstract B214 CD-room ISBN 2-90012-18-9.
- Marraccini, P. *et al.* (2003) Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 41:17-25.
- Marris, C. *et al.* (1988) The 5'-flanking region of a barley *B hordein* gene controls tissue and development specific CAT expression in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 10: 359-366.
- Martin, G.B. *et al.* (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436.
- Martin, G.B. *et al.* (2003) Understanding the functions of plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:23-61.
- Martins, E.M.F. & Moraes, W.B.C. (1996) Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic and induced resistance. *J. Phytopathol.* 144:519-526.
- Martins, E.M.F. (1998) Seqüência de eventos primários do desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* em folhas de cafeeiro com suscetibilidade genética, resistência induzida ou resistência genética. 149p. Dissertação (Mestrado) Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- Martins, E.M.F. *et al.* (1985) Histological studies of compatible and incompatible interactions of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. *Fitopatol. Bras.* 10:627-636.
- Matzke, A.J.M. *et al.* (1994) Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.* 244:219-229.
- Matzke, A.J.M. *et al.* (1993) Deletion analysis of a *zein* gene promoter in transgenic tobacco plants. *Plant molecular Biology* 14: 323-332
- Mauch-Mani, B. & Métraux, J.P. (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals Botany* 82:535-540.
- Maxemiuc-Naccache, V. *et al.* (1992) Chitinase and β -1,3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Revista Brasileira de Botânica* 15:145-150.
- McDowell, J.M. & Dangl, J.L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* 25:79-82.
- McDowell, J.M. & Woffenden, B.J. (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotechnol.* 21:178-183.
- McElroy, D. *et al.* (1990) Isolation of an efficient *actin* promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2:163-171.
- Medberry, S.L. *et al.* (1992) The *Commelina* yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. *Plant Cell* 4:185-192.
- Medeiros, R.B. *et al.* (2003) Mecanismos de Agressão e Defesa nas Interações Planta-Patógeno, Edições Universidade de Brasília (UNB), Brasília. 289p.
- Melchers, L.S. *et al.* (1994) A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exochitinases displays antifungal activity. *Plant J* 5:469-480.
- Mendgen, K. & Voegelé, R.T. (2005) Biology of rusts and mechanisms of infection. In: Zambolim, L. *et al.* (Ed.). *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa, UFV. p.233-248.
- Menke, F.L. *et al.* (2005) Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 18:1027-1034.

- Métraux, J.P. *et al.* (1988) A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol Mol Plant Pathol* 33:1-9.
- Métraux, J.P. *et al.* (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250:1004-1006.
- Meur, G. *et al.* (2006) Differential induction of *NPR1* during defense responses in *Brassica juncea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68:128-137.
- Meyers, B.C. *et al.* (2003) Genome-wide analysis of NB-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:809-834.
- Miao, Y. *et al.* (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 55:853-867.
- Miao, Y. *et al.* (2007) *Arabidopsis* MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant Mol Biol* 65:63-76.
- Michaely, P. & Bennett, V. (1992) The ANK repeat: A ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends Cell Bid* 2:127-129.
- Michelmore, R.W. (2003) The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:397-404.
- Miranda, M. *et al.* (2007) Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Mol Biol.Cell* 18:313-323.
- Molina, A. *et al.* (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal pathogens. *FEBS Lett* 316:135-139.
- Montesano, M. *et al.* (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.* 4:73-79.
- Moraes, M.G. (1998) Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. *Revisão Anual de Patologia Vegetal* 6:261-284.
- Moraes, S.A. (1983) A ferrugem do cafeeiro: importância, condições predisponentes, evolução e situação no Brasil. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas. p.50.
- Moragado, A.A.M. (2008) Produção de Café no Brasil - Uma Visão Produção Arábica e Robusta. Disponível: <http://www.webartigos.com/articles/12576/1/producao-de-cafe-no-brasil-uma-visao-producao-arabica-e-robusta/pagina1.html>. Acesso em 04 de setembro de 2009.
- Mou, Z. *et al.* (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113:935-944.
- Mukhtar, S.M. *et al.* (2008) The *Arabidopsis* transcription factor WRKY27 influences wilt disease symptom development caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant J* 56:935-947.
- Mur, L.A.J. *et al.* (1996) Salicylic acid potentiates defense gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J.* 9:559-571.
- Murray, S.L. *et al.* (2007) Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein. *Mol Plant Microbe Interact* 20:1431-1438.
- Narasimhan, M.L. *et al.* (2001) A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol Cell* 8:921-930.
- Navarre, D.A. & Mayo, D. (2004) Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. *Physiol Mol Plant Pathol* 64:179-188.
- Navarro, L. *et al.* (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312:436-439.
- Nawrath, C. & Métraux, J.P. (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell.* 11:1393-1404.
- Nawrath, C. *et al.* (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* 14:275-286.
- Neff, N.T. & Binns, A.N. (1985) *Agrobacterium tumefaciens* interaction with suspension-cultured tomato cells. *Plant Physiol.* 77:35-42.
- Nelson, D.E. *et al.* (1992) Analysis of structure and transcriptional activation of an *OSM* gene. *Plant Mol. Biol.* 19:577-588.

- Neuteboom, L.W. *et al.* (2002) Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Science* 163:1021-1035.
- Niggeweg, R. *et al.* 2000. Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1 binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid and auxin inducible expression of as-1 containing target promoters. *J. Biol. Chem.* 275:19897-19905.
- Noctor, G. *et al.* (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53:1283-1304.
- Noir, S. *et al.* (2001) Origin, diversity and evolution of NB type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Mol Genet and Genomics* 265:654-662.
- Noronha-Wagner, M. & Bettencourt, A.J. (1967) Genetic study of resistance of *Coffea* sp. to leaf rust. I. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal of Botany* 45:2021-2031.
- Nürnberger, T. & Kemmerling, B. (2006) Receptor protein kinases – pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci* 11:519-22.
- Nürnberger, T. & Kemmerling, B. (2008) Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and PAMP-triggered immunity. *Annual Plant Reviews: Molecular Aspects of Plant Disease Resistance* 34:16-47.
- Nürnberger, T. *et al.* (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78:449-460.
- Nürnberger, T. *et al.* (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198:249-266.
- Odell, J.T. *et al.* (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
- O'Donnell, P.J. *et al.* (2001) Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J* 25:315-323.
- Ohtake, Y. *et al.* (2000) Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 41:1038-1044.
- Okushima, Y. *et al.* (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: Identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* 42:479-488.
- Ono, Y. (2002) The diversity of nuclear cycle in microcyclic rust fungi (Uredinales) and its ecological and evolutionary implications. *Mycoscience* 43:421-439.
- Ormond, J.G.P. *et al.* (1999) Café: (Re) conquista dos mercados. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.10, p.3-56.
- Orsi, C.H. (2003) Identificação e análise da expressão de seqüências de genes tipo RGA em espécies de *Coffea* resistentes e susceptíveis ao nematoide *Meloidogyne exigua*. Campinas. 112p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas.
- Osborn, A.E. (1996) Saponins and plant defence-A soap story. *Trends Plant Sci.* 1:4-9.
- Osmond, R.I. *et al.* (2001) Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)-beta-D-glucans. Kinetics, specificity, structural analysis and biological implications. *Eur J Biochem* 268:4190-4199.
- Ow, D.W. *et al.* (1987) Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4870-4874.
- Padidam, M. (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:169-177.
- Pan, Y.J. *et al.* (2009) A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 284:17975-17988.
- Pandey, S.P. & Baldwin, I.T. (2007) RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *Plant J* 50:40-53.
- Pandey, S.P. & Somssich, I.E. (2009) The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiology* 150:1648-1655.
- Pandey, S.P. *et al.* (2008) Herbivory-induced changes in the small-RNA transcriptome and phytohormone signaling in *Nicotiana attenuata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4559-4564.
- Panstruga, R. (2003) Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:320-326.

- Parent, J.G. & Asselin, A. (1984) Detection of pathogenesis-related proteins (PR or b) and of other proteins in the intercellular fluid of hypersensitive plants infected with tobacco mosaic virus. *Can J Bot* 62:564-569.
- Park, C.J. *et al.* (2004) Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* 219:797-806.
- Park, C.Y. *et al.* (2004) Pathogenesis-related gene expression by specific calmodulin isoforms is dependent on NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance. *Mol. Cells* 18:207-213.
- Park, C.Y. *et al.* (2005) WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett.* 579:1545-1550.
- Park, H.J. *et al.* (1998) Induction of a sub-systemic oxidative burst by elicitor-stimulated local oxidative burst in potato plant tissues: a possible systemic signaling in systemic acquired resistance. *Plant Science* 138:197-208.
- Park, J.Y. *et al.* (2009) Rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) infects *Arabidopsis* via a mechanism distinct from that required for the infection of rice. *Plant Physiol* 149:474-486.
- Park, S.W. *et al.* (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318:113-116.
- Park, Y.D. *et al.* (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* 9:183-194.
- Parker, J.E. (2009) The quest for long-distance signals in plant systemic immunity. *Science Signaling* 2:31.
- Pascholati, S.F. & Leite, B. (1995) Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A. *et al.* (Ed.). *Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. v.1. p.417-453.
- Pavin, M.E. (2005) Identificação e caracterização molecular de duas β -1,3 glucanases em *Carica papaya*. Brasília. 54p. Universidade Católica de Brasília.
- Pedersen, K. *et al.* (1982) Cloning and sequence analysis reveal structural variation among related *zein* genes in maize. *Cell* 29:1015-1026.
- Penninckx, I.A.M.A. *et al.* (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:2103-2113.
- Pereira, L.F.P. *et al.* (2005) Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:283-289.
- Perl-Treves, R. *et al.* (2004) Early induction of the *Arabidopsis* GSTF8 promoter by specific strains of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:70-80.
- Petrasovits, L.A. *et al.* (2007) Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. *Plant Biotechnol J.* 5:162-172.
- Pezzopane, J.R.M. *et al.* (2003) Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro Árabe. *Bragantia* 62:499-505.
- Pieterse, C.M.J. & Van Loon, L.C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Pieterse, C.M.J. & Van Loon, L.C. (2004) *NPR1*: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:456-464.
- Pieterse, C.M.J. *et al.* (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10:1571-1580.
- Pieterse, C.M.J. *et al.* (2001) Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet* 3: ABN 068.
- Pieterse, C.M.J. *et al.* (2003) Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* 35:39-54.
- Pieterse, C.M.J. *et al.* (2005) Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 13:277-295.
- Pieterse, C.M.J. *et al.* (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5:308-316.
- Pikaard, C.S. *et al.* (2008) Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci.* 13:390-397.

- Pilotti, M. *et al.* (2008) NPR1-like genes from cDNA of rosaceous trees: cloning strategy and genetic variation. *Tree Genetics & Genomes* 4:49-63.
- Pinto-Maglio, C.A.F. & Cruz, N.D. (1998) Pachytene chromosome morphology in *Coffea* L. II. *C. arabica* L. complement. *Caryologia* 51:19-35.
- Pnueli, L. *et al.* (2002) Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.* 31:319-330.
- Poiatti, V.A.D. (2007) Mecanismos de defesa em plantas de *Solanum tuberosum* L. em resposta a bactérias fitopatogênicas. Porto Alegre. 72p. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Pontier, D. *et al.* (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology* 39:1243-1255.
- Popescu, S.C. *et al.* (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev* 23:80-92.
- Potenza, C. *et al.* (2004) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40, 1-22.
- Prins, M. *et al.* (2008) Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.* 9:73-83.
- Privat, I. *et al.* (2008) Differential regulation of grain sucrose accumulation and metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta) revealed through gene expression and enzyme activity analysis. *New Phytologist* 178:781-797.
- Przymusiński, R. *et al.* (2004) Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses. *Env. Exp. Bot.* 52:53-62.
- Ptashne, M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335:683-689.
- Qiu, J.L. *et al.* (2008) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J* 27:2214-2221.
- Raina, S.N. (1998) In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 97:1204-1209.
- Rairdan, G.J. & Moffett, P. (2006) Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein Rx mediate LRR binding and inhibition of activation. *Plant Cell* 18:2082-2093.
- Rajendren, R.B. (1967) A new type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. *Mycologia* 59:279-285.
- Ramiro, D.A. (2009) Caractérisation des mécanismes de résistance impliqués dans les réponses du caféier (*Coffea arabica*) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*). De la formation des haustoria à l'expression quantitative des gènes. Thèse de doctorat. Université de Montpellier 2.
- Ramiro, D.A. *et al.* (2009) Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*, v.58. Doi: 10.1111/j. 1365-3059.2009.02122.x
- Rauscher, G.M. *et al.* (2006) Characterization and mapping of R_{Pi-ber}, a novel potato late blight resistance gene from *Solanum berthaultii*. *Theory Applied Genetics* 112:674-687.
- Rayapuram, C. & Baldwin, I.T. (2007) Increased SA in *NPR1*-silenced plants antagonizes JA and JA-dependent direct and indirect defenses in herbivore-attacked *Nicotiana attenuata* in nature. *Plant J.* 52:700-715.
- Rayner, R.W. (1972) Micología, historia y biología de la roya del café. Publicación Miscelânea. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, Costa Rica.
- Ream, T.S. *et al.* (2009) Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol. Cell* 33:192-203.
- Rebmann, G. *et al.* (1991) Sequence of a wheat cDNA encoding a pathogen-induced thaumatin-like protein. *Plant Mol. Biol.* 17:283-285.
- Reid, J.S.G. & Meier, H. (1973) Enzymatic activities and galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidase and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112:301-308.
- Rena, A.B. & Maestri, M. (1987) Ecofisiologia do café. In: Castro, P.R.C. *et al.* (Ed.). Ecofisiologia da produção agrícola. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. p.119-147.

- Resende, M.L.V. *et al.* (2003) Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28:123-130.
- Ricci, P. *et al.* (1993) Proteinaceous elicitors of plant defense responses. In: Fritig, B. & Legrand, M. (Ed.). *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p.121-135.
- Rijo, L. & Rodrigues Jr., C.J. (1977) The infection process of *Hemileia vastatrix* in susceptible and resistant cultivars of *Coffea arabica*. In: Proceedings of the 8th International Conference on Coffee Science (ASIC), Abidjan, Ethiopia, p.509-510.
- Rijo, L. *et al.* (1991) Does gene SH5 confer to certain coffee-rust associations a reaction near immunity? A histopathological study. *Café Cacao Thé* XXXV:167-176.
- Rivas, S. & Thomas, C.M. (2005) Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* 43:395-436.
- Rizhsky, L. *et al.* (2002) The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiol.* 130:1143-1151.
- Robatzek, S. & Somssich, I.E. (2001) A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defense-related processes. *Plant J.* 28:123-133.
- Robatzek, S. & Somssich, I.E. (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* 16:1139-1149.
- Roby, D. *et al.* (1990) Activation of a bean *chitinase* promoter in transgenic plants by phytopathogenic fungi. *The Plant Cell* 2:999-1007.
- Rocher, A. *et al.* (2005) A W-box is required for full expression of the SA responsive gene SFR2. *Gene* 344:181-192.
- Rochon, A. *et al.* (2006) The coactivation of the *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 8:3670-3685.
- Roda, A.L. *et al.* (2003) Allometric analysis of the induced flavonols on the leaf surface of wild tobacco (*Nicotiana attenuata*). *Phytochemistry* 62:527-536.
- Rodrigues Jr., C.J. *et al.* (1975) Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Ann Rev Phytopathol* 13:49-70.
- Rodrigues Jr., C.J. *et al.* (2000) Recent advances on coffee leaf rust. In: International Scientific Symposium on Coffee. 4 de dezembro de 2000. Bangalore, India, Central Coffee Research Institute. Proceedings Coffee Board. p.179-193.
- Rohini, V.K. & Rao, K.S. (2000) Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants. *Plant Sci* 150:41-49.
- Rojas, M.L. *et al.* (1993) Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43:209-219.
- Romeiro, R.S. (2001) Métodos em Bacteriologia de Plantas. Vicoso MG Brasil: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa. p.55-64.
- Römer, P., *et al.* (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318:645-648.
- Rommens, C.M. & Kishore, G.M. (2000) Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:120-125.
- Ross, A.F. (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-358.
- Ross, C.A. *et al.* (2007) The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*). *J Integr Plant Biol* 49:827-842.
- Roulin, S. & Buchala, A.J. (1995) The induction of 1, 3- β -glucanases and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:471-489.
- Rowland, O. & Jones, J.D.G. (2001) Unraveling regulatory networks in plant defense using microarrays. *Genome Biol.* 2:1-3.
- Ruiz, R.A.C. *et al.* (2005) Organization of *phenylalanine ammonia lyase (PAL)*, *acid PR-5* and *osmotin-like (OSM)* defence-response gene families in potato genome. *Molecular Gen Genomics* 274:168-179.
- Rushton, P.J. *et al.* (1995) Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol Biol.* 29:691-702.
- Rushton, P.J. *et al.* (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *Embo J.* 15:5690-5700.

- Rushton, P.J. *et al.* (2002) Synthetic Plant Promoters Containing Defined Regulatory Elements Provide Novel Insights into Pathogen and Wound-Induced Signaling. *Plant Cell* 14:749-762.
- Ryals, J. *et al.* (1994) Systemic acquired resistance. *Plant Physiol* 104:1109-1112.
- Ryals, J. *et al.* (1997) The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. *Plant Cell* 9:425-439.
- Ryals, J.A. *et al.* (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1809-1819.
- Ryan, C.A. (1990) Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28:425-449.
- Ryu, C.M. *et al.* (2003) Different signalling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist* 160:413-420.
- Saalbach, I. *et al.* (2001) High-level expression of a single chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds. *Journal of Plant Physiology* 158:529-533.
- Sagee, O. & Dahan, Y. (1994) Stress and ethylene induced pathogenesis-related proteins in citrus. *Acta Hort. (ISHS)* 394:173-182.
- Salmona, J. *et al.* (2008) Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. *Plant Mol. Biol.* 66:105-124.
- Samac, D.A. & Shah, D.M. (1991) Developmental and pathogen-induced activation of the *Arabidopsis* acidic chitinase promoter. *The Plant Cell* 3: 1063-1072.
- Sanchez-Ballesta, M.T. *et al.* (2003) A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta*. 218:65-70.
- Sandhu, D. *et al.* (2009) Systemic acquired resistance in soybean is regulated by two proteins, Orthologous to *Arabidopsis* NPR1. *BMC Plant Biol.* 9:105.
- Santos, F.P. & De Castro, C.S. (2000) Transcrição. Disponível: <http://www.icb.ufmg.br/prodabi/prodabi3/grupos/grupo1/transcricao.htm>. Acesso em 05 de setembro de 2009.
- Satyanarayana, K.V. *et al.* (2005) Isolation of promoter for *N-methyltransferase* gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. *Journal of Biotechnology* 119:20-25.
- Schaller, A. & Oecking, C. (1999) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defence responses in tomato plants. *Plant Cell* 11:263-272.
- Scherer, N.M. (2002) Evolução molecular darwiniana nas proteínas relacionadas à patogênese (PRs) em plantas. Porto Alegre. 104p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Schröder, M. (1992) Temporal and spatial pattern of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Plant J* 2:161-172.
- Seah, S. *et al.* (1998) Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley. *Theor Appl Genet* 97:937-945.
- Seki, M. *et al.* (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:194-199.
- Selitreffnikoff, C.P. (2001) Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2883-2894.
- Sels, J. *et al.* (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46:941-950.
- Sengupta-Gopalan, C. *et al.* (1985) Developmentally regulated expression of the bean β -phaseolin gene in tobacco seed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3320-3324.
- Shah, J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 365-371.
- Shah, J. *et al.* (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:69-78.
- Shan, L. *et al.* (2000) The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell* 12: 2323-2337.
- Shen, Q.H. *et al.* (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315:1098-1103.
- Shou, H. *et al.* (2004) Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J Exp Bot.* 55:1013-1019.

- Shulaev, V. *et al.* (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell* 7:1691-1701.
- Shulaev, V. *et al.* (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385:718-721.
- Shutov, A.D. & Bäumlein, H. (1999) Origin and evolution of seed storage globulins. In: Shewry, P.R. & Casey, R. (Ed.). *Seed proteins*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p.543-561.
- Siegrist, J. *et al.* (2000) T-Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56:95-106.
- Silfverberg-Dilworth, E. *et al.* (2005) Identification of functional apple scab resistance gene promoters. *Theor Appl Genet.* 110:1119-1126.
- Silva, M.C. (1996) Estudos histológicos e de ultraestrutura em interações de *Coffea* spp. e espécies não hospedeiras com *Hemileia vastatrix*, e de *Coffea arabica* com ferrugens não patogênicas. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa (Instituto Superior de Agronomia).
- Silva, M.C. *et al.* (1999) Cytochemistry of plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)-*Hemileia vastatrix* (race III). *Int. J. Plant Sci.* 160:79-91.
- Silva, M.C. *et al.* (2000). The role of peroxidase activity in the hypersensitive reaction of *Coffea arabica* plants with complete resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). In: International Symposium on Durable resistance: Key to sustainable agriculture, Ede-Wageningen, Holanda. Abstract, p.59.
- Silva, M.C. *et al.* (2002) Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60:169-183.
- Silva, M.C. *et al.* (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18:119-147.
- Silva, M.C. *et al.* (2008) Involvement of peroxidases in the hypersensitive reaction of coffee plants to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72:29-38.
- Simkin, A.J. *et al.* (2006) Oleosin gene family of *Coffea canephora*: quantitative expression analysis of five oleosin genes in developing and germinating coffee grain. *J. Plant Physiol.* 163:691-708.
- Simmons, C. (1994) The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -D-glucanases and 1,3; 1,4- β -D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:325-387.
- Singh, N.K. *et al.* (1989) Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol.* 90:1096-1101.
- Skibbe, M. *et al.* (2008) Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuata* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory. *Plant Cell* 20:1984-2000.
- Slightom, J.L. *et al.* (1983) Complete nucleotide sequence of a French bean storage protein gene: phaseolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 80:1897-1901.
- Smale, S.T. & Kadonaga, J.T. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72:449-479.
- Snyder, B. & Nicholson, R.L. (1990) Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science* 247:1637-1639.
- Somssich, I.E. *et al.* (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2427-2430.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. (2005) *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Spoel, S.H. *et al.* (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15:760-770.
- Spoel, S.H. *et al.* (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18842-18847.

- Stange, C. *et al.* (2008) *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biol. Res.* 41:289-301.
- Staskawicz, B.J. (2001) Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiol* 125:73-76.
- Stephen, T.S. & James, T. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.*, v.72, p.449-479, 2003.
- Sticher, L. *et al.* (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235-270.
- Stintzi, A. *et al.* (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75:87-706.
- Strobel, N.E. *et al.* (1996) Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZ_{PSS} protein. *Plant J* 9:431-439.
- Stuiver, M.H. & Custers, J.H.H.V. (2001) Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411:865-868.
- Subramaniam, R. *et al.* (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* 19:769-772.
- Summermatter, K. *et al.* (1995) Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 108:1379-1385.
- Sun, C. *et al.* (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* 15:2076-2092.
- Sun, X. *et al.* (2004) *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J.* 37:517-527.
- Tada, Y. *et al.* (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321:952-956.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology*, 4th edition, Sunderland, MA: Sinauer. 705p.
- Tameling, W.I.L. & Takken, F.L.W. (2007) Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol.* 121:243-255.
- Tang, X. *et al.* (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and the Pto kinase. *Science* 274:2060-2063.
- Terras, F.R.G. *et al.* (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem* 267:15301-15309.
- Thomma, B.P.H.J. *et al.* (2001) Different micro-organisms differentially induce *Arabidopsis* disease response pathways. *Plant Physiol. Biochem.* 39:673-680.
- Tian, L. *et al.* (2005) Analysis and use of the tobacco eIF4A-10 promoter elements for transgene expression. *Journal of Plant Physiology* 162:1355-1366.
- Torii, K.U. (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol.* 234:1-46.
- Turck, F. *et al.* (2004) Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene PcPR1-1 in parsley. *Plant Cell* 16:2573-2585.
- Tuskan, G.A. *et al.* (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596-1604.
- Uknes, S. *et al.* (1993a) Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:692-698.
- Uknes, S. *et al.* (1993b) Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* 5:159-169.
- Ülker, B. & Somssich, I.E. (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* 7:491-498.
- Van Der Vossen, H.A.M. (2001) Agronomy I: coffee breeding practices. In: Clarke, R.J. & Vitzthum, O.G. (Ed.). *Coffee: recent developments*. Blackwell Science, Oxford. p.184-201.
- Van Etten, H.D. *et al.* (1994) Two classes of plant antibiotics: "phytoalexins" versus "phytoanticipins". *Plant Cell* 6:1191-1192.
- Van Gijsegem, F. *et al.* (2000) *Ralstonia solanacearum* produces hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.* 36:249-260.

- Van Gijsegem, F. *et al.* (2002) Genetic dissection of the *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for the Hrp pilus assembly. *Mol. Microbiol.* 44:935-946.
- Van Loon, L.C. & Van Kammen, A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN' II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.
- Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:85-97.
- Van Loon, L.C. (1982) Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. In: Wood, R.K.S. (Ed.). *Active Defense Mechanisms in Plants*. 1st edition. Plenum Press, New York, p.247-273.
- Van Loon, L.C. *et al.* (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135-162.
- Van Verk, M.C. *et al.* (2008) A novel WRKY transcription factor is required for induction of PR-1A gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors. *Plant Physiol* 146:1983-1995.
- Van Wees, S.C.M. *et al.* (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8711-8716.
- Várzea, V.M.P. & Marques, D.V. (2005) Population variability of *Hemileia vastatrix* versus coffee durable resistance. In: Zambolim, L. *et al.* (Ed.). *Durable resistance to coffee leaf rust*. Viçosa, UFV. p.285-304.
- Várzea, V.M.P. *et al.* (2002) Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: Zambolim, L. (Ed.) *O estado da arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa, UFV. p.297-320.
- Vera, P. & Conejero, V. (1988) Pathogenesis-related proteins in tomato. P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology* 87:58-63.
- Vernooij, B. *et al.* (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6:959-965.
- Vidhyasekaran, P. (1997) Fungal pathogens in plants and crops. In: Decker M. (Ed.). *Molecular biology and host defense mechanisms*. New York. p.264-279.
- Vleeshouwers, V.G.A.A. *et al.* (2000) Does basal PR gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:35-42.
- Voelker, T. *et al.* (1987) Differences in expression between two seed *lectin* alleles obtained from normal and lectin-deficient beans are maintained in transgenic tobacco. *EMBO J.* 6:3571-3577.
- Vogele, R.T. & Mendgen, K. (2003) Rust haustorium: Nutrient uptake and beyond. *New Phytol.* 159:93-100.
- Voinnet, O. (2008) Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr Opin Plant Biol* 11:464-470.
- Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669-687.
- Vranová, E. *et al.* (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53:1227-1236.
- Walden, R. & Wingender, R. (1995) Gene-transfer and plant regeneration techniques. *Trends Biotechnology* 13:324-331.
- Wang, D. *et al.* (2006) A genome approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoSPathogen* 2:1042-1050.
- Wang, H.X. *et al.* (2001) Monocotyledonous plant genes and uses thereof. Patent: WO 0166755. Disponível: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2001066755>. Acesso em 11 de setembro de 2009.
- Wang, X. *et al.* (1996) The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2598-2602.
- Wang, Z. *et al.* (2000) Polygalacturonase gene expression in kiwifruit: relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant Molecular Biology* 42:317-328.
- Ward, E.R. *et al.* (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094.

- Ward, M.H. (1882) Researches on the life-history of *Hemileia vastatrix*, the fungus of the "Coffee-leaf Disease". Journal of the Linnaean Society (Botany) 19:299-335.
- Watson, J.D. et al (2008) Molecular Biology of the Gene, 6th edition, Pearson Benjamin Cummings. 841p.
- Wei, H. et al. (2003) Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. J Plant Physiol. 160:1241-1251.
- Wei, Y. et al. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defense response of barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Mol Biol 36:101-112.
- Weigel, R.R. et al. (2005) Interaction of *NIMIN1* with *NPR1* modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell 17:1279-1291.
- Wienand, U. et al. (1981) Isolation and characterization of a genomic sequence of maize coding for the *zein* gene. Molecular and General Genetics 182:440-444.
- Wierzbicki, A. et al. (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase IVb/V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. Cell 135:635-648.
- Wiethölter, N. et al. (2003) In vitro differentiation of haustorial mother cells of the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, triggered by the synergistic action of chemical and physical signals. Fungal Genet. Biol. 38:320-326.
- Wildermuth, G.B. et al. (2001) Crown depth and susceptibility to crown rot in wheat. Euphytica 122:397-405.
- Willits, M.G. & Ryals, J.A. (1998) Determining the relationship between salicylic acid levels and systemic acquired resistance induction in tobacco. Molecular Plant Microbe Interactions 11:795-800.
- Willmitzer, L. (1988) The use of transgenic plants to study plant gene expression. Trends in Genetics 4:13-18.
- Wilmink, A. et al. (1995) Activity of constitutive promoters in various species from the *Liliaceae*. Plant Mol. Biol. 28: 949-955.
- Wobus, U. et al. (1995) Control of seed storage protein gene expression: new aspects on an old story. Journal of Plant Physiology 145:592-599.
- Wu, L. & Birch, R.G. (2007) Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. Plant Biotechnol J. 5:109-117.
- Wulff, N.A. & Pascholati, S.F. (1999) Caracterização parcial de elicitores de fitoalexinas em sorgo isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. Fitopatologia Brasileira 24:428-435.
- Wycoff, K.L. et al. (1995). Stress activation of a bean *hydroxyproline-rich glycoprotein* promoter is superimposed on a pattern of tissue-specific developmental expression. Plant Physiol. 109:41-52.
- Xia, Y. (2004) Proteases in pathogenesis and plant defence. Cell Microbiology 6:905-913.
- Xiao, K. et al. (2005) Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. Mol Breeding 15:221-231.
- Xiao, S.Y. et al. (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. Science 291:118-120.
- Xie, Z. et al. (2005) Annotations and Functional Analyses of the Rice WRKY Gene Superfamily Reveal Positive and Negative Regulators of Abscisic Acid Signaling in Aleurone Cells. Plant Physiology 137:176-189.
- Xing, D.H. et al. (2008) Stress- and pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. Mol Plant 1:459-470.
- Xu, X. et al. (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. Plant Cell 18:1310-1326.
- Xu, Y.H. et al. (2004) Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- γ -cadinene synthase-A. Plant Physiol 135:507-515.
- Yalpani, N. et al. (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. Plant Cell 3:809-818.
- Yamamizo, C. et al. (2006) Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feed-back confers potato blight resistance. Plant Physiology 140:681-692.
- Yamamoto, S. et al. (2004) Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1679:279-287.

- Yamasaki, K. *et al.* (2005) Solution structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA binding domain. *Plant Cell* 17:944-956.
- Yang, P. & Chen, Z. (2001) A family of dispersed repetitive DNA sequences in tobacco contain clusters of W-box elements recognized by pathogen-induced WRKY DNA-binding proteins. *Plant Science* 161:655-664.
- Yang, P. *et al.* (1999) A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J* 18:141-149.
- Yasuda, M. *et al.* (2003) Pyrazolecarboxylic acid derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 67:2614-2620.
- Yevtushenko, D.P. *et al.* (2004) *Wound-inducible* promoter from poplar is responsive to fungal infection in transgenic potato. *Plant Science* 167:715-724.
- Yin, S. *et al.* (1997) Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression: characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter. *Plant Physiol* 115:437-451.
- Yoo, S.Y. *et al.* (2005) The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta* 221:523-530.
- Yu, D. *et al.* (1997) Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato. *Plant Physiol* 115:343-349.
- Yu, D. *et al.* (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* 13:1527-1539.
- Yu, Y.G. *et al.* (1996) Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:11751-11756.
- Yuan, Y. *et al.* (2007) Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotech. J.* 5:313-324.
- Zambolim, L. *et al.* (1997) *Café: Coffea arabica* L. controle de doenças. In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Ed.). *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Viçosa, UFV. p.83-180.
- Zambolim, L. *et al.* (2002) Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: Zambolim, L. (Ed.). *O estado da arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa, UFV. p.369-450.
- Zeier, J. (2005) Age-dependent variations of local and systemic defense responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiol Mol Plant Pathol* 66:30-39.
- Zhang, Y. & Wang, L. (2005) The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol Biol.* 5:1.
- Zhang, Y. *et al.* (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96:6523-6528.
- Zhang, Y. *et al.* (2003) Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* 15:2647-2653.
- Zhang, Y. *et al.* (2006) Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two *NPR1* paralogs. *Plant J.* 48:647-656.
- Zhang, Y. *et al.* (2008) Molecular cloning and characterization of *GhNPR1*, a gene implicated in pathogen responses from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Biosci Rep* 28:7-14.
- Zhang, Z. *et al.* (1995) Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J* 8:139-145.
- Zhang, Z. *et al.* (2008) Submergence-responsive microRNAs are potentially involved in the regulation of morphological and metabolic adaptations in maize root cells. *Ann Bot* 102:509-519.
- Zhang, Z.L. *et al.* (2004) A Rice WRKY Gene Encodes a Transcriptional Repressor of the Gibberellin Signaling Pathway in Aleurone Cells. *Plant Physiol.* 134:1500-1513.
- Zhao, J.T. *et al.* (2009) Molecular cloning and characterization of an ortholog of NPR1 gene from Dongguan Dajiao (*Musa* spp. ABB). *Plant Molecular Biology Reporter* 27: 243-249.
- Zheng, Z. & Murai, N. (1997) A distal promoter regions of the rice seed storage protein *glutelin* gene enhanced quantitative gene expression. *Plant Science* 128:59-65.

- Zheng, Z. *et al.* (2006) *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* 48:592-605.
- Zheng, Z. *et al.* (2007) Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biol* 7:2
- Zhou, F. *et al.* (1998) Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol* 117:33-41.
- Zhou, J.M. *et al.* (2000) *NPR1* differentially interacts with members of the *TGA/OBF* family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:191-202.
- Zhou, X.J. *et al.* (2002) A cotton cDNA (*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity. *Plant Sci* 162:629-636.
- Zou, X. *et al.* (2004) A *WRKY* gene from Creosote bush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279(53):55770-55779.

CAPÍTULO I

SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES CANDIDATOS VISANDO A CLONAGEM DE PROMOTORES TECIDO- ESPECÍFICOS E UBÍQUOS EM CAFÉ

I.1. Busca por genes candidatos

Desde as descobertas pioneiras de Mendel, os processos de crescimento, desenvolvimento e respostas dos organismos ao ambiente têm sido estudados como programas determinados pela expressão dos genes. Assim, uma das questões mais relevantes é entender como os elementos na seqüência de DNA são utilizados para a expressão de seus genes, em que condições cada produto gênico é sintetizado e, uma vez sintetizado, qual a sua função. Através de seqüências expressas (ESTs), obtidas a partir do seqüenciamento do DNA complementar (cDNA) derivado da transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA) de um organismo, tecido ou ainda de um único tipo celular, tornou-se possível a análise funcional dessa informação, não só para a identificação dos genes de interesse, mas também para conhecer o padrão de expressão gênica em diferentes condições ambientais (Barsalobres, 2004).

Diversos organismos de interesse científico e/ou econômico têm sido investigados através de ESTs (NCBI, 2009). No Brasil, o 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 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Recursos Genéticos e Biotecnologia, financiaram o projeto de obtenção de ESTs de café (*Coffee Genome Project*, <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Neste projeto, 37 bibliotecas de cDNA foram construídas a partir da extração de RNA total de diversos tecidos/órgãos sadios em diferentes estádios de desenvolvimento (calos, raízes, folhas, ramos, flores e frutos), bem como tecidos/órgão submetidos a estresse biótico e abiótico (pragas, doenças, frio, calor e seca) (Vieira *et al.*, 2006). As pesquisas se concentraram em cafés do tipo arábica. Entretanto, também foram obtidas seqüências de *C. canephora* e *C. racemosa*, espécies que apresentam resistência a algumas pragas e doenças bem como outras características de interesse agrônômico. Mais de 200.000 ESTs foram obtidas resultando em 17.982 *contigs*, que são

agrupamentos das ESTs de acordo com o alinhamento das seqüências consenso (no sentido 5'→3') (Telles & Da Silva, 2001), e 32.155 *singletons*, ESTs únicas, resultando na identificação de cerca de 33.000 unigenes diferentes (Vieira *et al.*, 2006).

A partir das informações geradas pelo projeto Genoma Café e do uso de metodologias da Biologia Molecular e Engenharia Genética, tornou-se possível a identificação e caracterização de genes do cafeeiro, desde seu modo de expressão, função e até mesmo seu nível de interação em eventos relacionados a estresses bióticos e abióticos. Assim, neste capítulo será apresentado como foram identificados os genes candidatos fruto e/ou semente-específicos, bem como os constitutivos.

I.1.1. Genes candidatos com padrão de expressão tecido-específico

A busca por ESTs com padrão de expressão tecido-específico foi realizada de duas formas:

A - análise *in silico* (*Northern* eletrônico) de transcritos com padrão de expressão específico de fruto e/ou semente a partir das informações disponíveis no banco de dados de ESTs de café (*Brazilian Coffee EST database*, www.lge.ibi.unicamp.br/cafe) (Vieira *et al.*, 2006).

B - análise de seqüências depositadas no GenBank relatadas como apresentando expressão específica em fruto e/ou semente em diferentes espécies vegetais, de acordo com relatos da literatura.

Na primeira análise foram encontrados seis *contigs* relacionados aos órgãos/tecidos de interesse (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. *Contigs* com expressão específica em fruto e/ou semente selecionados na análise *in silico* junto ao banco de ESTs de café.

<i>Contig</i>	Biblioteca FR1	Biblioteca FR2	Biblioteca FR4	Número Total de ESTs
1193	1	1	1	3
12094	5	28	1	34
1563	2	3	1	6
195	1	1	1	3
3913	1	2	1	4
6778	1	2	3	6

As bibliotecas FR1 e FR2 foram construídas a partir de cDNAs obtidos de botão floral, fruto do tipo chumbinho e frutos verdes da espécie *Coffea arabica*, sendo constituídas de 6.144 e 8.635 ESTs, respectivamente. A biblioteca FR4 foi constituída empregando cDNAs de *Coffea racemosa*, utilizando-se frutos em diferentes estágios de desenvolvimento (chumbinho, chumbão, fruto verde, fruto verde-cana e fruto maduro). Esta biblioteca apresenta 7.967 ESTs.

A partir dos *contigs* descritos na Tabela 1.1 procurou-se escolher as ESTs representativas de cada grupo (Tabela 1.2). Cada EST foi analisada quanto a sua similaridade no banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), considerando a qualidade e extensão das seqüências. Esta análise foi realizada com auxílio da ferramenta BLASTN e BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) adotando como critério de seleção o valor de E-value menor ou igual a e^{-5} .

Tabela 1.2. ESTs selecionadas em cada *contig* e similaridade obtida com seqüências depositadas no GenBank.

<i>Contig</i>	EST	Score	E-Value	gi*	BLASTX
1193	CA00-XX-FR1-041-D04-UT	765	0.0	15240225	F-box family protein
12094	CA00-XX-FR2-108-H04-SB	1288	0.0	13183175	2S albumin
1563	CA00-XX-FR2-067-B12-BF	1219	0.0	7488524	lipid transfer like protein
195	CA00-XX-FR1-063-F03-AB	1406	0.0	15220789	leucine-rich repeat family protein
3913	CA00-XX-FR2-071-C11-CE	1396	0.0	7673088	AN2 protein
6778	CA00-XX-FR2-035-H06-EP	1246	0.0		No hits found

* gi = número de identificação no GenBank

Além da análise *in silico* empregando os dados de *Northern* eletrônico do banco café, realizou-se em paralelo uma revisão de literatura na tentativa de encontrar genes com padrão de expressão específico nos órgãos/tecidos de interesse em diferentes espécies. Abaixo estão descritas as referências dos artigos consultados nessa análise (Tabela 1.3).

Tabela 1.3. Referências usadas para a busca de genes com padrão de expressão específico de fruto e/ou de semente.

Gene de Interesse	Espécie Vegetal	Literatura Consultada
desenvolvimento de fruto	tomate	Barg <i>et al.</i> , 2005
pectin methylesterase	tomate	Gaffe <i>et al.</i> , 1997
globulina	arroz	Qu & Takaiwa, 2004
	feijão, fava e ervilha	Zakharov <i>et al.</i> , 2004
	trigo sarraceno	Bharali & Chrungoo, 2003
endo- β -mannanase	café	Silva <i>et al.</i> , 2004
	café	Marraccini <i>et al.</i> , 2001
β -galactosidase	tomate	Smith <i>et al.</i> , 1998

A partir das seqüências publicadas nestes trabalhos, e disponíveis no GenBank, foram realizadas buscas por seqüências similares no banco de dados de ESTs do café (www.lge.ibi.unicamp.br/cafe). Para tal foram utilizadas as ferramentas de BLAST disponíveis no site. Nesse caso, as ESTs listadas na Tabela 1.4 foram encontradas.

Tabela 1.4. ESTs de café apresentando similaridade a genes com padrão de expressão específico de fruto e/ou semente em outras espécies vegetais.

<i>Contig</i>	EST*	Score	E-value	gi**	BLASTX
1535	CA00-XX-FR1-016-F04-CB	301	5.00E-82	29839279	11S globulin
	CA00-XX-FR1-018-C04-AB	171	2.00E-41	10804308	polygalacturonase
670	CA00-XX-FR1-031-D12-AC	379	e-103	1222551	pectin methylesterase
	CA00-XX-FR1-035-H05-EP	87	5.00E-16	15450208	AP2/ERF-domain protein
1535	CA00-XX-FR1-037-G05-CE	254	4.00E-67	1085982	legumin B4
1535	CA00-XX-FR1-067-F06-JE	244	3.00E-64	8118512	seed storage protein
2859	CA00-XX-FR1-071-C10-CB	408	e-113	7269686	β -mannan endohidrolase
2434	CA00-XX-FR2-089-B03-BM	119	4.00E-53	158998782	legumin
5287	CA00-XX-FR2-033-D05-EP	82	3.00E-15	21220367	pectinesterase
	CA00-XX-FR2-073-B03-BG	401	e-111	7939623	β -galactosidase
1535	CA00-XX-FR2-096-C04-SB	190	8.00E-48	4249568	glycinin
6508	CA00-XX-FR4-080-E04-JM	39	0.44	42742293	seed storage glutelin GluB-4
13769	CA00-XX-FR2-095-E08-BG	35	1.1	144291	β -mannanase
	CA00-XX-FR2-071-F04-CE	43	0.032	22052	vicilin storage protein
727	CA00-XX-FR4-077-E02-MC	361	2.00E-99	7435459	α -galactosidase
13108	CA00-XX-FR2-061-H09-JE	43	0.063	167384	Late embryogenesis abundant protein D-34

* = as ESTs que não estão agrupadas em um *contig* são *singletons*

** gi = número de identificação no GenBank

Uma vez obtidas as seqüências dos genes candidatos com expressão específica em fruto e/ou semente de café, com base na análise *in silico* e dados da literatura, *primers* foram desenhados para a validação biológica da expressão tecido-específica de cada candidato.

I.1.2. Genes candidatos com padrão de expressão ubíquo

Durante a busca dos genes candidatos com expressão tecido-específica também foi investigada a presença de genes ubíquos em café. Para tal foi utilizada a análise por *Northern* eletrônico no banco de dados de ESTs do café bem como as sequências de genes conhecidamente ubíquos disponíveis na literatura. Os *contigs* (e ESTs correspondentes) selecionados na análise *in silico* no banco de ESTs do café estão listados na Tabela 1.5.

Tabela 1.5. *Contigs* com padrão de expressão ubíquo selecionados através da análise *in silico* junto ao banco de ESTs do café, e respectivos ESTs.

<i>Contig</i>	Número de ESTs	EST*	gi**	BLASTX	E-value
12836	205	CA00-XX-LV9-023-H05-CC	100934	polyubiquitin	0.0
13771	142	CA00-XX-RT8-064-E07-EQ	7435791	cysteine proteinase	0.0
7855	155	CA00-XX-FB1-090-E04-SB	4539543	GAPDH	0.0

* EST com maior similaridade ao gene associado depositado no GenBank

** gi = número de identificação no GenBank

Paralelamente, a fim de auxiliar a busca por genes ubíquos em café foram utilizados os seguintes artigos (Tabela 1.6). Essa análise resultou na seleção de 14 *contigs* candidatos (Tabela 1.7).

Tabela 1.6. Referências usadas para a busca de genes com padrão de expressão ubíquo.

Literatura Consultada	Espécie Vegetal
Baum <i>et al.</i> , 1997	tomate
Meier <i>et al.</i> , 1997	tomate
Song <i>et al.</i> , 2000	algodão
Mizuno <i>et al.</i> , 2003	café
Papini-Terzi <i>et al.</i> , 2005	cana-de-açúcar

Tabela 1.7. ESTs de café relacionados com genes com padrão de expressão ubíquo.

<i>Contig</i>	EST*	gi**	BLASTX	E-value
11248	CA00-XX-LV5-077-C09-SB	8928415	beta-3 tubulin	0.0
10380	CA00-XX-FR2-100-H02-QH	15450213	malate dehydrogenase	0.0
10697	CA00-XX-LV8-027-E08-BM	32186906	actin 2	0.0
10895	CA00-XX-FR2-100-D09-QH	15450206	MYB transcription factor	4E-24
11229	CA00-XX-CS1-001-F04-EZ	20152209	PEP carboxylase	0.0
11546	CA00-XX-CB1-027-C09-BM	15240054	alcohol dehydrogenase	0.0
11906	CA00-XX-FR1-011-C09-CC	26453392	caffeine synthase 1	0.0
12157	CA00-XX-FR4-054-E12-SB	15450211	flavanone 3-hydroxylase	6E-62
12825	CA00-XX-FR4-027-E01-BM	4456641	rubisco	2E-90
1493	CA00-XX-LV5-042-D11-RF	8515888	14-3-3 protein	0.0
1649	CA00-XX-LV5-041-D09-QH	401247	Cytochrome B6	2e-98
196	CA00-XX-FR2-094-G02-EQ	26453376	theobromine synthase 2	0.0
6208	CA00-XX-FB1-091-A02-SB	445613	ribosomal protein L7	0.0
9745	CA00-XX-FR2-008-H12-JM	15450217	ribosomal protein S17	4E-32

* EST com maior similaridade ao gene associado no GenBank

** gi = número de identificação no GenBank

Uma vez selecionados os genes candidatos com padrão de expressão ubíquo, *primers* específicos foram desenhados para a validação biológica dos referidos candidatos.

I.1.3. Desenho dos *primers* para validação biológica dos genes candidatos com padrão de expressão tecido-específico e ubíquo

Primers específicos para cada gene candidato selecionado foram desenhados a partir dos *longESTs* com a finalidade de validar o padrão de expressão esperado por transcrição reversa (RT)-PCR. Os pares de *primers* foram selecionados manualmente com base na sequência de nucleotídeos das ESTs depositas no banco e testados nos programas *Gene Runner* Versão 3.05 (Copyright © 1994 Hastings Software, Inc., www.generunner.com) e *pDRAW32* Versão 1.0 (<http://www.acaclone.com>). O primeiro programa foi utilizado para a verificação de estruturas secundárias entre e dentro dos *primers*, como também para a verificação da

estabilidade química dos mesmos. O segundo programa foi utilizado para a certificação de que não havia sobreposição dos *primers* em uma mesma EST.

Os seguintes parâmetros foram adotados para o desenho dos *primers*:

- Tamanho: entre 18 e 25 pares de bases (pb) - ideal: 20 pb
- T_m (Temperature melting): entre 55 e 63 °C - ideal: 60 °C
- Quantidade de GC: entre 40% - 60% - ideal: 50%
- Tamanho médio dos fragmentos de 230 pb

Após o desenho dos *primers*, os mesmos foram submetidos a uma nova análise empregando BLASTN contra o banco de dados de ESTs do café a fim de verificar se estas seqüências reconheciam somente as seqüências (ESTs) de interesse. Uma vez que todos estes critérios foram cumpridos, foi solicitada a síntese dos mesmos.

I.1.4. Resultados obtidos

Ao fim desta atividade foram solicitados 39 pares de *primers*: 6 para candidatos considerados tecido-específicos segundo a análise *in silico*; 16 para candidatos considerados tecido-específicos segundo os relatos bibliográficos; 3 para candidatos considerados ubíquos segundo a análise *in silico* e 14 para candidatos considerados ubíquos segundo os relatos bibliográficos. Nas Tabelas 1.8 e 1.9 estão descritas as seqüências de todos os *primers* empregados na validação experimental dos genes candidatos selecionados empregando diferentes abordagens.

Tabela 1.8. Seqüências dos *primers* empregados nos ensaios de validação biológica dos candidatos tecido-específicos (fruto/semente).

NOME DO PRIMER/GENE	SEQÜÊNCIA	pb	Tm (°C)	%CG	Produto pb
F-BOX F	cgccatgtgactgagg	16	57,1	62,5	206
F-BOX R	catccagtcgctcacc	17	56,8	58,8	
ALBUMIN F	gcttcagccacggc	14	56,6	71,4	185
ALBUMIN R	ggcagcgggtacatg	15	56,9	66,7	
TURNIP F	caaacagccaactccgc	17	57	58,8	242
TURNIP R	ccagcaacagtaccacc	17	56,6	58,8	
LRR F	cgacactcatacagggc	17	56,9	58,8	240
LRR R	ggcccaaatccaccctc	17	58,4	64,7	
AN2 F	gtgtgttacgttagcag	18	57,7	55,6	198
AN2 R	ctgagatagttgagccaccg	20	59,5	55	
ND F	gagatgacggcaagaatgac	20	57,7	50	233
ND R	ctctggctctgtgttc	19	59,9	57,9	
α-GALAC F	gggtggaacagctgg	15	55,3	63,8	190
α-GALAC R	cttgctgtgaacataatctgc	22	56,1	67,6	
β-GALAC F	gggtgaggcatgggtg	16	59,6	67,5	339
β-GALAC R	cagaagggcactccagc	17	59,2	68,3	
β-MAN F	cccgtgcataactgacc	18	60,1	69,1	232
β-MAN R	gaaggctgatcgtggaacc	22	59,3	75	
β-MANNAN F	gtattgtcaggcagcag	18	54,3	66,8	93
β-MANNAN R	ggcacatcactggtc	15	53,5	61,1	
GLICININ F	cgaacgacaatgcatg	17	55,2	63,5	135
GLICININ R	ccctgctgagactgc	15	56	63,8	
GLUTELIN F	ctggtatctgagagcgtg	18	56,8	66,8	200
GLUTELIN R	cagcatccactagtccc	20	56,3	72,3	
LEG B4 F	caacaacagcaggagcagc	19	60,8	69,7	153
LEG B4 R	ggaggctgctgaggatagg	19	61,5	71,9	
PHATER F	ctatgctcacacacacagc	19	58,8	67,6	173
PHATER R	gccctcctctgccc	15	57,9	66,6	
PECTIN F	ggcgggtcatccaagc	19	59,6	74	154
PECTIN R	gaagacggcggcgc	14	60,1	65,5	
PME F	gtcgacgtggaatgtgatg	19	58,2	67,6	269
PME R	ggtccgctgatgtcac	19	57,2	71,9	
POLYGAL F	ccgagcacagaccagacc	19	62,4	74	190
POLYGAL R	gctctgggtcgggtc	16	58,4	67,5	
SSP F	cagcttgattgcagtccag	20	57,8	68,2	260
SSP R	ctgctcctgctgtgttg	19	57,5	69,7	
SP F	ccaagaacgccacaaggg	20	59,1	72,3	219
SP R	cgccctgttctctggtg	17	59,2	68,3	
VICILIN F	cctctgccgtctgc	18	55,8	71,3	129
VICILIN R	gcactagactcggcg	15	56,3	63,8	
GLOBULIN F	gcctccaacttagtgacg	18	56,5	66,8	344
GLOBULIN R	gcctcctgtcttcatacttc	21	58,8	70,8	
LEGUMIN F	caacaacagcaggagcagc	19	60,8	69,7	111
LEGUMIN R	gcgccagcagcaggg	15	63,6	69,3	

Tabela 1.9. Seqüências dos *primers* empregados nos ensaios de validação biológica dos candidatos ubíquos.

NOME DO PRIMER/GENE	SEQÜÊNCIA	pb	Tm (°C)	%CG	Produto pb
TUBULIN F	ccgtactctcaagctggc	18	59,4	61,1	155
TUBULIN R	ggagtcgtgggaatggg	17	58,5	64,7	
POLYUBIQ F	cctcaccggaagacgatc	19	58,8	57,9	313
POLYUBIQ R	ggatctggccttgacgttg	20	57,2	50	
14-3-3 F	gctgagcaggctgagag	17	59,7	64,7	245
14-3-3 R	gctcagcctcaatctttccc	20	59	55	
ADH F	ggtaatcgaggacgtgcag	24	59,8	50	162
ADH R	caactattcctgcagcctcatg	22	60,4	50	
ACTIN F	ggcaccttcaatcccaag	19	59	57,9	231
ACTIN R	ccagcaaggtcgagacg	17	59,3	64,7	
GAPDH F	gggatgatgtagaactgttg	22	57,8	45,5	231
GAPDH R	gtagactccaccacaaactc	20	56,5	50	
PEPC F	cgcaggcaggagtgg	15	59,6	73,3	268
PEPC R	cagcctccagatcgcc	17	59,1	64,7	
rRNA 1 F	ggagtacgccgagcag	16	59,4	68,8	247
rRNA 1 R	caacgtaaggctcaactcgg	20	59,4	55	
CYSTEIN F	gaaccgccctgatcc	16	58,5	68,8	373
CYSTEIN R	ccctgcctctgtacgg	16	58,5	68,8	
CITc F	gaagtggcaagttaggatggg	21	59	52,4	333
CITc R	ccacaaccaggaagtaggatac	22	58,8	50	
CCS1 F	gcggttgggtgactgaattgg	21	60,1	70,8	224
CCS1 R	cctccagatgtccctcaataacc	23	61,1	73,5	
FLAVAN F	catccatgccatcctcttg	19	57,5	67,6	206
FLAVAN R	gtgtccaccgatccc	20	58,9	78,5	
MYB F	ccagttccatgacatcttc	19	54,1	65,4	218
MYB R	cctctgccattgctgc	19	57,5	71,9	
NADP F	gggtctgaacggtcg	19	55,2	71,9	220
NADP R	gacgttacgcgatgc	15	54,5	61,1	
rRNA 2 F	gaagccggtggtcg	14	55,3	62,6	231
rRNA 2 R	ctgcagcggattgagg	16	56,7	64,9	
RUBISCO F	cccattccaagaagtccg	19	55,7	67,6	362
RUBISCO R	gcactgcacctgacg	15	57,6	63,8	
THEOBRO F	gttgctgattgggatgc	18	57,7	66,8	154
THEOBRO R	cggtagaagcttggcag	17	56,1	65,9	

I.2. Validação biológica e análise da expressão gênica

A validação experimental dos genes candidatos com padrão de expressão tecido-específico e ubíquo, respectivamente, foi realizada através de análises qualitativas e quantitativas da expressão gênica. Primeiramente foi realizado o isolamento do RNA total de diferentes tecidos/órgãos do cafeeiro. Os procedimentos de isolamento do RNA total foram baseados no protocolo do reagente TRIZOL (Invitrogen) e na metodologia de precipitação do RNA com cloreto de lítio (LiCl), de acordo com Mason & Schmidt (2002). Foram analisados os seguintes órgãos/tecidos de café: raiz, caule, folha, botão floral, flores e frutos. Foram utilizadas cinco diferentes fases do desenvolvimento do fruto: chumbinho, chumbão, fruto verde, fruto verde-cana e fruto vermelho. É importante ressaltar que a identificação destas fases baseou-se apenas na coloração dos frutos, enquanto que o tempo decorrido a partir do período reprodutivo [em dias após o florescimento (DAF)] foi ignorado. Os frutos vermelhos foram coletados inteiros e também separados em pericarpo e semente. A seguir estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento da pesquisa, os métodos para a obtenção de cDNA dos diferentes órgãos/tecidos de café, bem como os resultados obtidos.

I.2.1. Material vegetal empregado

Foram utilizadas plantas de café da espécie *Coffea arabica* dos cultivares Mundo Novo (IAC 388-17-1), e Catuaí Vermelho (IAC H2077-2-5-15; IAC H2077-2-5-24; IAC H2077-2-5-44; IAC H2077-2-5-72; IAC H2077-2-5-81; IAC H2077-2-5-99; IAC H2077-2-5-144). Estes cultivares foram gentilmente cedidos pela Dra. Mirian Perez Maluf do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café “Alcides Carvalho”, situado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e pelo Dr. Leandro Borges Lemos do Setor de Agricultura e Melhoramento Vegetal do Departamento de

Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) de Botucatu.

As plantas oferecidas pelo IAC foram obtidas através de sementes, técnica chamada de pé-franco, e na época apresentavam 3 meses de idade. Uma vez recebidas, as plantas foram separadas em folha, caule e raiz; e este material foi macerado em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A seguir, este material foi acondicionado no freezer -80 °C, até a extração do RNA total.

Na FCA foram obtidas amostras de botão floral, flores e dos diferentes estágios de desenvolvimento do fruto. Como relatado anteriormente, os frutos vermelhos também foram separados em pericarpo e semente. As plantas utilizadas encontram-se no campo experimental da Fazenda Lageado. Após a coleta, este material também foi macerado em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e em seguida armazenado no freezer -80 °C, até a extração do RNA total.

A seguir se encontra a Figura 1.1, a qual apresenta a escala de estádios fenológicos do cafeeiro arábica.



RAIZ

CAULE

FOLHA



BOTÃO FLORAL



FLOR



FRUTO CHUMBINHO



FRUTO CHUMBÃO (seta) PERICARPO (vermelho) e
SEMENTE (amarelo)



FRUTOS: VERDE,
VERDE-CANA e VERMELHO

Figura 1.1 - Amostra do material biológico utilizado no presente estudo.

I.2.2. Extração de RNA total

Para a extração do RNA total foram utilizados dois protocolos: o primeiro utilizando a metodologia descrita pelo fabricante do reagente TRIzol[®] (Invitrogen), e o segundo utilizando a precipitação do RNA total com LiCl, conforme protocolo descrito por Mason & Schmidt (2002).

Todas as amostras (raiz; caule; folha; botão floral; flores; frutos: chumbinho, chumbão, verde, verde-cana, vermelho, pericarpo e semente) foram maceradas em cadinho de 500 mL. O pó fino resultante foi coletado em tubos do tipo Falcon de 50 mL (Greiner - ALE), e armazenado em freezer -80 °C (Power Plus 2HP, Bio-Freezer, Forma Scientific).

I.2.2.1. Metodologia de extração utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen)

Amostras de cerca de 100 mg dos tecidos macerados foram colocadas em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL (Axygen). Para cada órgão/tecido realizou-se a extração de oito amostras separadamente, cujo produto foi posteriormente homogeneizado em um único tubo.

O RNA total das amostras foi extraído com 1 mL de ácido guanidínico tiocianato-fenol-clorofórmio (TRIzol[®], Invitrogen, cat. 15596-026), e os tubos foram agitados intensamente no *vortex* (Phoenix, Modelo AP-56 No. Série 9900), até que o tecido macerado se homogeneizasse com o reagente. Cada tubo foi deixado a temperatura ambiente por 15 minutos, sendo gentilmente invertido, cerca de 10 vezes, a cada 5 minutos, para que se desse uma melhor homogeneização do material. Esta solução foi centrifugada a 12.000 x g (Eppendorf, Centrifuge 5804 R) por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante transferido para um novo tubo (cerca de 1 ml).

A seguir foi adicionado ao tubo 20% (v/v) de clorofórmio puro (Vetec) e o mesmo imediatamente agitado. Após este procedimento o tubo foi incubado por 3 minutos a temperatura ambiente, sendo, a seguir, centrifugado novamente a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C.

A fase aquosa, 600 µL, foi transferida para um novo tubo no qual se realizou a precipitação do RNA. Para tal, adicionou-se 1 volume de isopropanol (Dinâmica). As amostras foram homogeneizadas através de inversões suaves e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período de incubação, realizou-se nova centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Ao fim deste processo, foi possível visualizar um sedimento no fundo do tubo, sendo o sobrenadante descartado.

O sedimento foi lavado uma vez com 1 mL de etanol 75% (v/v) [preparado com água tratada com 0,01% (v/v) de dietil pirocarbonato (DEPC, SIGMA, cat D5758)] e a amostra resultante foi misturada no *vortex* até que o sedimento se destacasse da parede do tubo. A amostra foi centrifugada a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante descartado novamente.

Após a lavagem, o sedimento de RNA foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos, com o tubo invertido sobre papel absorvente, e ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC]. As amostras de RNA total foram incubadas por 10 minutos a 60°C e, em seguida, armazenadas a -80°C até o momento do uso.

I.2.2.2. Metodologia de extração utilizando gradiente de cloreto de lítio (Mason & Schmidt, 2002)

Aproximadamente 4 g dos tecidos macerados foram colocados em tubos do tipo Falcon de 50 mL (Greiner - ALE). Realizou-se a extração de quatro amostras para cada órgão/tecido separadamente, e o produto foi posteriormente homogeneizado em um único tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL (Axygen).

O RNA total das amostras foi extraído com 10 mL de uma solução tampão livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC], pré-aquecida a 60°C contendo 2% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS, USB, cat. US75819), 2,5% (p/v) de polivinilpirrolidone (PVP-40, Sigma, cat. 9003-39-8), 0,2 M de Tris (Invitrogen, cat. 15504-020) pH 8,0, 25 mM de ácido etileno diamino tetraacético (EDTA, GIBCO-BRL, cat. 15576-028), 2 M de

cloreto de sódio (NaCl, USB, cat. 21618) e 2% (v/v) de β -mercaptoetanol (Plus One, Amersham Pharmacia, cat. 17-1317-01). Os tubos foram agitados intensamente no *vortex*, até que o tecido macerado fosse homogeneizado com a solução de extração de RNA.

Após este processo, foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (Vetec e Merck, respectivamente) na proporção 24:1 (v/v) e as soluções foram misturadas no *vortex* por no mínimo 5 minutos. Esta solução foi centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos a 10°C (Eppendorf, Centrifuge 5804 R), e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 50 mL (cerca de 8 ml). Este procedimento foi repetido por três vezes. Após a última centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 50 mL (cerca de 5 ml).

A seguir foi adicionado à fase aquosa 10 M de cloreto de lítio (LiCl, Sigma, cat. L-9650) livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC], de forma que sua concentração final na solução fosse de 2 M. Em seguida, os tubos foram acondicionados a 4°C por um período de 18 a 20 horas para viabilizar a precipitação do RNA.

No dia seguinte, os materiais foram centrifugados em ultracentrífuga a 39.000 x g (Hitachi Centrifuge, Type Himac CR 21, cat. S101031) por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido gentilmente em 500 μ L de uma solução tampão livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC], pré-aquecida a 60°C contendo 10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA, 1 M de NaCl e 0,5% (p/v) de SDS.

Após este procedimento, foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1 (v/v), e os tubos foram invertidos suavemente para que ocorresse a homogeneização da mistura. Em seguida, esta solução foi incubada a -20°C por 30 minutos e centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. A seguir, o sobrenadante (cerca de 500 μ l) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL.

Dois volumes de etanol absoluto foram adicionados à fase aquosa, sendo as amostras incubadas por 30 minutos a -80°C. Na seqüência, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C (Eppendorf, Centrifuge 5804 R). Ao fim deste processo, foi possível visualizar um sedimento no fundo do tubo, sendo o sobrenadante descartado.

O sedimento foi lavado uma vez com 1 mL de etanol 80% (v/v) [preparado com água tratada com 0,01% (v/v) de DEPC] e a amostra resultante foi misturada no *vortex* até que o sedimento se destacasse da parede do tubo. Procedeu-se então uma centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado novamente.

Após a lavagem, o sedimento de RNA foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos, com o tubo invertido sobre papel absorvente. Posteriormente, o sedimento foi ressuscitado em 50 µL de água livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC]. As amostras de RNA total foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento do uso.

I.2.3. Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total de cada amostra foi realizada em gel desnaturante composto de 1% (p/v) de agarose (Invitrogen, cat. 15510-027), 10% (v/v) de tampão MOPS 10X pH 7.0 livre de RNase [0,2 M de ácido 3-(N-morfolino)-propanos-sulfônico (MOPS, USB, cat. 19256), 50 mM de acetato de sódio anidro (NaAc, USB, cat. 21608), 0,5 M de EDTA pH 8.0 e 0,01% (v/v) de DEPC] e 5% (v/v) de formaldeído 37% (Vetec), também diluído em água tratada com 0,01% (v/v) de DEPC.

Durante o tempo de polimerização do gel, as amostras de RNA foram preparadas para a quantificação. Assim, uma alíquota (1 µL) de cada amostra de RNA foi adicionada a 5 µL de tampão desnaturante, e esta solução foi aquecida no termociclador a 60°C por 10 minutos (PTC 100 – Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.), e imediatamente incubada em gelo para ser aplicada no gel. O tampão desnaturante foi composto de 17,5% (v/v) de formaldeído 37% livre de RNase, 10% (v/v) de

MOPS 10X livre de RNase, 50% (v/v) de formamida deionizada (Bio-Rad, Hi-Di), 4% (v/v) de brometo de etídio (Invitrogen, cat. 15585-011), 4,5% (v/v) de água tratada com 0,01% (v/v) de DEPC e 10% de tampão de amostra. Este tampão, por sua vez, foi previamente preparado de 0,25% (p/v) de azul de bromofenol (Sigma, cat. B-5525), 0,25% (p/v) de xileno cianol FF (Aldrich, cat. 3359-40-10G) e 40% (p/v) de sacarose (Synth), em água tratada com 0,01% (v/v) de DEPC, e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

Após a aplicação das amostras no gel (6 µl), adicionou-se tampão MOPS 1X livre de RNase na cuba até que o gel estivesse totalmente submerso. Todas as corridas eletroforéticas foram realizadas à 130V por 30 minutos, utilizando Life Technologies, Model 250 como fonte de energia.

Após a eletroforese, o gel foi retirado da cuba, colocado sobre um transluminador com luz ultravioleta (Eagle-Eye II, Stratagene EagleSight), e fotodocumentado. A quantificação propriamente dita foi realizada através de comparação da intensidade das bandas produzidas pelas amostras com a intensidade das bandas produzidas por um padrão de massa (RNA Ladder 0,24 - 9,5 Kb, Invitrogen, cat. 15620-016), que foi também carregado no gel. Cada 3 µL deste marcador [RNA Ladder: tampão desnaturante, 1:1 (v/v)] equivale a aproximadamente 0,5 µg de RNA de cada componente do Ladder, o que pode ser visto no gel como 6 distintas bandas (Figura 1.2). Esta amostra recebeu o mesmo tratamento térmico que as amostras de RNA dos diferentes tecidos. Depois da quantificação o restante do RNA total foi armazenado a -80 °C.

O protocolo descrito pelo fabricante do reagente TRIzol® (Invitrogen) foi inicialmente utilizado para extração de RNA total de todas as amostras em estudo (raiz, caule, folha, botão floral, flores, diferentes estádios de desenvolvimento do fruto, pericarpo e semente). Este protocolo foi adotado como base devido a sua alta eficiência para os mais diversos tecidos e materiais vegetais, além de ser um método rápido e prático de extração de RNA total. Entretanto, para alguns tecidos específicos de café

esta metodologia não foi eficiente. Na Figura 1.2 está uma fotodocumentação do resultado de uma extração empregando-se Trizol.

Como pode ser observado na Figura 1.2, esse método não foi satisfatório para as amostras de raiz, flores, e dos diferentes estágios de desenvolvimento do fruto, incluindo pericarpo e semente. Nesse caso, nas amostras de raízes e flores, o RNA total sofreu uma grande oxidação logo na primeira etapa do processo (homogeneização do tecido macerado com o reagente). A grande sensibilidade desses tecidos pode ser resultante da ação de compostos fenólicos presentes nas plantas de café (Salgado *et al.*, 2009).

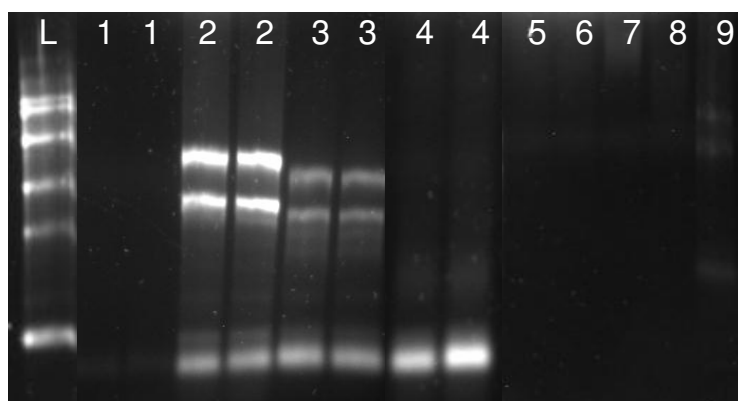


Figura 1.2 - Gel desnaturante de agarose 1% (p/v) visando verificar a integridade e quantificar o RNA total extraído de diferentes órgãos/tecidos de café empregando TRizol[®]. L: Ladder de RNA (0,5 µg); 1: raiz; 2: caule; 3: folha; 4: botão floral; 5: flores; 6: fruto verde; 7: fruto vermelho; 8: pericarpo; 9: semente.

Por outro lado, as amostras provenientes de frutos, pericarpo e semente, no final do processo de extração, apresentavam-se viscosas. De acordo com Romano & Brasileiro (1999), quando amostras de ácidos nucléicos têm um aspecto gelatinoso ou extremamente viscoso, há um excesso de polissacarídeos e um baixo rendimento na extração do material desejado (DNA ou RNA).

Assim, para a extração de RNA total dos referidos órgãos/tecidos adotou-se o protocolo descrito por Mason & Schmidt (2002), baseado na utilização de LiCl (2 M) para a precipitação do RNA total. Apesar de trabalhoso e moroso, esse protocolo foi o mais eficiente para a obtenção do RNA total de amostras de frutos, pericarpo e semente (Figura 1.3).

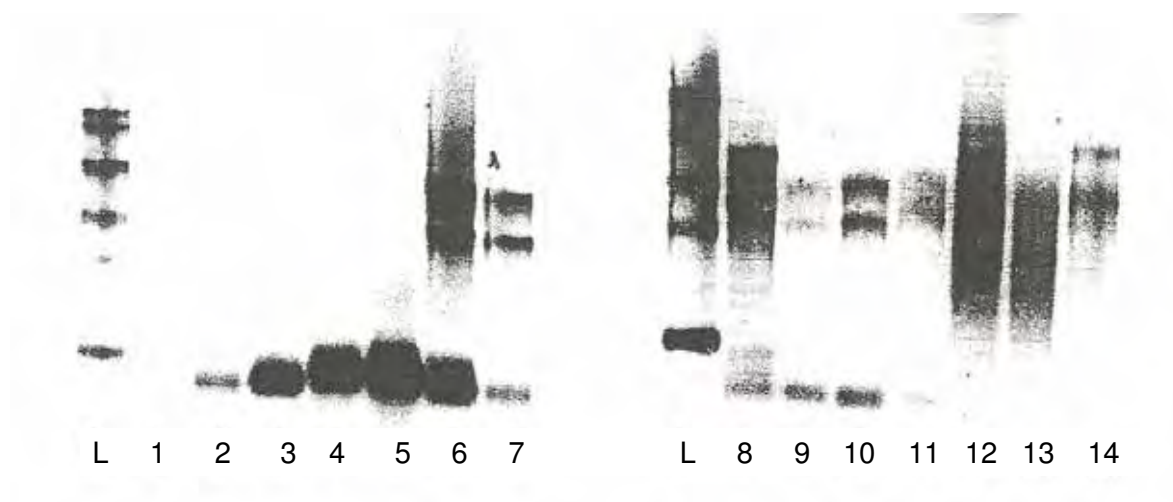


Figura 1.3 - Gel desnatante de agarose 1% (p/v) visando verificar a integridade e quantificar o RNA total extraído de diferentes órgãos/tecidos de café empregando LiCl. L: Ladder de RNA (0,5 μg); 1: raiz (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 2: caule (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 3: folha (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 4: botão verde (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 5: botão branco (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 6: flor antes da antese (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 7: flor depois da antese (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 8: chumbinho (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 9: chumbão (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 10: fruto verde (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 11: fruto verde-cana (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 12: fruto vermelho (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 13: pericarpo (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 14: semente (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

I.2.4. Preparo de RNA total livre de DNA

Para a análise qualitativa, cada amostra de RNA total foi submetida à digestão com a enzima DNase I (Fermentas, cat. EN0521). Este procedimento foi adotado para garantir que as análises subsequentes não fossem resultantes de uma possível contaminação de DNA genômico presente no RNA total. Para a obtenção de RNA livre de DNA foi utilizado 1 µg do RNA total, 1 µL de tampão de reação com MgCl₂ 10X (fornecido no kit) e 1 unidade da enzima Deoxyribonuclease I (1 U/µl). O volume final desta reação foi de 9 µl. Para que ocorresse a digestão, as amostras foram incubadas no termociclador (PTC 100 – Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.) a 37°C por 30 minutos. Para inibir a reação foi adicionado 1 µL de EDTA 25 mM (fornecido no kit) com posterior incubação a 65°C por 10 minutos. O volume final desta etapa foi de 10 µl, desta forma a concentração final de RNA por amostra era de 0,1 µg/µl.

I.2.5. Síntese de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA (DNA complementar ao RNA mensageiro - mRNA) foi utilizada a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen cat. 18080-093) de acordo com as instruções do fabricante. Para tal, 100 ng do RNA total livre de DNA foi adicionado a 50 µM de oligo dT₁₇VN (50 µM), 1 µL de dNTP mix 10 mM e 10 µL de água livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de dietil pirocarbonato (DEPC, SIGMA, cat. D5758)]. Esta solução foi incubada no termociclador a 65°C por 5 minutos, e então transferida para gelo e incubada por no mínimo 1 minuto. Em seguida foram adicionados 4 µL do tampão First-Strand 5X (fornecido no kit), 1 µL de ditiotretitol 0,1 M (DTT, fornecido no kit), 40 unidades de RNase out (40U/µl, Invitrogen, cat. 10777-019) e 200 unidades da enzima SuperScript III RT (200U/µl). Esta solução foi gentilmente homogeneizada com a pipeta e incubada no termociclador a 42°C por 1 hora. Após este período, a reação foi aquecida a 70°C por 15 minutos para inativar a enzima. O volume final da

reação de síntese de cDNA foi de 20 µl. Desta forma, a concentração de cada amostra foi de 5 ng/µL (as amostras foram posteriormente quantificadas em um NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, NanoDrop Technologies).

I.2.6. Validação da expressão dos genes candidatos por RT-PCR

Após a obtenção do cDNA das amostras de interesse, a expressão dos genes candidatos (ubíquos e tecido-específicos) selecionados anteriormente (ver item I.1) foi validada. Essa primeira validação foi feita de forma qualitativa, via RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*), de acordo com metodologia descrita por Hammond *et al.* (1997), detalhada a seguir.

I.2.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a validação da expressão dos genes candidatos (ubíquos e tecido-específicos), o cDNA (2 µl) das amostras de interesse foi submetido a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adicionando-se (concentração final): tampão de PCR (1X), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleotídeo (dNTP mix 10 mM), 0,2 µM de cada *primer* gene específico (forward e reverse, ver item I.1.4) e 2,5 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (5U/µl, Invitrogen, cat. 11615-010). O volume final da reação foi de 50 µl, o qual foi obtido adicionando-se água livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC].

A amplificação foi realizada em um termociclador com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 1,5 minutos a 72°C, seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

I.2.6.2. Análise dos resultados obtidos

Para confirmar a expressão dos genes candidatos nos diferentes órgãos/tecidos apontados pelas análises *in silico* ou pela literatura, os produtos de amplificação resultantes foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,7% (p/v), em tampão TBE 1X, contendo brometo de etídeo a uma concentração de 0,1% (v/v), a uma voltagem de 120 V por 2 horas.

Conforme pode ser observado na Figura 1.4, dos seis genes candidatos com padrão de expressão tecido-específico de acordo com a análise *in silico*, somente o gene *AN2* confirmou tal característica. Nenhum produto de amplificação foi observado para o gene *TURNIP* (codificador da *lipid transfer like protein*). Uma explicação para este resultado é que possivelmente os *primers* tenham sido validados *in silico* a partir de ESTs de *C. racemosa* (biblioteca FR4), resultando na ausência de expressão deste gene nas amostras em estudo. De acordo com Barros *et al.* (2008), este gene é expresso somente na fase final de maturação do fruto do cafeeiro arábica, especificamente no endosperma. Todos os demais candidatos analisados (*F-BOX*, *ALBUMIN*, *LRR*), exceção feita a um gene desconhecido (denominado *ND*), apresentaram um padrão ubíquo de expressão. Desta análise pôde-se concluir que os estudos *in silico* (*Northern* eletrônico) não são totalmente adequados para a busca de candidatos com padrão de expressão tecido-específico, uma vez que sua eficiência foi de 1/6 (17%).

Adicionalmente, dezesseis candidatos tecido-específicos foram selecionados de acordo com relatos na literatura. Destes, metade não apresentaram produtos de amplificação (*POLYGAL*, *PME*, β -*MANNAN*, *GLICININ*, α -*GALAC*, *GLUTELIN*, *PHATER*, *VICILIN*). Como relatado anteriormente, isso pode ser devido à ausência de cDNA relativo a esses genes nas amostras, ou então devido à falha no desenho do par de *primers* específicos. Por outro lado, oito (*GLOBULIN*, *LEGUMIN*, *SSP*, β -*MAN*, *PECTIN*, β -*GALAC*, *SP*, *LEG B4*) dos dezesseis candidatos testados (50%) foram específicos para fruto e/ou semente (Figura 1.5).

Mais uma vez é importante ressaltar que o desenvolvimento dos estádios fenológicos do fruto do cafeeiro arábica, a partir do período reprodutivo [em dias após o florescimento (DAF)], não foi avaliado. Outra coisa importante para ser lembrada é que frutos vermelhos foram coletados e de alguns frutos inteiros foi extraído o RNA total. A extração foi de oito amostras separadamente, cujo produto foi posteriormente homogeneizado em um único tubo. O experimento foi realizado em triplicata com amostras independentes. Para a extração do RNA total de pericarpo e semente foi utilizado um segundo conjunto de frutos vermelhos. Isto significa que as amostras de RNA total de frutos inteiros não foram obtidas dos mesmos frutos a partir dos quais se obteve o RNA total de pericarpo e semente. Assim, variações particulares no estágio de desenvolvimento de cada fruto resultaram, em alguns casos, em expressões gênicas aparentemente discordantes (ver Figura 1.5, onde se pode observar que o gene *LEGUMIN* é expresso no fruto vermelho, mas não tem expressão em pericarpo ou semente; e Figura 1.7, onde se pode observar que o gene *CITc* é expresso na semente mas não no fruto vermelho, que contém sementes).

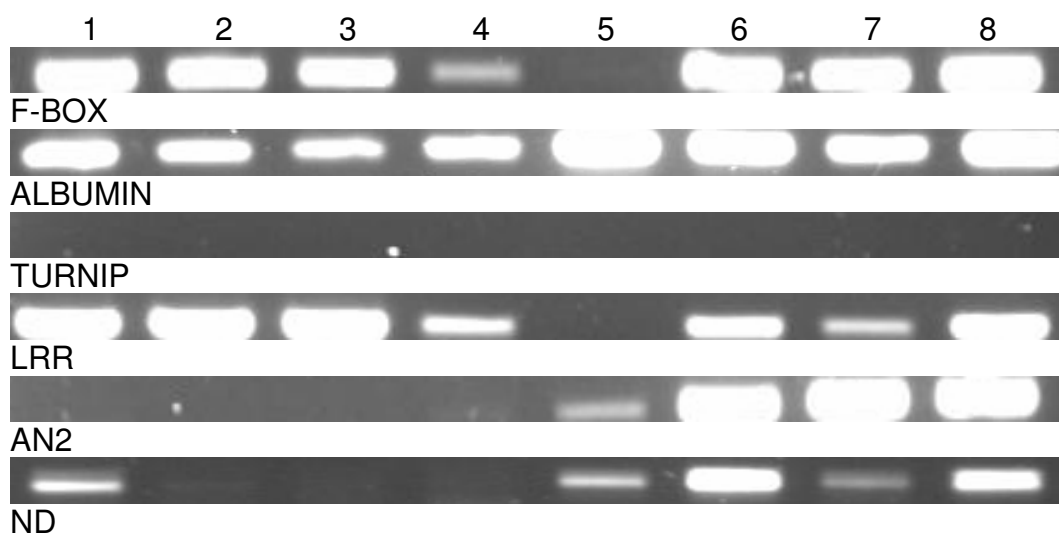


Figura 1.4 - Gel de agarose 1,7% (p/v) contendo os produtos de amplificação obtidos em diferentes órgãos/tecidos de café para os candidatos tecido-específicos selecionados *in silico*. 1: raiz; 2: caule; 3: folha; 4: botão floral; 5: fruto verde; 6: fruto vermelho; 7: pericarpo; 8: semente.

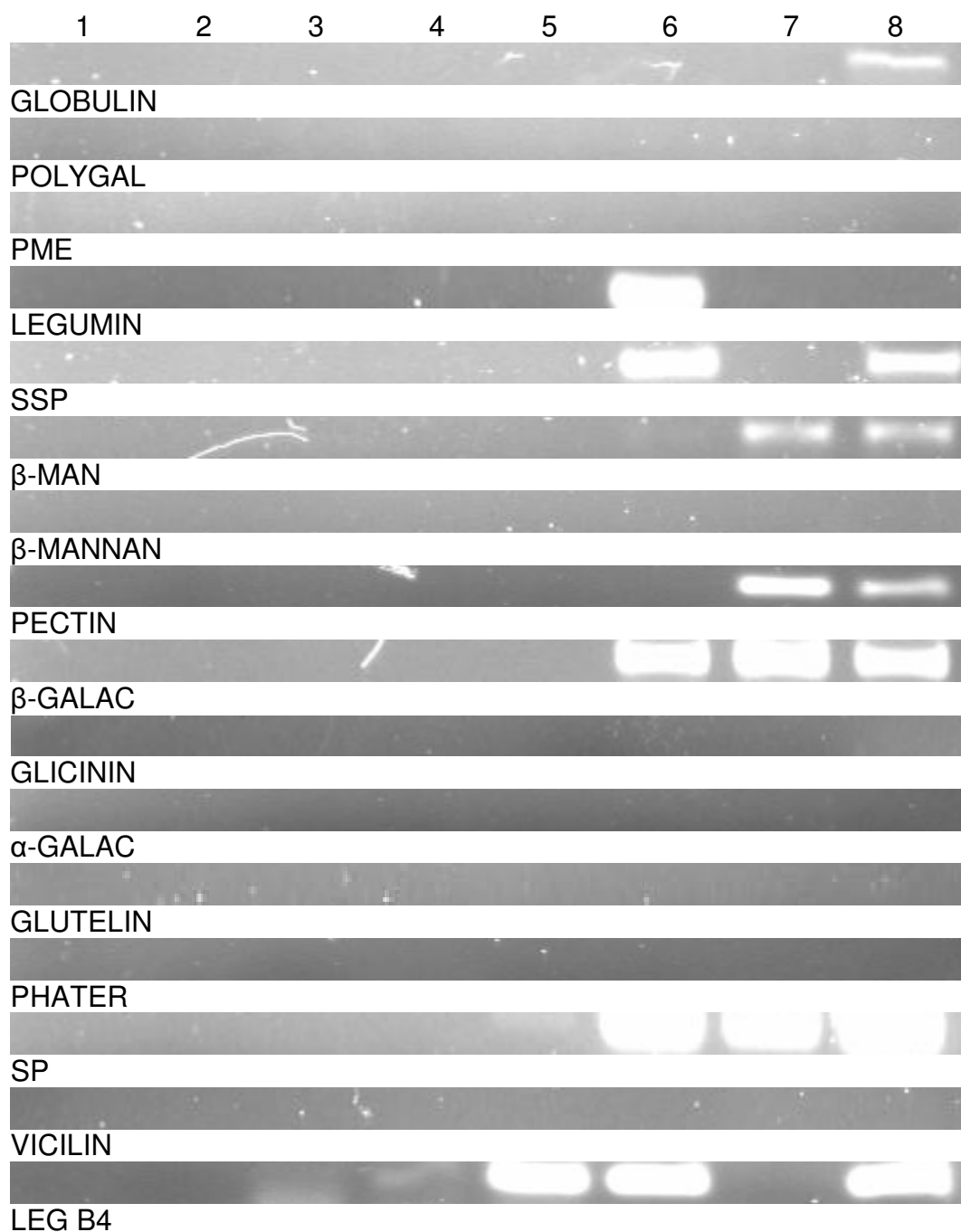


Figura 1.5 - Gel de agarose 1,7% (p/v) contendo os produtos de amplificação obtidos em diferentes órgãos/tecidos de café para os candidatos tecido-específicos selecionados na literatura. 1: raiz; 2: caule; 3: folha; 4: botão floral; 5: fruto verde; 6: fruto vermelho; 7: pericarpo; 8: semente.

Dessa maneira, com base nos resultados de validação obtidos nos ensaios de RT-PCR, nove genes com expressão específica em fruto/semente foram selecionados para dar continuidade ao trabalho, sendo estes: *AN2*, *GLOBULIN*, *LEGUMIN*, *SSP*, β -*MAN*, *PECTIN*, β -*GALAC*, *SP* e *LEG B4*.

Em relação aos candidatos ubíquos, 3 foram selecionados com base na análise *in silico* (*POLYUBIQ*, *CYSTEIN*, *GAPDH*). Nos ensaios de validação foi possível observar que estes candidatos são efetivamente ubíquos, uma vez que produtos de amplificação foram observados em todos os órgãos/tecidos testados (Figura 1.6).

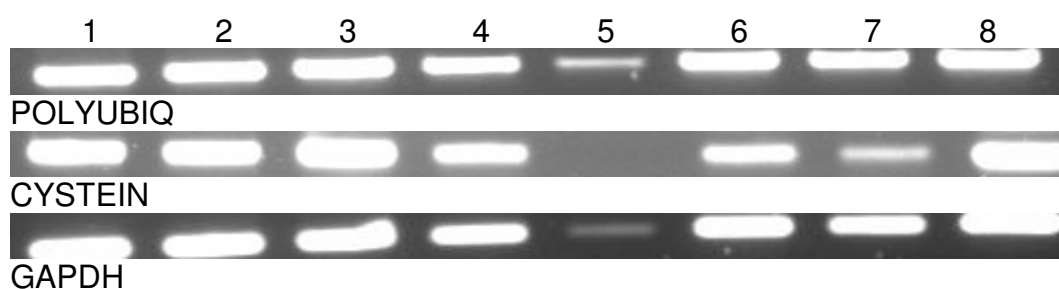


Figura 1.6 - Gel de agarose 1,7% (p/v) contendo os produtos de amplificação obtidos em diferentes órgãos/tecidos de café para os candidatos ubíquos selecionados *in silico*. 1: raiz; 2: caule; 3: folha; 4: botão floral; 5: fruto verde; 6: fruto vermelho; 7: pericarpo; 8: semente.

Adicionalmente, quatorze pares de *primers* foram desenhados com base na sequência de candidatos ubíquos selecionados segundo relatos bibliográficos. De acordo com os resultados apresentados na Figura 1.7, cinco destes não apresentaram amplificação (*FLAVAN*, *NADP*, *MYB*, *rRNA 2*, *THEOBRO*), três (*PEPC*, *CITc* e *RUBISCO*) apresentaram expressão gênica diferente da esperada, e seis apresentaram-se como ubíquos (*rRNA 1*, *TUBULIN*, *14-3-3*, *ADH*, *ACTIN*, *CCS1*).

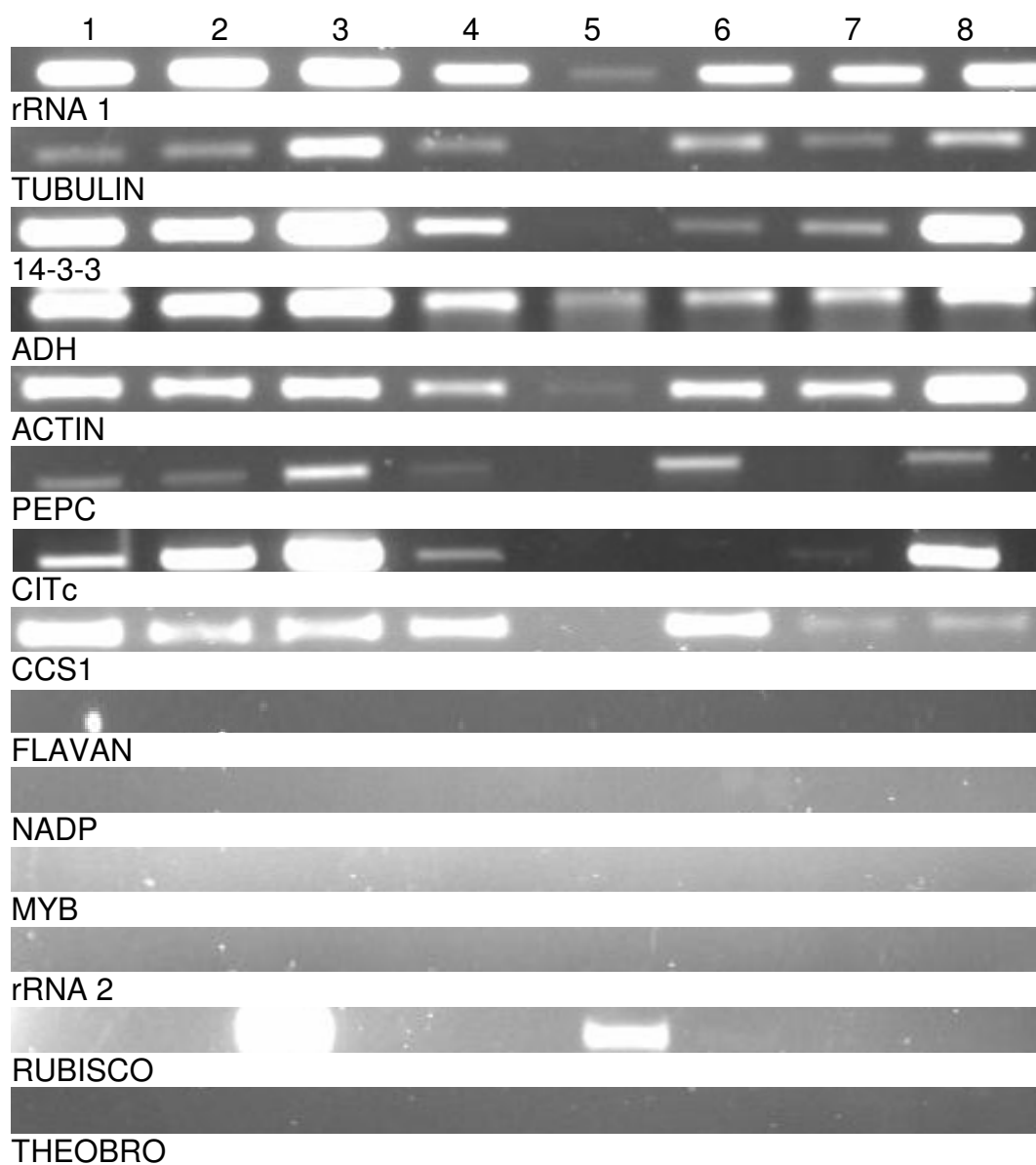


Figura 1.7 - Gel de agarose 1,7% (p/v) contendo os produtos de amplificação obtidos em diferentes órgãos/tecidos de café para os candidatos ubíquos selecionados segundo relatos da literatura. 1: raiz; 2: caule; 3: folha; 4: botão floral; 5: fruto verde; 6: fruto vermelho; 7: pericarpo; 8: semente.

A partir dos resultados obtidos por RT-PCR, um total de doze genes ubíquos foi selecionado para dar continuidade ao trabalho. Estes foram: *F-BOX*, *ALBUMIN*, *LRR*, *POLYUBIQ*, *CYSTEIN*, *GAPDH*, *rRNA 1*, *TUBULIN*, *14-3-3*, *ADH*, *ACTIN*, *CCS1*.

I.2.7. Quantificação da expressão dos genes validados por RT-PCR

Após a etapa de análise qualitativa da expressão dos genes candidatos por RT-PCR (etapa de validação), um estudo quantitativo da expressão destes genes foi empreendido. Esta análise foi realizada para um total de 12 candidatos ubíquos e 9 candidatos tecido-específicos (Tabela 1.10) empregando PCR semi-quantitativo e em tempo real (*Real Time-PCR*).

Tabela 1.10. Genes candidatos validados por RT-PCR.

Genes Ubíquos	Genes Específicos de Fruto e/ou Semente
<i>F-BOX</i>	<i>GLOBULIN</i>
<i>LRR</i>	<i>LEG B4</i>
<i>CYSTEIN</i>	<i>SSP</i>
<i>rRNA 1</i>	<i>β-MAN</i>
<i>GAPDH</i>	<i>SP</i>
<i>ACTIN</i>	<i>β-GALAC</i>
<i>14-3-3</i>	<i>PECTIN</i>
<i>POLYUBIQ</i>	<i>LEGUMIN</i>
<i>TUBULIN</i>	<i>AN2</i>
<i>ADH</i>	
<i>ALBUMIN</i>	
<i>CCS1</i>	

I.2.7.1. Desenho dos *primers*

Uma vez obtidas as seqüências das ESTs de interesse, estas foram analisadas, uma a uma, para a confecção dos *primers*. Os pares de *primers* foram desenhados com o auxílio do *Software Primer Express 2.0* (Applied Biosystems). O programa pDRAW32 Versão 1.0 (Revision 1.1.86 by

Kjeld Olesen, <http://www.acaclone.com>) foi utilizado para a certificação da não sobreposição dos *primers* em uma mesma EST. Os seguintes parâmetros foram adotados para o desenho dos *primers*:

- Tamanho: entre 26 e 30 pares de bases (pb) - ideal: 27 pb
- T_m (Temperature melting): entre 65 e 70 °C - ideal: 67 °C
- Quantidade de GC: entre 40 e 60% - ideal: 50%
- Tamanho médio dos fragmentos: entre 50 e 150 pb

Após o desenho dos *primers*, os mesmos foram submetidos a um BLASTN contra o banco de ESTs de café visando verificar se estas seqüências reconheciam somente a seqüência do gene de interesse. Uma vez que todos estes critérios foram cumpridos, foi solicitada a síntese dos mesmos. Na Tabela 1.11 está descrita as seqüências dos *primers* solicitados para a quantificação da expressão gênica dos candidatos ubíquos (12 genes) e tecido-específicos (9 genes), respectivamente. Estes *primers* foram utilizados tanto na análise semi-quantitativa como quantitativa.

Tabela 1.11. Sequências dos primers utilizados na avaliação da expressão gênica relativa dos genes candidatos.

PRIMER	TAM	Tm	CG	FORWARD	TAM	Tm	CG	REVERSE	PRO
TUBULIN	19	60	58	TGAGCCCGGTACCATGGAT	20	59	55	GGCGGAAGATCTGACCCATA	57
POLYUBIQ	24	58	42	CGCTGACTACAATATCCAAAAGGA	19	58	58	CTGCATTCACCCCTCAGA	67
ADH	17	58	65	CCTCAAGCCGGCGAAGT	21	59	57	CTGTATGGCAGAGGGCAGTGT	55
ACTIN	22	58	41	ACCTCACAGATCACCTCATGAAGA	21	59	52	TCTGCTGAGGTGGTGAACCTGT	82
GAPDH	17	58	53	TTGAAGGGCGGTGCAAA	20	59	50	AACATGGGTGCATCCTTGCT	59
rRNA 1	24	60	42	CATTCGAGGTATCAATGCTATGCA	19	58	58	TGTCTCAGGGCGAGAAGCT	66
ALBUMIN	20	58	55	GGCCACCCGAACCTACCATAA	21	59	57	CTTGTCTGGTCCCTCCTCAT	59
CCS1	20	58	55	CAATGCCCGGCTCTTTCTAC	27	59	33	GTAAACAAGAGTGTAAAAAATGCATGGA	68
F-BOX	23	58	43	ATGGTGAACGTCGAGAGAATTC	20	59	55	GCATCCAGTCGCTTCACCTT	60
LRR	23	59	48	CAGCAATTCCTGACAGAGGTGTT	24	58	38	TGTCGAAATTTGGTGTACACAGTAA	69
CYSTEIN	18	59	61	GCGATCGTACCGTCCAA	25	58	40	CTTTTTCTCTCCAGTCAATGGAGTT	63
14-3-3	22	58	45	TGTGCTCTTTAGCTTCCAAACG	28	58	36	CTTCAAGAGACATATTGCTTACTCAA	75
GLOBULIN	29	59	31	CCAACTATATGTGTGAATCTAATTCCAAA	23	59	43	AAGGCTAGGATTGCCATGTCTTT	71
LEG B4	20	60	50	TGGAAGACTTTCGGCATTGC	21	58	43	TCGCTGAAATTTGGAAAGAG	69
SSP	23	59	48	TCCTGGTTTCACTCAGTGGACAT	23	60	48	CATCAAGAAGTGGCAGCAGTGACA	68
β -MAN	20	59	50	AATGAACCCCGCTGCATAAC	27	59	33	AAGTTGACATTTCTTCAATCCAGTCTT	70
SP	17	59	71	GGCGTCTCTGCGTCTGT	21	60	52	CAACACCGAGGCTCTGATTCA	58
β -GALAC	21	60	52	GGCTAAAACCCGAGTGGAAAACG	19	59	53	TGTTGGATCCCCCTCCCAT	59
PECTIN	18	59	61	CGGGTGGGCTCTGATTTG	20	60	55	TGTCCTTGGTGGGCCAGGATA	58
LEGMIN	22	58	36	TGGTAATTGCAGAAATGCCATTT	22	58	45	ACAGGGCACTATGTGCATTGAT	61
AN2	24	60	46	CCGGTAACACACAAACTACACCACAA	20	58	55	TCCAAGGACGAGGCTTCACT	63

Abreviações: TAM: tamanho do primer; Tm: temperatura de anelamento (°C); CG: conteúdo em CG (%); PRO: tamanho do amplicon (pb)

I.2.7.2. Análise semi-quantitativa da expressão gênica

Este método foi inicialmente utilizado para estimar os níveis de expressão dos candidatos ubíquos em amostras de raiz, caule, folha, flor e fruto. É importante destacar que as amostras de flor e fruto usadas nesses ensaios eram compostas por um pool de material coletado. A amostra de flor continha quantidades iguais de cDNA proveniente de amostras de botão floral e flores em diferentes fases da antese, e a de fruto correspondia ao conjunto (quantidades iguais de cDNA de cada órgão/tecido): chumbinho, chumbão, verde, verde-cana, vermelho, pericarpo e semente. A concentração final do cDNA de todas as amostras foi de 5 ng/μl. Foi utilizado como controle interno/referência a amplificação no pool de todos os tecidos amostrados.

Para a avaliação semi-quantitativa da expressão gênica, o cDNA (25 ng) das amostras de interesse foi submetido à reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adicionando-se (concentração final): tampão de PCR (1X), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleotídeo (dNTP mix 10 mM), 0,2 μM de cada *primer* gene específico (forward e reverse) e 2,5 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (5U/μl, Invitrogen, cat. 11615-010). O volume final da reação foi de 10 μl, o qual foi obtido adicionando-se água livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC].

A amplificação foi realizada em um termociclador (PTC 100 – Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.), com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 1,5 minutos a 72 °C, seguido de um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Após a reação de PCR foram adicionados 5 μL de tampão de carregamento (TC) nas amostras [40% (p/v) de sacarose (USB cat. 21938) e 0,1% (p/v) de azul de bromofenol (Sigma cat. B-5525) em 10 mL de TE (1M de Tris-HCl pH8,0 e 0,5mM de EDTA pH 8,0 na proporção de 10:0,1, pH 8,0)]. Uma alíquota de 15 μL (10 μL da reação e 5 μL do TC) foi aplicada no gel.

O gel foi composto de 10% (v/v) de TBE 10X, 26,7% (v/v) de solução estoque de acrilamida 30%, 0,35% (v/v) de TEMED (Pharmacia Biotech cat. 17-1312-01) e 0,7%(v/v) de persulfato de amônio a 10% (v/v) em água deionizada, sendo a solução estoque de acrilamida 30% composta por 29% (p/v) de acrilamida (USB cat. 75820) e 1% (p/v) de bisacrilamida (USB cat. 75821) em água deionizada. O TBE 10X foi composto por 10,82% (p/v) de Tris base (Invitrogen), 5,52% (p/v) de ácido bórico (QM cat. 12060.0500) e 0,744% (p/v) de EDTA (Gibco BRL) em água deionizada.

A eletroforese foi conduzida em cuba vertical (BioRad, Model Mini-Protean) com tampão TBE 1X. Todas as corridas eletroforéticas foram realizadas a 120V por uma hora, utilizando Life Technologies, Model 250 como fonte de energia. A coloração do gel foi realizada utilizando-se nitrato de prata, segundo o protocolo proposto por Creste (2002). Os géis foram colocados contra um fundo branco e fotografados com câmera digital Olympus FE-120.

I.2.7.3. Análise quantitativa da expressão gênica: PCR em tempo real

Para a análise da PCR em Tempo Real, o cDNA das amostras de interesse foi diluído na proporção de 1:10, adicionando-se água livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC]. Assim, a concentração do cDNA utilizada na reação descrita a seguir foi de 0,7 ng por reação.

Para a quantificação da expressão dos genes candidatos (ubíquos e tecido-específicos) foi utilizado o kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMixUDG* (Invitrogen cat. 11733-038). O cDNA das amostras de interesse foi submetido à reação adicionando-se (concentração final): 5 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMixUDG [1,5 de unidades da enzima Platinum Taq DNA Polimerase, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 200 µM dGTP, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dUTP, 1 unidade de UDG (uracil-DNA glycosylase)], 0,5 µM de cada *primer* gene específico (forward e reverse) e 1X ROX *Reference Dye* [fornecido pelo kit na concentração de 50X, que contém glicina conjugada com 5-carboxy-X-

rhodamine, succinimidyl ester (25 μ M) em 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 0.1 mM EDTA, e 0.01% Tween® 20]. O volume final da reação foi de 10 μ l, o qual foi obtido adicionando-se água livre de RNase [tratada com 0,01% (v/v) de DEPC]. Cada reação foi feita em triplicata para cada amostra. O controle negativo foi realizado adicionando-se água livre de RNase ao invés de cDNA; tal procedimento foi adotado para a certificação da ausência de qualquer tipo de contaminação.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador óptico (ABI Prism 7300 Sequence Detection System; Applied Biosystems, USA) com um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos para ativação da UDG. Após este período a enzima foi destruída e o cDNA foi desnaturado pelo aquecimento a 95°C por 2 minutos. Em seguida, iniciou-se propriamente a PCR, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C. No final do processo, para a quantificação dos dados, foi realizado um ciclo de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C. É nesta última fase que o programa 7300 *System Software* (Applied Biosystems) apresenta a curva de dissociação das amostras, que representa de forma gráfica a especificidade dos amplicons presentes em cada amostra, permitindo também a observação de dímeros de *primers* em alguns casos, como será mostrado a seguir.

Para a quantificação da expressão gênica, os dados ópticos foram exportados do programa 7300 System Software como arquivos *.csv e importados no MS Excel (*.xls). Uma vez definido o Cycle threshold (Ct), linha que corta todas as curvas de amplificação de um mesmo gene, quatro pontos na fase exponencial da amplificação gênica, incluindo o Ct, foram transformados para o formato logarítmico (Marino *et al.*, 2003).

Os dados transformados foram analisados no programa SAS versão 8e (SAS Institute, Cary, NC, USA) para determinação da curva de regressão linear (Ramakers *et al.*, 2003), cuja expressão matemática é:

$$y = a + bx \text{ (função da reta)}$$

onde: y = variável dependente, x = variável independente, enquanto a e b são constantes. Essa última constante é denominada *coeficiente de regressão* ou *slope*, enquanto a constante a é designada como *intercepto*, expressando o valor de y quando x é igual a zero.

Assim, o programa SAS calculou os valores do *intercepto*, *slope*, eficiência da PCR ($E=10^{\text{slope}}$), bem como os respectivos erros padrão e coeficientes de correlação (R^2). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi determinada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak & Schmittgen (2001) com modificações.

Para análise dos genes ubíquos, utilizou-se o seguinte coeficiente:

$$L = E^{\Delta Ct}$$

onde: L = nível de expressão, E = eficiência da PCR e $\Delta Ct = Ct \text{ amostra} - Ct \text{ pool das amostras (referencia interna de controle)}$

Para análise dos genes tecido-específicos, o seguinte coeficiente foi adotado:

$$L = \frac{E^{\Delta Ct \text{ gene específico}}}{E^{\Delta Ct \text{ gene de referência}}}$$

onde: L = nível de expressão, E = eficiência da PCR e $\Delta Ct = Ct \text{ amostra} - Ct \text{ pool das amostras (referência interna de controle)}$, o gene de referência (controle externo da expressão gênica que também pode ser chamado de normalizador) adotado para esta análise foi o ubíquo que apresentou menor variação entre órgãos.

I.2.7.4. Resultados obtidos para os candidatos com padrão de expressão ubíquo

A expressão gênica de cada candidato ubíquo foi analisada nos seguintes órgãos: raiz, caule, folha, flor e fruto. Como relatado anteriormente, as amostras de flor e fruto, para os genes ubíquos, foram compostas por um pool de material coletado.

Doze genes candidatos ubíquos foram avaliados nos ensaios de PCR semi-quantitativo (Figura 1.8). A partir destes resultados, um gene (*ALBUMIN*) mostrou um perfil de expressão tecido-específico (como identificado pelas análises *in silico*), ao invés de ubíquo como detectado nos ensaios anteriores de validação biológica. Dois genes (*F-BOX* e *TUBULIN*) apresentaram mais de um produto amplificado, o que pode sugerir que os *primers* desenhados se hibridizaram em uma região não conservada, sendo observada a amplificação de possíveis isoformas (dados não mostrados). Adicionalmente, um *primer* (LRR) apresentou amplificação específica no controle negativo utilizando água (amostra 7 na Figura 1.8). Assim, estes quatro genes foram descartados para isolamento das regiões promotoras, mas foram avaliados por PCR em tempo real para a verificação destes dados.

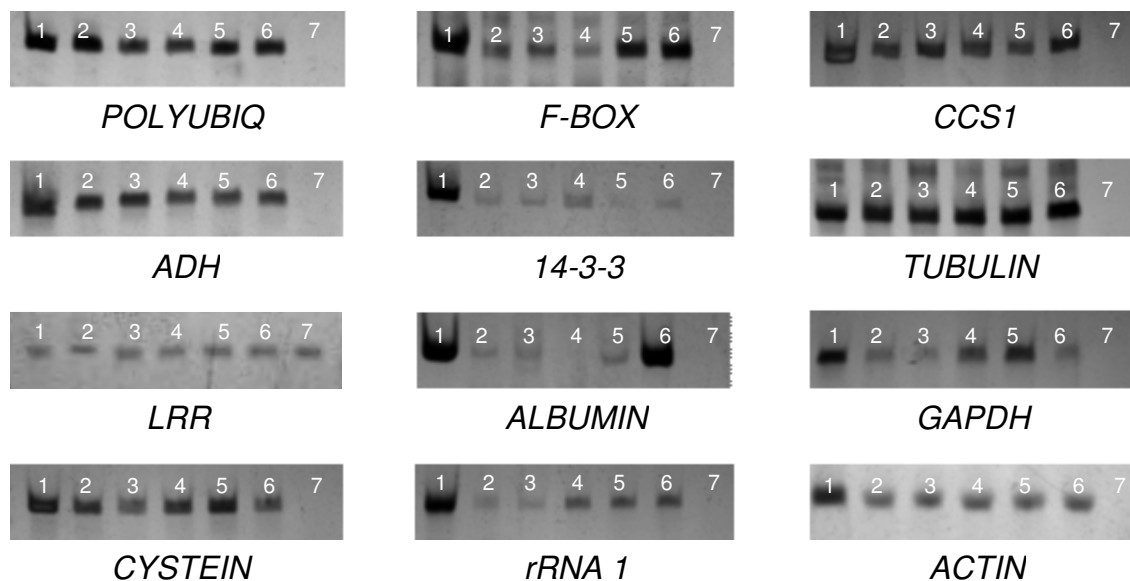


Figura 1.8 - Gel de acrilamida 8% (p/v) contendo os produtos de amplificação dos candidatos ubíquos em diferentes órgãos de café. 1: pool contendo todas as amostras; 2: raiz; 3: caule; 4: folha; 5: flor; 6: fruto; 7: controle negativo (água foi adicionada ao invés de amostra de cDNA).

Em relação aos demais genes, cinco mostraram-se fortemente constitutivos, a saber: *POLYUBIQ*, *CYSTEIN*, *ADH*, *ACTIN* e *CCS1*. Os três últimos genes (*GAPDH*, *14-3-3* e *rRNA 1*) apresentaram um perfil de expressão gênica alterado nos diferentes órgãos/tecidos analisados. É importante ressaltar que esta variação pode ter ocorrido por algum erro no procedimento da técnica ou pode realmente ser decorrente da variação da expressão nas amostras analisadas.

Os mesmos doze pares de *primers* foram testados em PCR em tempo real para a verificação da expressão relativa dos genes candidatos com padrão ubíquo de expressão. Para os ensaios de PCR em tempo real um terceiro conjunto de cDNA das amostras de interesse foi sintetizado, ou seja, foram utilizados cDNAs independentes daqueles empregados na metodologia de RT-PCR e PCR semi-quantitativo.

Os valores de fluorescência emitidos por ciclo de reação estão apresentados na Figura 1.9. É possível observar que somente o gene *ALBUMIN* (Figura 1.9f) apresentou uma expressão diferenciada entre os órgãos/tecidos testados, o que corrobora os dados obtidos pelo PCR semi-quantitativo e análises *in silico*.

A partir das curvas de amplificação (Figura 1.9) pode ser sugerido que os genes que apresentam maior variação na expressão gênica, baseado no valor do Ct, entre os diferentes órgãos/tecidos são: *POLYUBIQ* (Figura 1.9a) e *F-BOX* (Figura 1.9j). Vale a pena lembrar que o gene *F-BOX* apresentou vários amplicons pela metodologia do PCR semi-quantitativo.

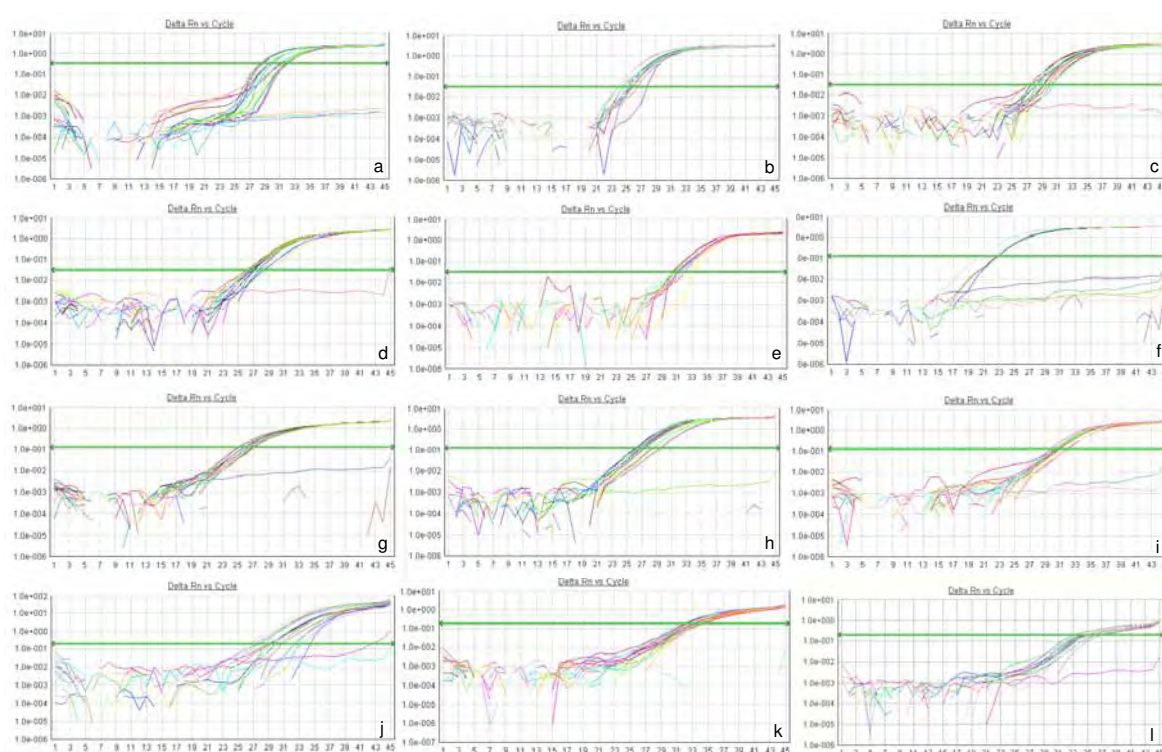


Figura 1.9 - Valores de fluorescência emitidos por ciclo de reação. a) *POLYUBIQ*, b) *CCS1*, c) *ADH*, d) *14-3-3*, e) *LRR*, f) *ALBUMIN*, g) *GAPDH*, h) *CYSTEIN*, i) *rRNA 1*, j) *F-BOX*, k) *TUBULIN*, l) *ACTIN*. A linha horizontal verde representa o Cycle threshold (Ct) para cada gene.

Para provar a especificidade dos produtos amplificados, a Figura 1.10 apresenta as curvas de dissociação obtidas para cada candidato testado. Com base em tais curvas é possível constatar que somente o gene *LRR* (Figura 1.10e) apresentou amplificação no controle negativo. Este fato também foi observado nos ensaios de PCR semi-quantitativo, o que sugere que houve a formação e amplificação de um dímero de *primers*. Na Figura 1.9e é possível notar que a curva de amplificação deste gene em todas as amostras é perfeitamente similar, mais uma vez corroborando nossas observações. Na Figura 1.10 também pode ser observado que os genes *F-BOX* (Figura 1.10j) e *TUBULIN* (Figura 1.10j) apresentam mais de um produto amplificado, como era esperado. Assim, é possível concluir que a técnica de PCR semi-quantitativo pode ser utilizada em análises prévias de expressão gênica. Contudo, a técnica de PCR em tempo real é importante porque permite que os fótons emitidos, principalmente na fase da curva de dissociação, sejam analisados. Se observarmos as escalas apresentadas na curva de dissociação (Figura 1.10) notar-se-á que existe um valor médio para a emissão destes fótons (0,28) e que a temperatura de dissociação é específica para cada gene. Desta forma foi possível certificar a precisão da técnica, dos dados e, principalmente, dos materiais amostrados.

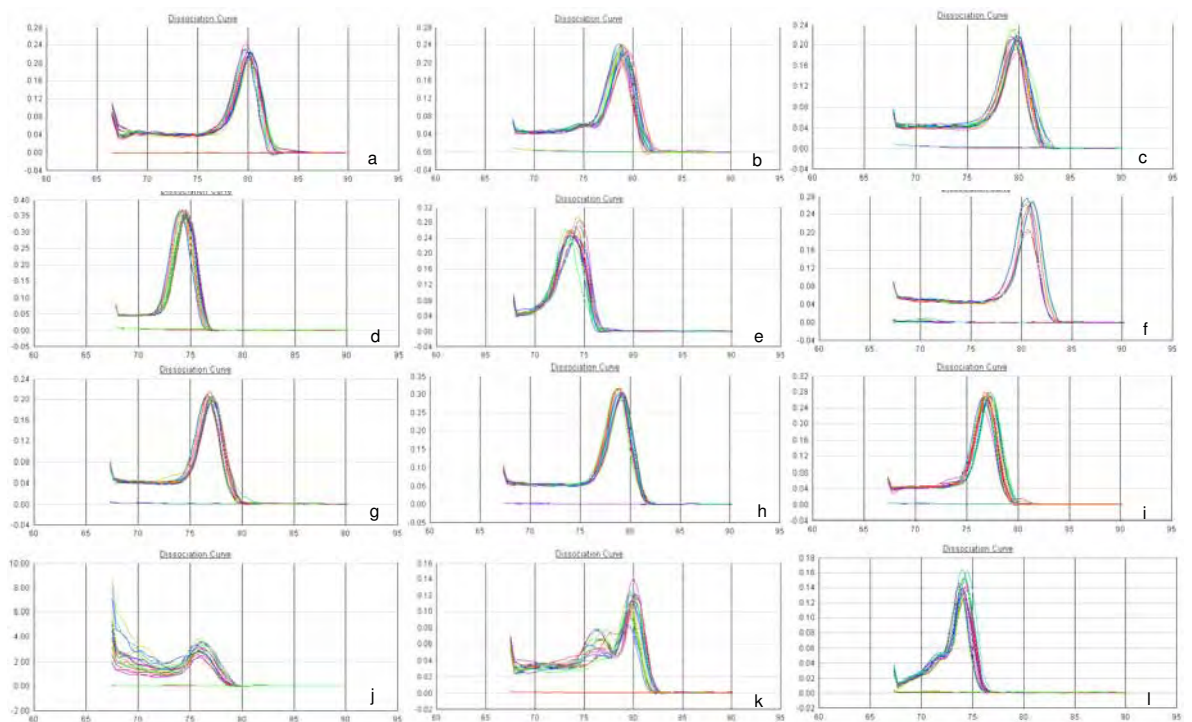


Figura 1.10 - Curvas de dissociação obtidas para os genes candidatos ubíquos analisados. a) *POLYUBIQ*, b) *CCS1*, c) *ADH*, d) *14-3-3*, e) *LRR*, f) *ALBUMIN*, g) *GAPDH*, h) *CYSTEIN*, i) *rRNA 1*, j) *F-BOX*, k) *TUBULIN*, l) *ACTIN*.

A partir dos arquivos *.csv emitidos pelo programa 7300 System Software (Applied Biosystems), estes foram importados no MS Excel (*.xls) e uma série de análises foi realizada.

A seguir serão apresentados, na forma de artigo, os dados que foram disponibilizados para a comunidade científica através de uma publicação no periódico *BMC Molecular Biology*. Este estudo apresenta genes diferencialmente expressos em tecidos/órgãos de café. É importante enfatizar que, até então, não havia dados sobre genes que atuam como controles internos (normalizadores) em plantas de café. Estes resultados permitem comparações nos níveis de expressão gênica. Também podem usados como referência em estudos de engenharia genética, a fim de se obter plantas transgênicas com expressão constitutiva.

Research article

Open Access

Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditionsCarla F Barsalobres-Cavallari*¹, Fábio E Severino¹, Mirian P Maluf² and Ivan G Maia¹

Address: ¹Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n. 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil and ²Embrapa/IAC, Centro de Café Alcides Carvalho, Campinas, São Paulo, Brazil

Email: Carla F Barsalobres-Cavallari* - barsalobres@gmail.com; Fábio E Severino - fabio.bjj@gmail.com; Mirian P Maluf - mahuf@iac.sp.gov.br; Ivan G Maia - igmaia@ibb.unesp.br

* Corresponding author

Published: 6 January 2009

Received: 16 July 2008

BMC Molecular Biology 2009, 10:1 doi:10.1186/1471-2199-10-1

Accepted: 6 January 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/10/1>

© 2009 Barsalobres-Cavallari et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.**Abstract**

Background: Quantitative data from gene expression experiments are often normalized by transcription levels of reference or housekeeping genes. An inherent assumption for their use is that the expression of these genes is highly uniform in living organisms during various phases of development, in different cell types and under diverse environmental conditions. To date, the validation of reference genes in plants has received very little attention and suitable reference genes have not been defined for a great number of crop species including *Coffea arabica*. The aim of the research reported herein was to compare the relative expression of a set of potential reference genes across different types of tissue/organ samples of coffee. We also validated the expression profiles of the selected reference genes at various stages of development and under a specific biotic stress.

Results: The expression levels of five frequently used housekeeping genes (reference genes), namely alcohol dehydrogenase (*adh*), 14-3-3, polyubiquitin (*poly*), β -actin (*actin*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was assessed by quantitative real-time RT-PCR over a set of five tissue/organ samples (root, stem, leaf, flower, and fruits) of *Coffea arabica* plants. In addition to these commonly used internal controls, three other genes encoding a cysteine proteinase (*cys*), a caffeine synthase (*ccs*) and the 60S ribosomal protein L7 (*rpl7*) were also tested. Their stability and suitability as reference genes were validated by geNorm, NormFinder and BestKeeper programs. The obtained results revealed significantly variable expression levels of all reference genes analyzed, with the exception of *gapdh*, which showed no significant changes in expression among the investigated experimental conditions.

Conclusion: Our data suggests that the expression of housekeeping genes is not completely stable in coffee. Based on our results, *gapdh*, followed by 14-3-3 and *rpl7* were found to be homogeneously expressed and are therefore adequate for normalization purposes, showing equivalent transcript levels in different tissue/organ samples. *Gapdh* is therefore the recommended reference gene for measuring gene expression in *Coffea arabica*. Its use will enable more accurate and reliable normalization of tissue/organ-specific gene expression studies in this important cherry crop plant.

Background

The study of biological regulations is very often correlated to quantification assays. In order to detect differential expression of a gene(s) in distinct biological samples, such as tissue types or under different experimental conditions, the invention of quantitative PCR (qPCR) has transformed the field of gene expression analysis in living organisms [1]. In comparison to classical reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), the main advantages of qPCR are higher sensitivity, specificity and broad quantification range of up to seven orders of magnitude [2-6]. Regardless of being an extremely powerful technique, qPCR has its pitfalls, the most important one being the need of appropriate data normalization with a reference gene [6-14].

According to Andersen et al. [8], accurate data normalization is an absolute requirement for correct measurement of gene expression. Expression of the reference gene used to normalize qPCR analyses should be unaffected throughout many biological contexts; otherwise, it may lead to erroneous results [6-9,15-18]. Until recently, several such genes (*β-actin*, rRNA, *β-tubulin*, *alcohol dehydrogenase*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *14-3-3* and *polyubiquitin*) have been used as internal controls for gene expression analyses under the assumption of stable expression [19-26]. However, several reports have demonstrated that the expression levels of these so-called reference genes differ among different tissue/organ types [10,16,27-33]. Consequently, these genes are unsuitable as transcriptional inner controls, and their use to normalize qPCR data in different tissues may induce significant experimental errors that could result in inappropriate biological data interpretation [9,14,17,21-25,34-39].

Recognizing the importance of reference gene(s) in normalization of qPCR data, various housekeeping genes have been evaluated for stable expression under specific conditions in various organisms. In plants, only a few of them have been investigated in some detail in rice [15,40,41], poplar [36], potato [39], soybean [42,43] and *Arabidopsis thaliana* [30]. So far, suitable internal controls for gene expression studies have not been defined for *Coffea arabica*.

Coffee is an agricultural crop of significant economic importance. *Coffea arabica* L. (arabica type coffee) is typical of the highland growing regions and is responsible for almost 75% of world production [44]. In this study, we report the validation of housekeeping genes to identify the most suitable internal reference gene(s) for normalization of qPCR data obtained among five different tissues/organs (root, stem, leaf, flower, and fruits) of *C. arabica*. To further validate our results, we evaluated the expression levels of our best reference genes at different develop-

mental stages of flowers and cherries and under a specific biotic stress. Following the current literature, five candidate reference genes, namely *alcohol dehydrogenase* (*adh*), *polyubiquitin* (*poly*), *14-3-3*, *β-actin* (*actin*) and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*gapdh*), were selected. In addition to these commonly used internal controls, three other genes coding for a cysteine proteinase (*cys*), a caffeine synthase (*cas*) and the 60S ribosomal protein L7 (*rpl7*), respectively, were included in this analysis. These potential reference genes were ranked according to their expression profiles and stability.

Results and discussion

The expression profile of eight candidate reference genes (*actin*, *adh*, *14-3-3*, *cas*, *gapdh*, *poly*, *rpl7*, or *cys*) was firstly assessed by qPCR over a panel of five coffee tissue/organ samples (root, stem, leaf, flower, or fruit).

Descriptive analysis of the reference candidate genes

Descriptive statistics of the derived crossing points (CP), based on BestKeeper program [45], were calculated to investigate the variation level of each candidate gene following Pfaffl et al. [46]. According to this analysis (see Table 1), the gene with lowest expression level was *actin*, for which CP values were obtained around cycles 31-34; while the highest was *gapdh*, whose CP values were obtained around cycles 21-23. The expression levels of *14-3-3*, *cas*, *gapdh*, and *rpl7* presented fluctuations of approximately ± 0.6 x-fold (0.52 x-fold < SD < 0.82 x-fold), whereas *poly* expression showed higher ranges of CP variation (SD = ± 1.39 cycles) as well as up-down-regulation (± 2.09 x-fold). The coefficient of variation (CV) of the assay was 3.57% (total assay variability), which is within the range (from 3.4% to 11.6%) of previously reported values for qPCR [46].

Descriptive statistics for the expression analyses of each reference candidate gene in the five distinct coffee plant tissue/organ types was also obtained (see Additional File 1). According to this analysis, the gene that exhibit the minor gene expression variation among the analyzed tissues was *gapdh* [SD (\pm x-fold) = 0.04], while the gene with major variation was *cas* [SD (\pm x-fold) = 0.59]. In addition, *cas* also presented the highest expression variation in flowers and fruits tissue samples, and therefore it cannot be used as a reference gene. Numerous studies have shown that the expression of housekeeping genes can vary under given situations [28]. This may partly be explained by the fact that housekeeping genes are not only implicated in the basal cell metabolism but also participate in other cellular functions [47,48].

Table 1: Descriptive statistics and expression level analyses of the tested candidate reference genes based on their crossing point (CP) values

Factor	<i>actin</i>	<i>adh</i>	<i>14-3-3</i>	<i>ccs</i>	<i>gapdh</i>	<i>poly</i>	<i>rpl7</i>	<i>cys</i>
N	21	21	21	21	21	21	21	21
GM [CP]	32.72	29.7	29.63	26.67	22.86	28.46	30.76	26.67
AM [CP]	32.74	29.71	29.64	26.67	22.88	28.49	30.77	26.7
Min [CP]	31.4	28.64	28.94	25.92	21.74	26.79	30.13	25.24
Max [CP]	34.35	31.12	31.21	27.37	23.77	30.07	31.93	28.44
SD [\pm CP]	1.23	0.99	0.92	0.58	0.94	1.39	0.69	1.31
CV [%CP]	3.75	3.35	3.09	2.19	4.12	4.89	2.24	4.89
Min [x-fold]	0.41	0.43	0.66	0.53	0.54	0.18	0.68	0.41
Max [x-fold]	3.04	3.1	2.62	1.83	1.64	5.22	2.02	3.04
SD [\pm x-fold]	1.07	1.08	0.82	0.52	0.52	2.09	0.53	1.08

Abbreviations: N: number of samples; CP: crossing-point; GM [CP]: geometric CP mean; AM [CP]: arithmetic CP mean; Min [CP] and Max [CP]: CP threshold values; SD [\pm CP]: CP standard deviation; CV [%CP]: variance coefficient; expressed as percentage of CP level; Min [x-fold] and Max [x-fold]: threshold expression levels expressed as absolute x-fold over- or under-regulation coefficient; SD [\pm x-fold]: standard deviation of absolute regulation coefficient.

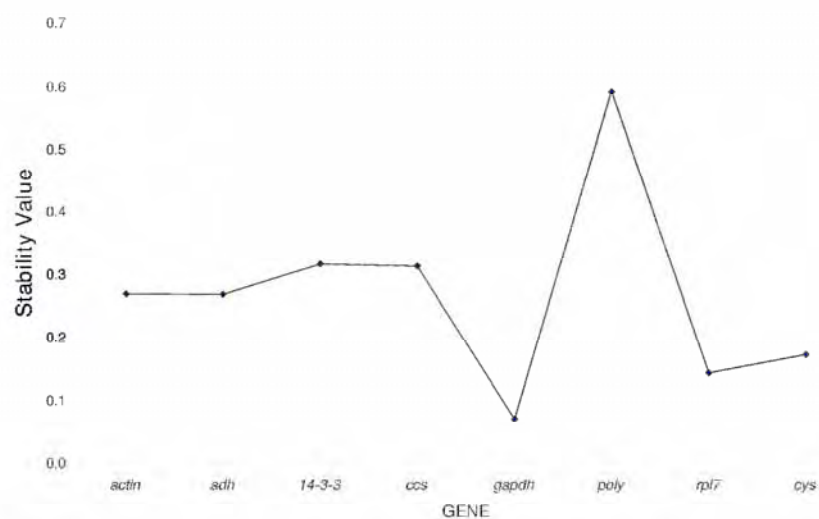


Figure 1
Stability of the investigated candidate reference genes. Stability values of the eight candidate reference genes according to the model-based approach. A lower value of average expression stability indicates more stable expression.

A model-based approach for estimation of expression variation

The model-based variance estimation approach, a Visual Basic application for Microsoft Excel (termed NormFinder) [8,49], was used to evaluate expression stability of reference candidate genes. This analysis allowed the ranking of candidate genes since the estimated variation directly indicates the introduced error associated with their use. According to this method, the gene with minimal estimated intra- and intertissue variation was *gapdh* (expression stability = 0.071) while the gene with the maximal variation was *poly* (expression stability = 0.592) (see Figure 1), thus corroborating the results obtained in descriptive analysis.

Ranking the candidate reference genes

The relationship between the stability value and the intra- and intertissue expression variations is present in Figure 2. This figure clearly demonstrates the distinct specificities of the investigated genes. According to this analysis, the best candidate gene should present the minimal combined inter- and intra-tissue expression variation. Consistent with the descriptive analysis (see Table 1 and Additional File 1) and the model-based variance estimation approach (see Figure 1), *gapdh* showed not only the highest expres-

sion levels but was also the most stable gene studied. In Figure 2, it can be observed that almost all genes presented average of log expression levels near 0 (the thick dashed line). Log difference >0 (as observed for *actin*) or <0 (as observed for *poly*) implies that variability in expression levels is significant, so the gene could be incorrectly used as reference gene for normalization. In this context, the *poly* gene presents the highest intertissue expression variation (SD = ± 0.65 ; see Figure 2). Thus, among the tested genes, *gapdh*, followed by *rpl7* and *14-3-3*, showed the most stable expression over the investigated panel of five distinct coffee tissue/organ types.

The candidate genes were also ranked according to their M values using the geNorm program. The average expression stabilities (M values) of all tested genes were lower than 1.5, with *14-3-3* and *actin* showing the most stable expression (data not shown). Although *actin* gene has shown highest stability following geNorm analysis, this gene presented the lowest expression profile according the Best-Keeper analysis. Corroborating the previous analysis, *poly* remained the least stable gene.

As a whole, our analysis indicates that housekeeping genes are differently regulated in different tissues/organs

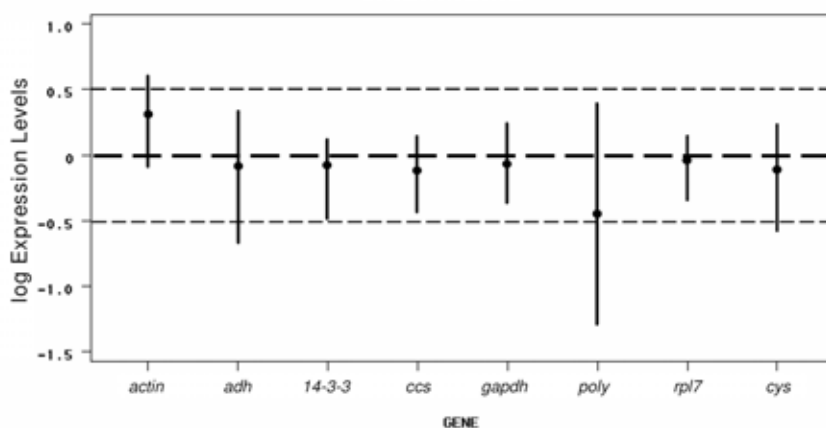


Figure 2
Gene expression differences among the candidate reference genes. The log-transformed gene expression levels are represented by black circles. The intertissue variation is indicated by vertical bars that give a confidence interval for the difference. The two thin dashed lines represent the maximal standard deviation of the reference candidate genes, with a log expression levels difference between 0.5 and -0.5.

of coffee plants and may exhibit variable expression patterns. The observed differences in gene expression ratios along a comprehensive panel of tissues/organs are consistent with the data presented by Barber et al. [1], Iskandar et al. [50] and Jain et al. [15]. Our results also provide evidences that normalizations to the expression level of a single gene in samples from distinct tissue types may induce to errors, thus corroborating previous studies [29,51,52].

Comparison of the identified best reference genes to published data

In order to validate our potential candidate reference genes (*gapdh*, *rpl7* and *14-3-3*), the expression stability of these genes under the influence of a specific biotic stress was investigated. In this case, the obtained results were

compared to those dealing with similar coffee gene expression analysis but using *ubiquitin* as a reference gene for normalization [53-56].

The comparison was conducted by linear regressions analyzes of the CP difference (ΔCP) obtained from the assayed expression levels of the tested genes in leaves of *C. arabica* inoculated, or not (control plants), with *Hemileia vastatrix*. The average CP ($N = 3$) was calculated for each gene and the ΔCP ($CP_{\text{inoculated leaf}} - CP_{\text{non-inoculated leaf}}$) was determined for each time-point (8, 12 and 24 h after fungus inoculation).

As it can be observed in Figure 3, the regression lines for *14-3-3* and *gapdh* have slopes close to zero (*14-3-3* = 0.085; *gapdh* = 0.18), indicating similar expression levels

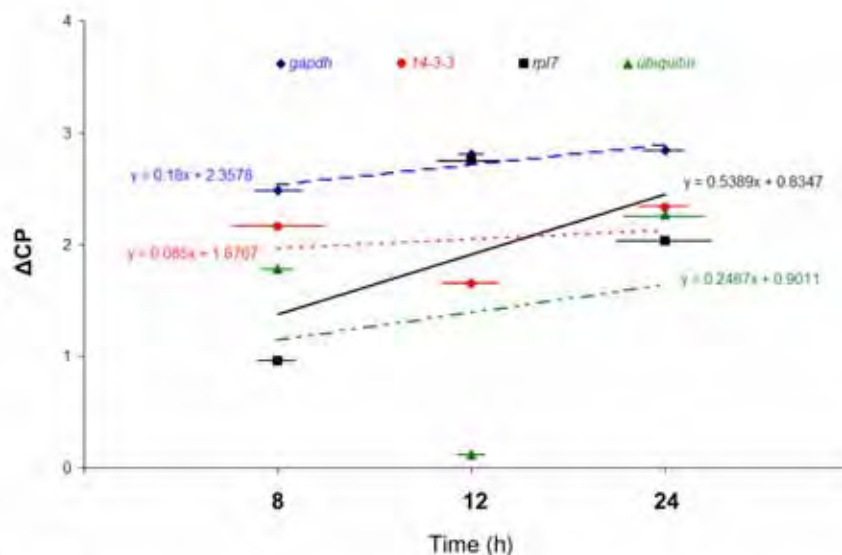


Figure 3

Evaluation of the expression of selected reference genes during fungus infection. The expression of selected reference genes (*gapdh*, *rpl7* and *14-3-3*) and of a commonly used coffee normalization gene (*ubiquitin*) was monitored in leaves of *C. arabica* var. Mundo Novo inoculated with *Hemileia vastatrix*. The crossing point (CP) difference ($\Delta CP = CP_{\text{inoculated leaf}} - CP_{\text{non-inoculated leaf}}$) was calculated for each time-point (8, 12 and 24 h after challenge by the rust fungus) to investigate the expression levels of each reference gene. The standard error of the triplicates for each time-point is indicated by horizontal bars.

in inoculated and non-inoculated leaves, and reinforcing their use as effective normalization genes [1,57,58]. In contrast, the slope value for *rpl7* was significantly different from zero and higher than the one obtained for *ubiquitin* (*ubiquitin* = 0.2467; *rpl7* = 0.5389), thus limiting its use as a normalization factor under biotic stress condition.

Validation of data results in different developmental stages of flowers and coffee cherries

An additional validation step of the expression levels of *gapdh*, *14-3-3*, *rpl7* and *ubiquitin* was performed using unpooled tissue samples from flower and cherry developmental series. The employed sample set is given in the Additional File 2.

In this assay, the highly expressed gene was *gapdh* ($\overline{CP} = 21$ cycles) followed by *ubiquitin* ($\overline{CP} = 24$ cycles), while *14-3-3* and *rpl7* presented the same mean CP (25 cycles). The comparison of gene contributions is present in Figure 4. As already observed, *gapdh* showed the greatest stability in expression among all coffee tissue/organ samples analyzed, while expression of *rpl7* and *14-3-3* varied the most, especially in flowers at stage 1 of development (see Figure 4 and Additional File 2). As mentioned earlier, *ubiquitin* was used as a standard reference gene for comparison.

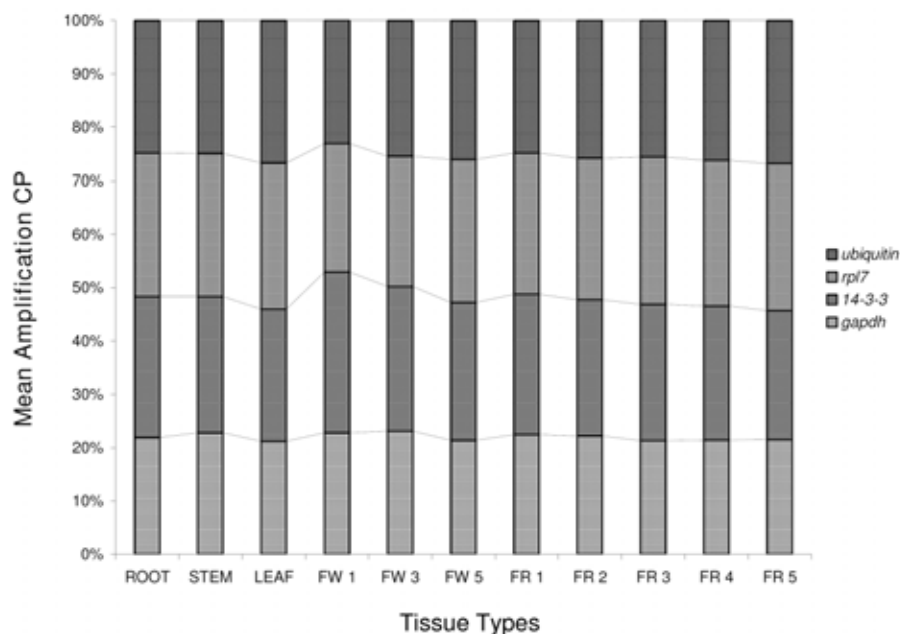


Figure 4
Validation of the selected reference genes in samples from flowers and cherries at different developmental stages. Comparison of gene contributions, by mean amplification crossing points (CP) represented in percentage, in each coffee tissue/organ type. The investigated tissue/organ sample set was: root, stem, leaf, three different stages of flower development (FW 1, FW 3 and FW 5) and five different kinds of coffee cherries (FR 1, FR 2, FR 3, FR 4 and FR 5).

General remarks about the selected reference genes

According to these results, the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), an enzyme of glycolysis [59], outperformed all other reference genes tested and should therefore be considered a suitable reference gene for expression studies in arabica coffee plants. This observation corroborates the quantification of *gapdh* expression in different tissues of sugarcane [50] and *Eucalyptus* [20]. In contrast, several reports in human and animal systems have suggested that this reference gene has limitations for its use as internal control due to its marked variability of expression among tissue types [1,16,51,60].

The assayed *14-3-3* gene also showed a stable expression (see Figure 2) that was supported by the descriptive analysis (see Table 1 and also Additional File 1) and confirmed in the biotic stress assay (see Figure 3). However, its expression presented some variation among different stages of coffee flower development (see Figure 4). Papini-Terzi et al. [19] recommended *14-3-3* as a suitable reference gene for expression normalization in a wide range of tissue samples of sugarcane.

The gene encoding the transcription regulator and structural constituent of the 60S subunit of the cytosolic ribosome (*rpl7*) could also be used as an internal control in gene expression studies in *C. arabica*, due to its stability (see Figure 2) and acceptable variation among tissue/organ types (see Table 1). Our results are in agreement with previous published data for this gene since small variation among tissue types was detected by descriptive analysis (see Additional File 1). Nevertheless, in leaves of *C. arabica* inoculated with *H. vastatrix*, it was observed that the expression ratio of *rpl7* (expressed by ACP) was not constant and the absolute value of *rpl7* linear regression slope was superior to that observed for a commonly used coffee normalization gene (*ubiquitin*) (see Figure 3). In addition, this gene, like *14-3-3*, presented a variable expression level among different stages of coffee flower development (see Figure 4). In sugarcane, the relative expression of *rpl35-4*, a gene coding for the ribosomal 135-4 60S protein, was also reported to be stable [61]. These authors estimated the sugarcane leaf transcriptome using Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) and reported that tag associated with the *rpl35-4* transcript presented minimum variation among the analyzed SAGE libraries.

The remaining tested genes showed to be unsuitable as internal controls for normalization purposes in *C. arabica*.

Conclusion

This study provides the most extensive collection of arabica coffee tissue/organ mRNA expression data for eight reference candidate genes. Our analysis evidenced stable

levels of *gapdh*, *14-3-3* and *rpl7* mRNA in different *Coffea arabica* tissue/organ types. Consequently, these genes can be used for accurate and reliable normalization in future gene expression studies in coffee (e.g., they can be used as a reference for a target gene in a specific tissue or experimental condition). In this respect, we suggest *gapdh* as the most relevant reference gene for accurate normalization purposes in *C. arabica*, showing almost constant expression levels in the investigated experimental set-up.

Moreover, we have shown that depending on the reference inner control gene, the within-tissue variation of mRNA expression levels is generally small, whereas among tissues/organs the variation can be substantial. This indicates that normalizations to a single gene across different tissue types are unwise. Since the variation observed between normal tissues of different types may in part be due to the different metabolic demands of those tissues, comparisons within a tissue type between normal and diseased states are similarly unwise.

Methods

Plant material and growth conditions

Freshly harvested roots, stems, and leaves were obtained from ten 4 month-old coffee plants (*Coffea arabica* var. Mundo Novo IAC 388-17-1) grown under greenhouse conditions (28°C, 60% RH) in Campinas, São Paulo, Brazil. Flower and fruit samples, at different developmental stages, were collected from 4–5 year-old plants of var. Mundo Novo grown under field conditions at Botucatu and Campinas, São Paulo, Brazil (see Additional File 2). After harvesting, fresh tissue samples were frozen immediately in liquid nitrogen until RNA extraction.

Biotic stress assay

For the biotic stress assay, equally-aged sets of *Coffea arabica* var. Mundo Novo plants were kept in growth chamber (16 h/8 h light/dark; 23°C; 70% RH) for at least one week, before being inoculated with the coffee leaf-rust fungus *Hemileia vastatrix* Berk and Br. race II, that elicits a compatible reaction in coffee. The urediniospores (100 mg) were harvested in a *C. arabica* field in Campinas, São Paulo, Brazil, and diluted in 10 ml of sterile water under dark conditions.

Leaves from the second pair of plagiotropic shoots from the apex of 4 month-old coffee plants were inoculated with an aqueous suspension of fresh urediniospores (10 mg/ml). To allow spore germination, the inoculated leaves were covered with a wet black plastic film for 24 h. Inoculated leaves were not detached from the plants. Mock-inoculated controls as well as non-inoculated controls were performed. The biological samples were obtained from three independent experiments.

Leaves were randomly sampled at different time-points after inoculation: 0, 8, 12, and 24 h, and immediately deep-frozen. To confirm the infection by the leaf-rust fungus, some inoculated leaves were maintained in plants.

RNA isolation and quality controls

Tissue samples of 2.0 to 2.5 mg were weighed and ground to fine powder in liquid nitrogen using a pre-cooled mortar and pestle. Total RNA from the majority of the samples was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Alternatively, total RNA from seeds was isolated by lithium chloride (LiCl) method, according to Mason and Schmidt [62]. Only RNA samples with 260/280 ratio between 1.9 and 2.1 and 260/230 ratio greater than 2.0 were used for subsequent analyses. The integrity of the RNA samples was also assessed on 1.0% agarose/formaldehyde gel electrophoresis.

Reverse transcription

Five micrograms of total RNA were treated with DNase I (Promega) and an aliquot of 500 ng of the treated RNA was reverse-transcribed using SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Both were used following the manufacturer's instructions. The cDNA sample concentration was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

Primer design

Primers were designed for *Coffea* orthologs of commonly used housekeeping genes representing distinct functional classes, identified by BLAST searches in the Brazilian Coff

fee EST database [63,64] as well as in the public coffee EST database (at the SOL site hosted by Cornell University [65]). For primer design, the Primer Express 2.0 software (PE Applied Biosystems, USA) with default parameters was employed. The accession numbers, gene description, primers sequences and amplicon lengths are shown in Table 2. All primer pairs produced a single product and amplified the target transcript with equal efficiency over a 1000-fold range of input material.

Quantitative PCR

The PCR mixture contained 5 µl of a 1:10 dilution of the synthesized cDNA, primers to a final concentration of 700 nM each, 17.5 µl of the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) and PCR-grade water up to a total volume of 35 µl. The mixes were homogenized and split in three samples of 10 µl, thus each gene reaction was performed in triplicate. PCR reactions in the absence of template were also performed as negative controls for each primer pair. An equimolar pool of cDNA samples of five coffee tissue/organ types (root, stem, leaf, flower, and fruit) was prepared to be used as a common reference for all qPCR. The quantitative PCRs were performed employing the ABI Prism 7300 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, USA). All PCR reactions were performed under the following conditions: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 65°C in 96-well optical reaction plates (Applied Biosystems, USA). Confirmation of amplicon specificity was based on the dissociation curve at the end of each run and by product visualization after electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel.

Table 2: Candidate reference genes and primer sequences used for quantitative PCR analysis

Gene name	Source gene ^a	Gene description	Primer sequence ^b	Amplicon length (bp)
<i>poly</i>	SGN-U347154	Hexameric polyubiquitin	5' CGCTGACTACAATATCCAAAAGGA 3' 5' CTGCATCCACCCCTCAGA 3'	67
<i>adh</i>	SGN-U350348	alcohol dehydrogenase class III	5' CCTCAAGCCGGCGAAGT 3' 5' CTGTATGGCAGAGGGCAGTGT 3'	55
<i>actin</i>	SGN-U353034	actin 7	5' AATTGTCGGTGACATCAAGGAA 3' 5' TGAGCTGCTCTGGCTGTTTC 3'	82
<i>gapdh</i>	SGN-U347734	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5' TTGAAGGGCGGTCCAAA 3' 5' AACATGGGTGCATCCTTGCT 3'	59
<i>rpl7</i>	SGN-U351477	60S ribosomal protein L7	5' CATTGAGGTATCAATGCTATGCA 3' 5' TGTCTCAGGCGCAGAAGCT 3'	66
<i>ccs</i>	SGN-U350284	caffeine synthase I	5' CAATGCCCGGCTCTTCTAC 3' 5' GTAACAAGAGTGTAAAAATGCATGGA 3'	68
<i>cys</i>	SGN-U352616	cysteine proteinase	5' GCGATCGCTACCGTCCAA 3' 5' CTTTTCTCTCCAGTCAATGGAGTT 3'	63
<i>14-3-3</i>	SGN-U356404	14-3-3 protein	5' TGTGCTCTTAGCTTCCAAAGC 3' 5' CTTCACGAGACATATTGTCTTACTCAA 3'	75

^a Unigene accession number according to the SOL Genomics Network [65]

^b Forward (upper line) and reverse (lower line) primer sequences

Analysis of candidate reference genes

To estimate the expression variation level of the eight candidate genes (*actin*, *adh*, *ccs*, *14-3-3*, *gapdh*, *poly*, *rpl7*, or *cys*) over a five coffee tissue/organ sample set (root, stem, leaf, flower, or fruit), the BestKeeper descriptive statistical method [45,66] was applied.

To access the levels of gene expression for each gene in the different coffee tissue types, the method described by Ramakers et al. [67] with modifications was used. Optic data were exported from 7300 Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems, USA) into MS Excel. Four cycles at the exponential phase, near and including the crossing point (CP), were used. The fluorescence data were logarithmically transformed, and pasted into statistical software package (SAS version 8e, SAS Institute, Cary, NC, USA) for linear regression analysis, including determination of intercepts, slopes (α), PCR efficiency ($E = 10^{(1/\text{slope})}$) and their respective standard errors and correlation coefficients (R^2). The gene expression values (α -fold) were obtained according to a mathematical model proposed by Pfaffl [68]: $\alpha\text{-fold} = E_{\text{reference gene}}^{\Delta\text{CP}}$, where $\Delta\text{CP} = \text{CP}_{\text{pool of tissue}} - \text{CP}_{\text{tissue sample}}$.

Knowing the expression levels, the stability value was assessed utilizing NormFinder [8,49] and geNorm [17,69] programs.

Abbreviations

qPCR: Quantitative PCR; *poly*: hexameric polyubiquitin; *adh*: alcohol dehydrogenase class III; *actin*: actin 7; *rpl7*: 60S ribosomal protein L7; *ccs*: caffeine synthase 1; *gapdh*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *cys*: cysteine proteinase; CP: crossing point.

Authors' contributions

CFB-C and IGM conceived and designed this study. FES performed the biological assays. CFB-C and FES carried out the molecular genetic studies, participated in the qPCR experiments (acquisition, analysis and interpretation of data), MPM and IGM contributed with reagents/materials/analysis tools. IGM coordinated the study. CFB-C wrote the manuscript. All authors contributed, read, corrected and approved the final manuscript. The authors declare no conflict of interest in this work.

Additional material

Additional file 1

Results from BestKeeper descriptive statistical analysis. The data provided represent the descriptive statistics, based on crossing point (CP) values, for the expression analysis of the candidate reference genes in the five distinct coffee plant tissue/organ set.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2199-10-1-S1.doc]

Additional file 2

Coffee tissue/organ sample set (*Coffea arabica* var. *Mundo Novo - IAC 388-17-1*) used in the present study. Freshly harvested roots, stems, and leaves were obtained from 4 month-old coffee plants grown under greenhouse conditions (28°C, 60% RH) in Campinas, São Paulo, Brazil. Flower and fruit samples, at different developmental stages, were collected from 4-5 year-old field grown plants in Botucatu and in Campinas, São Paulo, Brazil. After harvesting, fresh tissue samples were frozen immediately in liquid nitrogen until RNA extraction.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2199-10-1-S2.doc]

Acknowledgements

The authors thank Adalgisa Soares de Oliveira, Carla Cristina da Silva and Marcos Brandalise (EMBRAPA/IAC) for providing part of the plant materials used in this study. CFB-C was recipient of a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. FES was recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. This research was sponsored by Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ: **GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.** *Physiol Genomics* 2005, **21(3)**:389-395.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B: **Real-time PCR: what relevance to plant studies?** *J Exp Bot* 2004, **55(402)**:1445-1454.
- Bustin SA: **Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences.** *Expert Rev Mol Diagn* 2005, **5(4)**:493-498.
- Ginzinger DG: **Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream.** *Exp Hematol* 2002, **30(6)**:503-512.
- Kutistak M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootani A, Jonak J, Lind K, Sindler R, Sjöback R, Sjogren B, Stromboli L: **The real-time polymerase chain reaction.** *Mol Aspects Med* 2006, **27**:95-125.
- Bustin SA, Nolan T: **Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.** *J Biol Chem* 2004, **279(3)**:155-166.
- Bustin SA: **Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.** *J Mol Endocrinol* 2002, **29**:23-39.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer Res* 2004, **64(15)**:5245-5250.
- Hugggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A: **Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations.** *Genes Immun* 2005, **6(4)**:279-284.
- Schnittgen TD, Zschrjsek BA: **Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR.** *J Biochem Biophys Methods* 2000, **46(1-2)**:69-81.
- Gorzelnak K, Janke J, Engeli S, Sharma AM: **Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes.** *Horm Metab Res* 2001, **33(10)**:625-627.
- von Smolinski D, Leverkusne I, von Samson-Himmelstjerna G, Gruber AD: **Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes.** *Histochem Cell Biol* 2005, **124(2)**:177-188.

13. Bustin SA, Benes Y, Nolan T, Pfaffl MW: **Quantitative real-time RT-PCR-a perspective.** *J Mol Endocrinol* 2005, **34**:597-601.
14. Gurierrez L, Mauriat M, Guenin S, Pollaux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Heriz T, Guerincau F, Bellini C, Van Wuytswinkel O: **The lack of a systematic validation of reference genes a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants.** *Plant Biotechnol J* 2008.
15. Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP: **Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, **345**:646-651.
16. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR: **Control selection for RNA quantification.** *Biotechniques* 2000, **29**(2):332-337.
17. Vandomeslele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, Speleman F: **Accurate normalization of Real-Time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**(7):34.
18. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, D'Antonio V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C: **Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.** *Anal Biochem* 2002, **309**(2):293-300.
19. Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vêncio RZ, Oliveira KC, Felix Jde M, Vicentini R, Rocha Cde S, Simões AC, Ulian EC, di Mauro SM, da Silva AM, Pereira CA, Menossi M, Souza GM: **Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues.** *DNA Res* 2005, **12**(1):27-38.
20. Vicentini R, Sasaki FT, Gimenes MA, Maia IG, Menossi M: **In silico evaluation of the Eucalyptus transcriptome.** *Genetics and Molecular Biology* 2005, **28**:487-495.
21. Ohl F, Jiang M, Radonic A, Sachs M, Loening SA, Jung K: **Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer.** *J Urol* 2006, **175**(5):1915-1920.
22. Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A: **Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:17.
23. Infante C, Matsuoka M, Asensio E, Caravate J, Reith M, Machado M: **Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:28.
24. Bonfeld B, Elfving B, Wegener G: **Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue.** *Synapse* 2008, **62**(4):302-309.
25. Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebner U, Kellhoff G: **Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**(1):53.
26. Perez S, Royo L, Astudillo A, Escudero D, Alvarez F, Rodriguez A, Gomez E, Otero J: **Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors.** *BMC Molecular Biology* 2007, **8**(1):14.
27. Foss DL, Baarsch MJ, Murttaugh MP: **Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues.** *Anim Biotechnol* 1998, **9**(1):67-78.
28. Theillin O, Zorzi VV, Lakaye B, De Borman R, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Hainon E: **Housekeeping genes as internal standards: use and limits.** *J Biotechnol* 1999, **75**(2-3):291-295.
29. Lee PD, Shadick R, Greenwood CM, Hudson TJ: **Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies.** *Genome Res* 2002, **12**(2):292-297.
30. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR: **Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis.** *Plant Physiology* 2005, **139**:5-17.
31. Aoki T, Maki H, Katagiri T, Hirano I: **Cloning and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*.** *Fisheries Sci* 2000, **66**:737-742.
32. Olsvik PA, Lie KK, Jordal AEO, Nilsen TO, Hordvik I: **Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon.** *BMC Mol Biol* 2005, **6**:21.
33. Zhang Z, Hu J: **Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR.** *Toxicol Sci* 2007, **95**(2):356-368.
34. Dheda K, Hugggett J, Chang J, Kim L, Bustin S, Johnson M, Rook G, Zumla A: **The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization.** *Anal Biochem* 2005, **344**:141-143.
35. Sturzenbaum SR, Kille P: **Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001, **130**(3):281-289.
36. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH: **Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies.** *BMC Plant Biol* 2004, **4**:14.
37. Dheda K, Hugggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A: **Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR.** *Biotechniques* 2004, **37**(1):112-119.
38. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A: **Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **313**(4):856-862.
39. Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D: **Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress.** *J Exp Bot* 2005, **56**(421):2907-2914.
40. Ding J, Jia J, Yang L, Wen H, Zhang C, Liu W, Zhang D: **Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes.** *J Agric Food Chem* 2004, **52**(11):3372-3377.
41. Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ: **Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice.** *Biotechnol Lett* 2003, **25**(21):1869-1872.
42. Jian B, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C, Han T: **Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR.** *BMC Molecular Biology* 2008, **9**(1):59.
43. Libault M, Thibivilliers S, Bilgin D, Radwan O, Benitez M, Clough S, Stacey G: **Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization.** *The Plant Genome* 2008, **1**:44-54.
44. De Los Santos-Briones C, Hernández-Sotomayor SMT: **Coffee biotechnology.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2006, **18**:217-237.
45. **BestKeeper Software** [<http://www.gene-quantification.de/best-keeper.html>]
46. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP: **Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations.** *Biotechnol Lett* 2004, **26**(6):509-515.
47. Singh R, Green MR: **Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.** *Science* 1993, **259**(5093):365-368.
48. Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, Saunders P, Katsube N, Chung DM: **Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture.** *J Neurochem* 1996, **66**(3):928-935.
49. **NormFinder Software** [<http://www.mdj.dk/publication/snornfinder.htm>]
50. Iskandar HPI, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Mannervik JP: **Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression.** *Plant Mol Biol Rep* 2004, **22**:325-337.
51. Glane EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH: **beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels.** *Thorax* 2002, **57**(9):765-770.
52. Savli H, Karadantzi A, Kolyaji F, Gunduz S, Ozbek U, Valiabloğlu H: **Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR.** *J Med Microbiol* 2003, **52**(Pt 5):403-408.
53. Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon M-C, Petitot A-S, C Silva M, Guerra-Gulmaras L, Ribeiro ANA, Argout X, Nicole M: **Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*).** *Molecular Plant Pathology* 2004, **5**(6):527-536.
54. Genesh D, Petitot A-S, Silva MC, Alary R, Lecordix A-C, Fernandez D: **Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR.** *Plant Science* 2006, **170**(6):1045-1051.

55. Silva MdC, Várzea V, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandez D, Petitot A-S, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M: **Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2006, **18**:119-147.
56. Petitot A-S, Lecouls A-C, Fernandez D: **Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species Coffea arabica.** *Tree Genetics & Genomes* 2007, **4**:379-390.
57. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
58. Liu W, Saint DA: **A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics.** *Anal Biochem* 2002, **302**:52-59.
59. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C: **An overview of real time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression.** *Methods* 2001, **25**:386-401.
60. Ke L, Chen Z, Yung W: **A reliability test of standard-based quantitative PCR: Exogenous vs. endogenous standards.** *Mol Cell Probes* 2000, **14**:127-135.
61. Calva T Jr, Figueira A: **Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum spp.*) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts.** *Plant Mol Biol* 2007, **63**(6):745-762.
62. Mason MG, Schmidt S: **Rapid isolation of total RNA and genomic DNA from Hakea acities.** *Funct Plant Biol* 2002, **29**:1013-1016.
63. Vieira LGE, Andrade AC, Colombo CA, Moraes AHdA, Metha A, Oliveira ACd, Labate CA, Marino CL, Monteiro-Vitorello CdB, Motta DdC, Giglioti E, Kimura ET, Romano E, Kuramao EE, Lemos EGM, Almeida ERP, Jorge EC, Albuquerque EVS, Silva FR, Vinicky F, Sawasaki HE, Dorry HFA, Carrer H, Abreu IN, Batista JAN, Teixeira JB, Kitajima JP, Xavier KG, Lima LM, Camargo LEA, Pereira LFP, Coutinho LL, Lemos MVF, Romano MR, Machado MA, Costa MMC, Crassi-de Sá MF, Goldman MHS, Ferré MIT, Tinoco MLP, Oliveira MC, Van Sluys M-A, Shimizu MM, Maluf MP, Eira MTS, Guerroiro Filho O, Arruda P, Mazzafra P, Mariani PDSC, Oliveira RLBC, Harakava R, Balbão SF, Tsai SM, Mauro SMZ, Santos SN, Siqueira WJ, Costa GGL, Formighieri EF, Carazzolle MF, Pereira GAG: **Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2006, **18**:95-108.
64. **Coffee Genome Project** [<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>]
65. **Solanaceae Genome Project (SOL)** [<http://www.sgn.cornell.edu/content/coffee.pl>]
66. Pfaffl MW: **Quantification strategies in real-time PCR.** *The real-time PCR encyclopaedia A-Z of quantitative PCR* 2004:87-120.
67. Raimakers C, Ruijter JM, Deprrez RHL, Moorman APT: **Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.** *Neuroscience Letters* 2003, **339**:62-66.
68. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e45.
69. **geNorm Software** [<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>]
70. Majorowicz N, Sondał M: **Induction and differentiation of reproductive buds in Coffea arabica L.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2005, **17**:247-254.
71. Pezzopane JRd, Pedro Junior MJ, Thomaziello RA, Camargo MBPd: **Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica.** *Brigantia* 2003, **62**:499-505.
72. Morais H, Caramori PH, Kogushi MS, Ribeiro AMdA: **Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de Coffea arabica.** *Brigantia* 2008, **67**:257-260.
73. De Castro RD, Marraccini P: **Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2006, **18**:175-199.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



I.2.7.5. Resultados obtidos para os candidatos com padrão de expressão tecido-específico

Para os genes validados por RT-PCR com expressão específica em fruto/semente não foi realizada uma análise prévia usando a técnica de PCR semi-quantitativo.

Num primeiro momento foi realizado o seqüenciamento dos produtos de amplificação provenientes do RT-PCR e correspondentes a três genes candidatos validados (*GLOBULIN*, *SSP* e *LEG B4*), uma vez que as ESTs destes genes pertenciam a um mesmo *contig* (*Contig 1535*, ver Tabela 1.4) no banco de dados de ESTs de café. A metodologia utilizada para o seqüenciamento está descrita detalhadamente no próximo capítulo deste trabalho (item II.6). A Figura 1.11 mostra parte do alinhamento realizado utilizando a seqüência *consensus* dos produtos de RT-PCR amplificados e seqüenciados das ESTs *GLOBULIN*, *LEG B4* e *SSP*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa *CLC Sequence Viewer 5.1.1*. Através deste seqüenciamento ficou claro que as três ESTs correspondem a um mesmo gene codificador da proteína de reserva da família 11S. De acordo com Rogers *et al.* (1999), a família de proteínas 11S é mais abundante no fruto de café, representando cerca de 45% do total de proteínas do fruto. Sendo assim, escolhemos a EST que estava mais a esquerda do *contig*, ou seja, que estava na porção 5' do gene (*longEST*). Desta forma o gene que continuou nas análises seguintes foi o inicialmente denominado *SSP*.

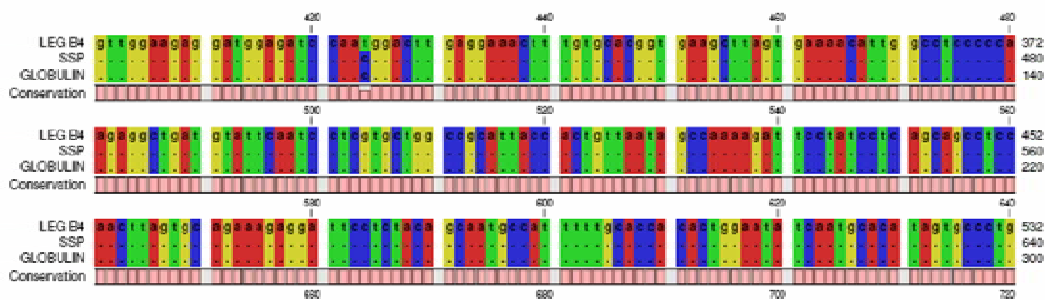


Figura 1.11 - Alinhamento das seqüências *consensus* dos produtos de RT-PCR amplificados e seqüenciados das ESTs *LEG B4*, *SSP* e *GLOBULIN*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa *CLC Sequence Viewer 5.1.1*.

Nas análises subsequentes dos genes com expressão específica em fruto foi incluído o gene *ALBUMIN*, que nos ensaios de validação biológica por RT-PCR apresentou um padrão ubíquo de expressão (Figura 1.4), mas que nas análises de PCR semi-quantitativo (Figura 1.8) e quantitativo (Figura 1.9f) apresentou expressão específica em fruto de café.

Em seguida, a expressão relativa dos candidatos com expressão específica de fruto (*SSP*, β -*MAN*, *SP*, β -*GALAC*, *PECTIN*, *LEGUMIN*, *AN2*, e *ALBUMIN*) foi determinada por PCR em tempo real utilizando-se *primers* específicos. Para estas análises foram utilizadas amostras de cDNA provenientes dos seguintes órgãos/tecidos: raiz, caule, folha, flor e frutos: chumbinho, chumbão, verde, verde-cana, vermelho, pericarpo e semente. A amostra de flor correspondeu a quantidades iguais de cDNA proveniente de amostras de botão floral e flores em diferentes fases da antese. A concentração final do cDNA de todas as amostras foi de 5 ng/ μ l. Uma vez obtidas e analisadas as curvas de amplificação e de dissociação dos referidos candidatos (dados não apresentados), procedeu-se a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica, conforme descrito anteriormente. O gene adotado como constitutivo (controle interno ou normalizador) foi o *GAPDH*, de acordo com os resultados apresentados no item 1.2.7.4.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.12. Nesse caso foi possível observar que cinco dos oito genes candidatos analisados são expressos somente na fase de frutificação do café arábica (*AN2*, *SP*, *SSP*, *LEGUMIN* e *ALBUMIN*). Curiosamente, três candidatos não tiveram a sua expressão tecido-específica confirmada conforme relatos da literatura [*PECTIN* e β -*GALAC* (Smith *et al.*, 1998; Smith & Gross, 2000; Agius *et al.*, 2005); β -*MAN* (Marraccini *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004)]. Assim, estes três últimos genes foram descartados dos estudos subseqüentes.

Cabe ressaltar que o gene *AN2* foi o único identificado/validado como sendo fruto-específico em todas as avaliações realizadas [*in silico* (ver Tabela 1.2), RT-PCR (ver Figura 1.4) e por PCR quantitativa (ver Figura 1.12)]. Estes resultados sugerem que o gene *AN2* apresenta altos níveis de seu transcrito na fase de maturação do pericarpo, corroborando os dados de Prata & Oliveira (2007).

Os genes *LEGUMIN*, *ALBUMIN* e *SSP* têm um perfil de expressão muito próximo, apresentando intensa atividade na fase de fruto verde do café e diminuindo sua expressão quando ocorre a maturação do fruto, corroborando os dados da literatura (Marraccini *et al.*, 1999; Acuña *et al.* 1999; Shimizu & Mazzafera, 2000; Bharali & Chrungoo, 2003; Qu & Takaiwa, 2004; Zakharov *et al.*, 2004; Li & Gray, 2005). Segundo Rogers *et al.* (1999), as proteínas de reserva da família 11S acumulam-se gradativamente no endosperma durante o desenvolvimento dos frutos e nenhuma evidência foi encontrada no perisperma.

O gene *SP* mostrou-se específico de semente de café. As proteínas codificadas por este gene (*late embryogenesis abundant proteins*) foram descritas pela primeira vez em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) (Dure *et al.*, 1981). Posteriormente estas proteínas foram identificadas em tecidos vegetativos submetidas à diferentes tipos de estresses (Ingram & Bartels, 1996; Thomashow, 1999). Hoje, sabe-se que estas proteínas desempenham papéis cruciais na tolerância à desidratação celular, porém suas funções fisiológicas e bioquímicas são pouco estudadas (Hundertmark & Hinch, 2008).

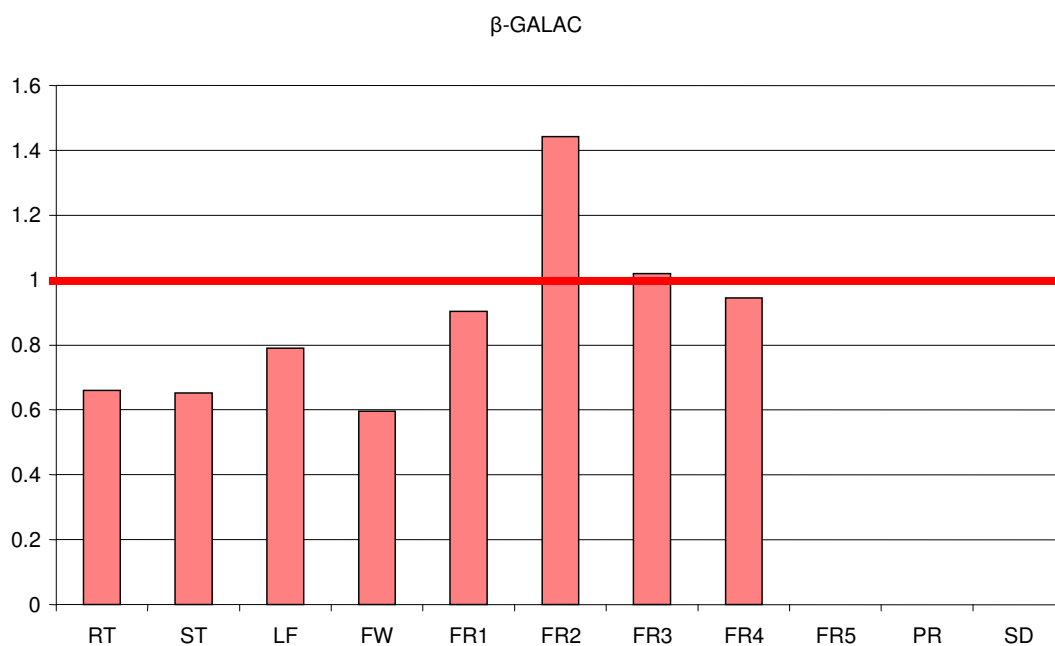
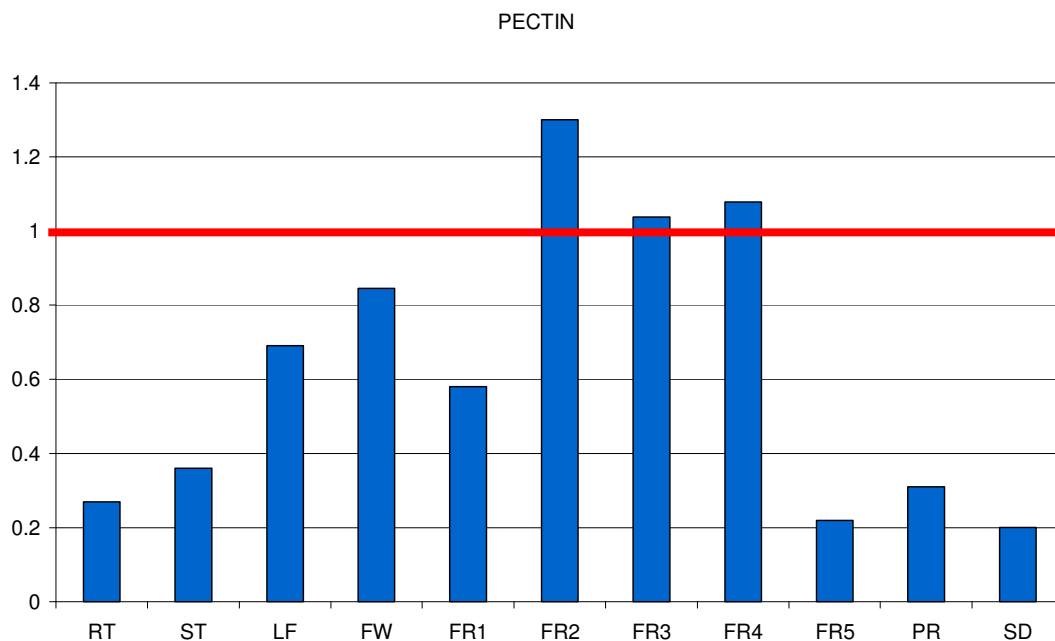


Figura 1.12 - Expressão relativa dos candidatos fruto- e/ou semente-específicos, em relação ao gene *GAPDH* (normalizador), determinada por PCR quantitativa. Foram analisados os seguintes tecidos: RT: raiz; ST: caule; LF: folha; FW: flor; FR1: fruto chumbinho; FR2: fruto chumbão; FR3: fruto verde; FR4: fruto verde-cana; FR5: fruto vermelho; PR: pericarpo e SD: semente. A linha horizontal vermelha indica o nível basal de expressão em relação ao normalizador.

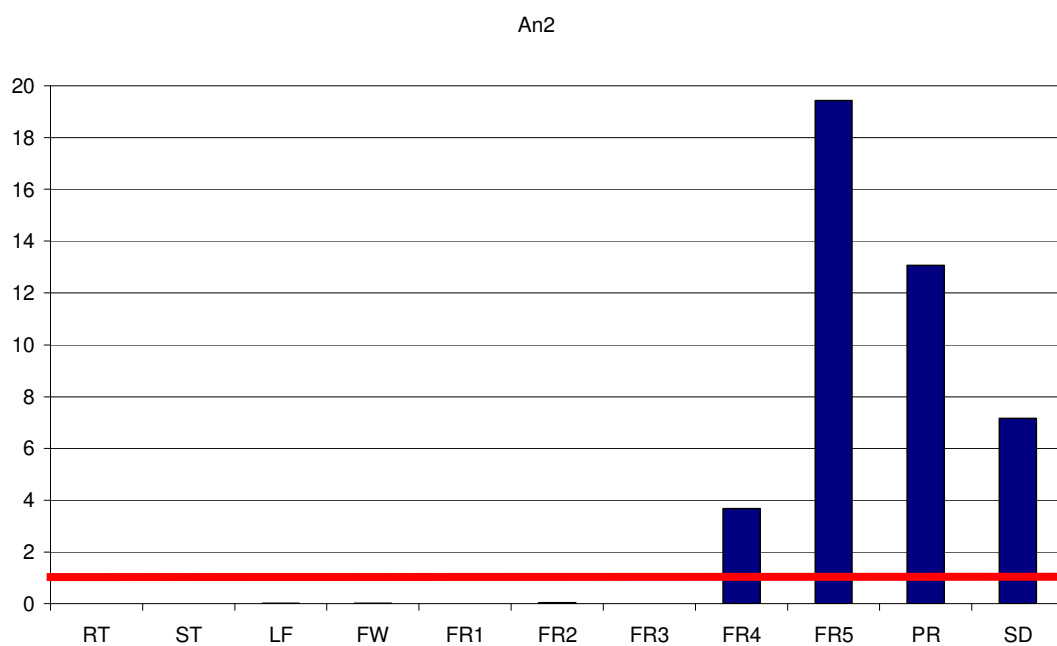
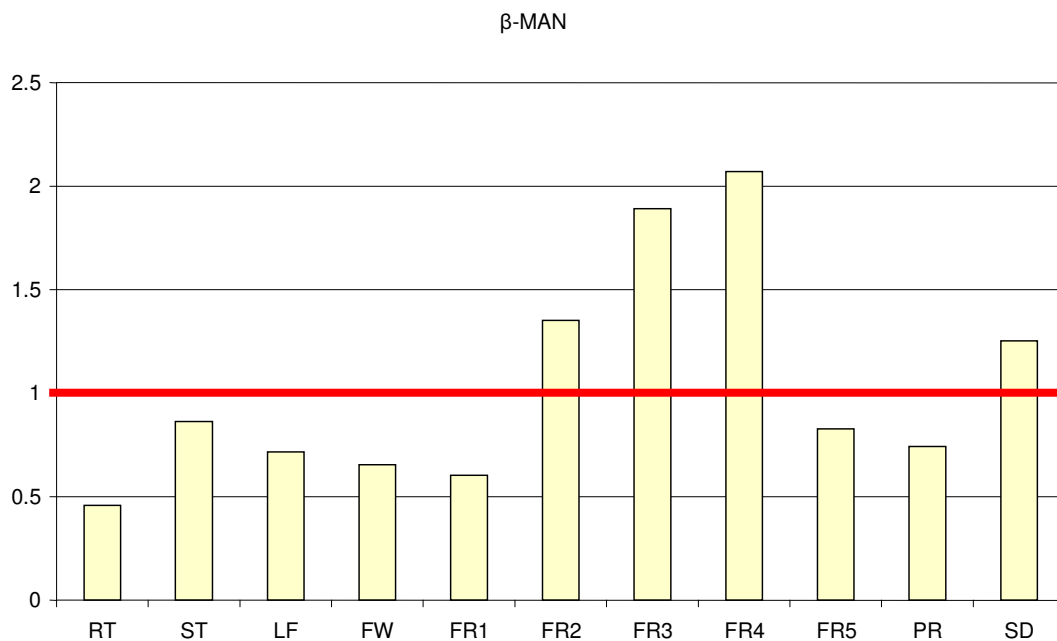


Figura 1.12 - Expressão relativa dos candidatos fruto- e/ou semente-específicos, em relação ao gene *GAPDH* (normalizador), determinada por PCR quantitativa. Foram analisados os seguintes tecidos: RT: raiz; ST: caule; LF: folha; FW: flor; FR1: fruto chumbinho; FR2: fruto chumbão; FR3: fruto verde; FR4: fruto verde-cana; FR5: fruto vermelho; PR: pericarpo e SD: semente. A linha horizontal vermelha indica o nível basal de expressão em relação ao normalizador.

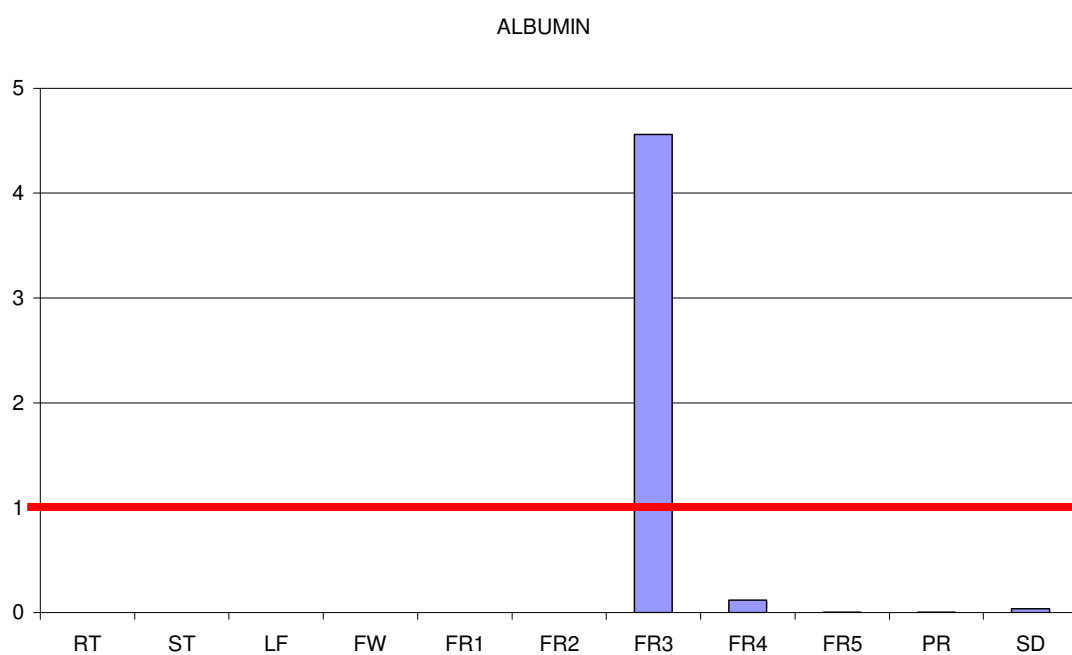
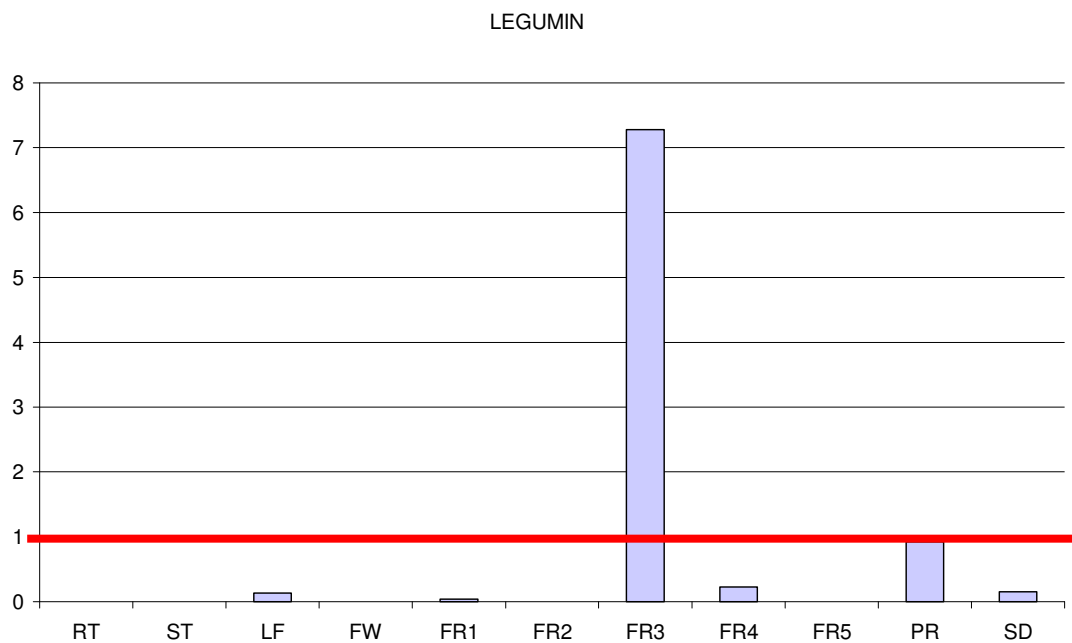


Figura 1.12 - Expressão relativa dos candidatos fruto- e/ou semente-específicos, em relação ao gene *GAPDH* (normalizador), determinada por PCR quantitativa. Foram analisados os seguintes tecidos: RT: raiz; ST: caule; LF: folha; FW: flor; FR1: fruto chumbinho; FR2: fruto chumbão; FR3: fruto verde; FR4: fruto verde-cana; FR5: fruto vermelho; PR: pericarpo e SD: semente. A linha horizontal vermelha indica o nível basal de expressão em relação ao normalizador.

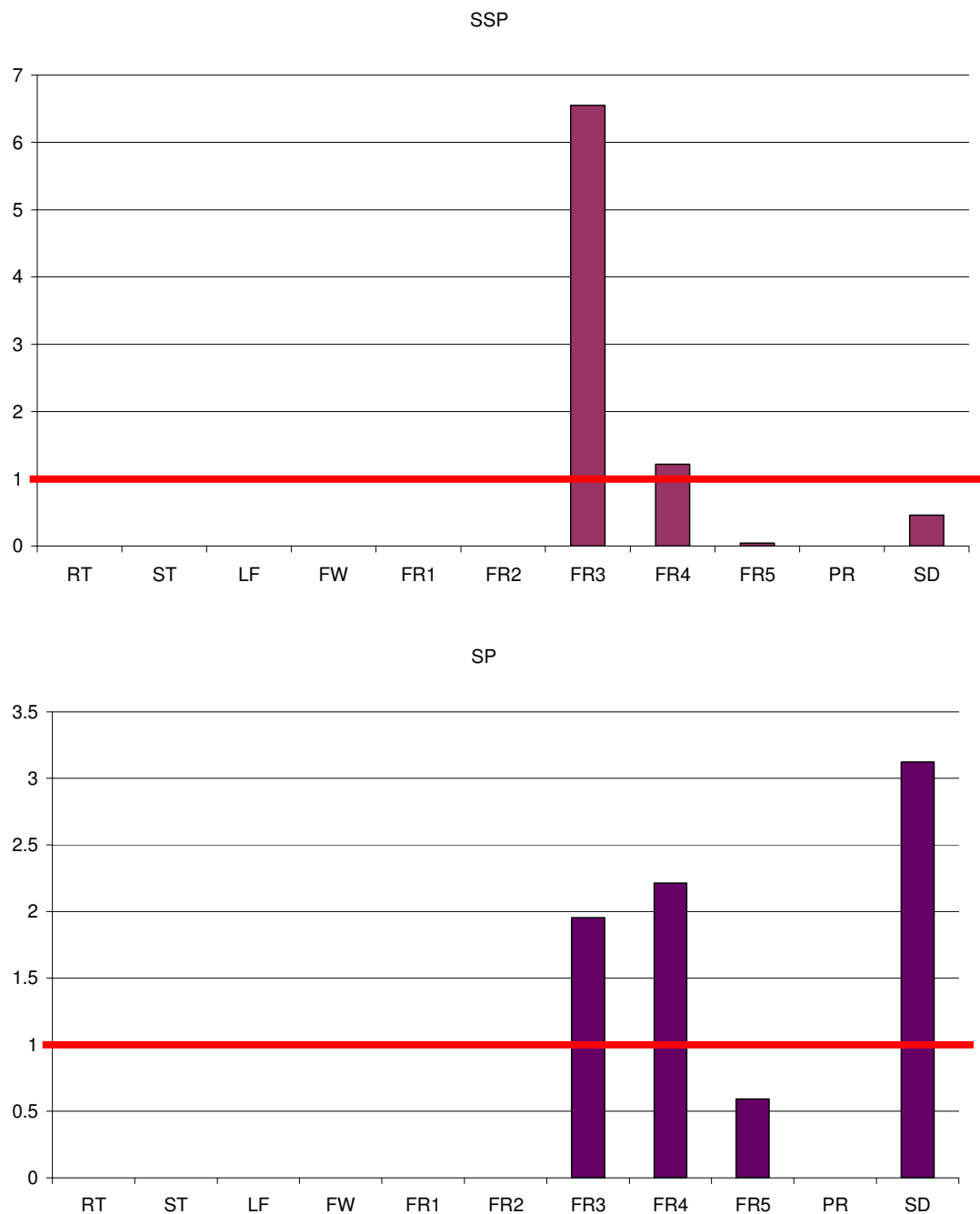


Figura 1.12 - Expressão relativa dos candidatos fruto- e/ou semente-específicos, em relação ao gene *GAPDH* (normalizador), determinada por PCR quantitativa. Foram analisados os seguintes tecidos: RT: raiz; ST: caule; LF: folha; FW: flor; FR1: fruto chumbinho; FR2: fruto chumbão; FR3: fruto verde; FR4: fruto verde-cana; FR5: fruto vermelho; PR: pericarpo e SD: semente. A linha horizontal vermelha indica o nível basal de expressão em relação ao normalizador.

I.2.8. Conclusões

De acordo com os resultados apresentados neste capítulo, concluiu-se que o gene *GAPDH* mostrou ser mais homogeneamente expresso, ou seja, apresenta níveis equivalentes de transcritos nos diferentes órgãos/tecidos de café arábica analisados. De acordo com os resultados obtidos e aqui apresentados, *GAPDH* é o gene recomendado para utilização como referência interna (normalizador) em estudos de expressão gênica em café. Portanto, o gene *GAPDH* foi selecionado com o objetivo de realizar a identificação e caracterização de sua região promotora, e cujos resultados serão descritos no capítulo II.

Dentre os cinco genes indentificados e validados com expressão específica em frutos de café (*ALBUMIN*, *AN2*, *SSP*, *SP* e *LEGUMIN*), o gene *AN2* foi o escolhido para as análises subseqüentes de identificação e caracterização de sua região promotora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, R. *et al.* (1999) Coffee seeds contain 11S storage proteins. *Physiologia Plantarum* 105:122-131.
- Agius, F. *et al.* (2005) Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. *Journal of Experimental Botany* 56:37-46.
- Altschul, S.F. *et al.* (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Anthony *et al.* (2001) Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118:53-65.
- Barg, R. *et al.* (2005) The tomato early fruit specific gene *Lefsm1* defines a novel class of plant-specific SANT/MYB domain proteins. *Planta* 221:197-211.
- Barros, L.M.G. *et al.* (2008) Studies of a new lipid transfer protein (LTP) expressed during coffee fruit development. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, São Paulo, Brasil.
- Barsalobres, C.F. (2004) Análise da expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar via macroarranjo de colônias bacterianas. 228p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- Barsalobres-Cavallari, C.F. *et al.* (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology* 10:1.
- Baum, K. *et al.* (1997) Improved ballistic transient transformation conditions for tomato fruit allow identification of organ-specific contributions of I-box and G-box to the RBCS2 promoter activity. *The Plant Journal* 12:463-469.
- Bharali, S. & Chrungoo, N.K. (2003) Amino acid sequence of the 26KDA subunit of legumin-type seed storage protein of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): molecular characterization and phylogenetic analysis. *Phytochemistry* 63:1-5.
- Creste, S. (2002) Avaliação da variabilidade genética em *Musa* spp. utilizando marcadores microssatélites. 86p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- Dure, L. III *et al.* (1981) Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry* 20:4162-4168.
- Gaffe, J. *et al.* (1997) Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiol* 114:1547-1556.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hammond, L.E. *et al.* (1997) Mutations in the *hrp48* gene, which encodes a *Drosophila* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle protein, cause lethality and developmental defects and affect P-element third intron splicing *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 17:7260-7267.
- Hundertmark, M & Hinch, D.K. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9:118.
- Ingram, J. & Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377-403.
- Li, Z. & Gray, D.J. (2005) Isolation by improved TAIL-PCR and characterization of a seed-specific 2S albumin gene and its promoter from grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 48:312-320.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Marino, J.H. *et al.* (2003) Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. *J Immunol Methods* 283:291-306.
- Marraccini, P. *et al.* (1999) Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37:273-282.

- Marraccini, P. *et al.* (2001) Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213:296-308.
- Mason, M.G. & Schmidt, S. (2002) Rapid isolation of total RNA and genomic DNA from *Hakea actities*. *Funct Plant Biol* 29:1013-1016.
- Meier, I. *et al.* (1997) The tomato *RBCS3A* promoter requires integration into the chromatin for correct organ-specific regulation. *FEBS Lett* 415:91-95.
- Mizuno, K. *et al.* (2003) Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett* 534:75-81.
- National Center for Biotechnology Information (2009) dbEST: database of "Expressed Sequence Tags". Disponível: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html. Acesso em 14 de setembro de 2009.
- Papini-Terzi, F.S. *et al.* (2005) Transcription Profiling of Signal Transduction-Related Genes in Sugarcane Tissues. *DNA Research* 12:27-38.
- Prata, E.R.B.A. & Oliveira, L.S. (2007) Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. *LWT* 40:1555-1560.
- Qu, L.Q. & Takaiwa, F. (2004) Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotech J* 2:113-125.
- Ramakers, C. *et al.* (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339:62-66.
- Rogers, W.J. *et al.*, (1999) Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:261-272.
- Romano, E. & Brasileiro, A.C.M. (1999) Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 9:40-43.
- Salgado, P.R. (2009) Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Piracicaba. 110p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- Shimizu, M.M. & Mazzafera, P. (2000) Compositional changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43:259-265.
- Silva, E.A.A. *et al.* (2004) Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta* 220:251-261.
- Smith, D.L. & Gross, K.C. (2000) A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiology* 123:1173-1183.
- Smith, D.L. *et al.* (1998) A gene coding for tomato fruit β -galactosidase II is expressed during fruit ripening. *Plant Physiol* 117:417-423.
- Song, P. *et al.* (2000) Expression of two tissue-specific promoters in transgenic cotton plants. *J Cotton Sci* 4:217-223.
- Telles, G.P. & Da Silva, F.R. (2001) Trimming and clustering sugarcane ESTs. *Genetics and Molecular Biology* 24:17-23.
- Thomashow, M.F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571-599.
- Thompson, J.D. *et al.* (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Vieira, L.G.E. *et al.* (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:95-108.
- Zakharov, A. *et al.* (2004) Seed-specific promoters direct gene expression in non-seed tissue. *J Exp Bot* 55:1463-1471.

CAPÍTULO II

AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DAS REGIÕES PROMOTORAS DOS GENES DE INTERESSE

Como mencionado anteriormente, as regiões promotoras do gene com expressão ubíqua (*GAPDH*) e do gene com expressão fruto-específica (*AN2*) de café foram amplificadas e clonadas empregando protocolo descrito por Devic *et al.* (1997), utilizando-se o kit *Universal GenomeWalker* (BD Biosciences - Clontech).

Adicionalmente realizou-se a amplificação das regiões promotoras de dois genes de defesa (*PR1* e *NPR1*) que foram alvo de investigação durante o estágio de co-tutela realizado no *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD, Montpellier, França), sob orientação da Dra. Diana Fernandez (Equipe *Résistance des Plantes aux Bioagresseurs* - RPB). Através desta pesquisa, pretendeu-se dar continuidade aos estudos conduzidos pela Dra. Diana Fernandez, em relação à resistência do café (*Coffea arabica*) a *Hemileia vastatrix*, fungo causador da ferrugem alaranjada do cafeeiro. Baseando-se nos conhecimentos adquiridos em estudos prévios, os genes *PR1* e *NPR1* foram escolhidos para verificar se estes importantes componentes relacionados à manifestação da resistência específica das plantas aos agentes patogênicos são conservados entre plantas modelo e o café (*Coffea arabica*). O gene *PR1* (*Pathogenesis-Related* protein type 1) codifica uma proteína com função antimicrobiana. Assim ele é usado frequentemente como marcador de defesa das plantas contra patógenos (Beilmann *et al.*, 1992; Grüner & Pfitzner, 1994; Ryals *et al.*, 1997; Strompen *et al.*, 1998; Van Loon & Van Strien, 1999; Santamaria *et al.*, 2001; Van Loon *et al.*, 2006; Mitsuhara *et al.*, 2008). Já o gene *NPR1* é um co-ativador de fatores de transcrição do tipo TGA, imprescindível para a ativação da expressão de genes *PRs* (Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Kinkema *et al.*, 2000; Subramaniam *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003; Dong, 2004).

Esta etapa do projeto constituiu-se em extração do DNA genômico, construção de bibliotecas oriundas da digestão deste DNA com enzimas de restrição fornecidas pelo kit *Universal GenomeWalker*, e reações de PCR para a busca das seqüências promotoras dos genes de interesse. Os fragmentos de interesse foram clonados no vetor pGEM-T Easy

(Promega) e seqüenciados em seqüenciador automático de DNA. As seqüências obtidas foram submetidas a análises comparativas com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI usando BLASTN. Também foram realizadas buscas por motivos regulatórios utilizando-se diferentes bancos de dados. Os promotores isolados foram clonados em vetor binário (pCAMBIA) de maneira a controlar a expressão do gene *uidA*, que codifica a proteína β -glucuronidase (GUS) que atuará como repórter. A funcionalidade das regiões promotoras foi testada em experimentos de expressão transiente via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando-se folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana) e frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* cv MicroTom).

II.1. Material Vegetal: *Coffea arabica*

Foram utilizadas plantas de café da espécie *Coffea arabica* cv Caturra. Este cultivar foi gentilmente cedido pela Dra. Mirian Perez Maluf do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café “Alcides Carvalho”, situado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

As plantas foram obtidas através de sementes, técnica chamada de pé-franco, e na época apresentavam 3 meses de idade. Uma vez coletadas, as folhas de seis plantas foram maceradas em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A seguir, este material foi condicionado no freezer -80 °C, até a extração do DNA genômico.

II.2. Extração do DNA genômico

O DNA genômico de folhas de *Coffea arabica* cv Caturra foi extraído conforme a metodologia descrita pelo kit do reagente *Plant DNAzol* (GibcoBRL, Cat. No.: 10978-021). Cerca de 100 mg do tecido macerado foi colocado em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL (Axygen). Realizou-se a extração de oito amostras separadamente, cujo produto foi posteriormente homogeneizado em um único tubo de 1,5 ml. Ao tecido foi adicionado 0,3 mL

do reagente *Plant DNAzol*, e os tubos foram gentilmente invertidos, até que o tecido macerado se homogeneizasse com o reagente. Cada tubo foi deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, 0,3 mL de clorofórmio puro (Vetec) foram adicionados ao tubo, sendo o mesmo imediatamente agitado. Após este procedimento o tubo foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo, a seguir, centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Durante a centrifugação, a mistura separa-se em uma fase orgânica, uma interfase e uma fase superior aquosa, contendo o DNA, com volume de aproximadamente 60% do volume de *Plant DNAzol* utilizado na homogeneização. Da fase aquosa, 200 µl foram transferidos para novo tubo, no qual se realizou a precipitação do DNA. Para tal, adicionou-se 1 volume de etanol absoluto (Dinâmica). As amostras foram homogeneizadas através de inversões suaves e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período de incubação, realizou-se nova centrifugação a 5.000 x g por 4 minutos a 4°C. Ao fim deste processo, foi possível visualizar um sedimento no fundo do tubo, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado uma vez com 0,3 mL de *Plant DNAzol* – etanol 100% (1v / 0,75v) e a amostra resultante foi misturada no *vortex* até que o sedimento se destacasse da parede do tubo. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado novamente. A seguir, o sedimento foi lavado uma vez com 0,3 mL de etanol 75% (v/v) e a amostra resultante foi misturada no *vortex* até que o sedimento se destacasse da parede do tubo, e então, centrifugada a 5.000 x g por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado novamente. Após a lavagem, o sedimento de DNA foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos, com o tubo invertido sobre papel absorvente. Posteriormente, o sedimento foi ressuspensionado em 70 µL de água Milli-Q autoclavada, sendo homogeneizado através da passagem da solução algumas vezes pela ponteira da pipeta, até que estivesse totalmente dissolvido. Após este processo as amostras foram incubadas por 10 minutos a 60°C e, em seguida, armazenadas a -80°C até o momento do uso. Para quantificar a

concentração de DNA, foi realizada uma análise comparativa em gel de agarose corado com brometo de etídeo. O tamanho e a intensidade da banda produzida pela amostra de DNA foi comparado com o tamanho e a intensidade da banda produzida por amostra de concentração conhecida (DNA Lambda GibcoBRL, Life Technologies), em solução de 15,25% (v/v) de tampão de carregamento. Este tampão, por sua vez, foi previamente preparado de 0,25% (p/v) de azul de bromofenol (Sigma, cat. B-5525), 0,25% (p/v) de xileno cianol FF (Aldrich, cat. 3359-40-10G) e 40% (p/v) de sacarose (Synth), em água Milli-Q autoclavada, e armazenado a -20°C até o momento do uso. As amostras sofreram eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em solução TBE 1X e a uma voltagem de 130 V por 30 minutos. Decorrido este tempo, o gel foi analisado no aparelho de fotodocumentação (Eagle-Eye II, Stratagene EagleSight).

II.3. Construção de Bibliotecas *GenomeWalker*

As bibliotecas de DNA foram construídas usando o kit *Universal GenomeWalker* (BD Biosciences Clontech cat. 638904, Inc., EUA). O DNA genômico foi digerido completamente com diferentes enzimas de restrição. Para tal utilizou-se as enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, que clivam abruptamente o DNA (*blunt-end*), sendo que o produto da digestão de cada enzima correspondeu a uma biblioteca. Os fragmentos do DNA digerido foram ligados ao adaptador *GenomeWalker*, fornecido pelo kit, de acordo com as recomendações do fabricante. Na Figura 2.1 está representado um esquema da metodologia utilizada para a obtenção das regiões promotoras dos genes de interesse.

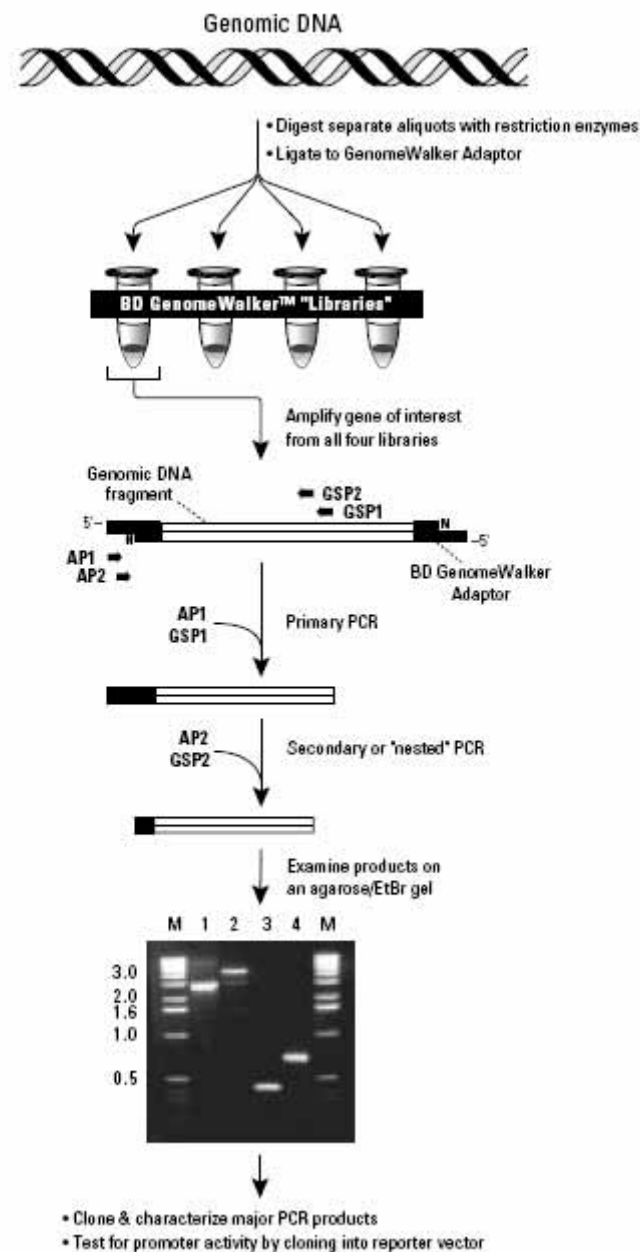


Figura 2.1 - Esquema da metodologia utilizada para a obtenção das regiões promotoras dos genes de interesse. Esta técnica consiste em: 1) Digestão do DNA com diferentes enzimas de restrição, em tubos separados; 2) Ligação de adaptadores; 3) PCR com oligo específico ao gene (GSP1) e oligo específico ao adaptador (AP1) – externos; e 4) *Nested*-PCR com oligo específico ao gene (GSP2) e oligo específico ao adaptador (AP2) – internos. Fonte: *BD GenomeWalker™ Universal Kit User Manual* (2004).

II.4. Obtenção das seqüências promotoras dos genes de interesse

A região promotora dos genes de interesse foi isolada utilizando-se duas etapas de PCR por biblioteca. A PCR preliminar usou o oligo AP1 (5'GTAATACGACTCACTATAGGGC3') presente no adaptador *GenomeWalker* e o oligo específico de cada gene de interesse (GSP1, Tabela 2.1). A amplificação da região de interesse foi feita em termociclador (PTC-100 MJ Research), sendo realizado um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 64°C e 2 minutos a 72°C, seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

A reação de PCR foi constituída por 0,4 µL de DNA de cada biblioteca a uma concentração de 2,5 ng/µL (digerido e ligado ao adaptador), onde foram adicionados (concentração final): tampão de PCR (1X), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleotídeo (dNTP mix 10 mM), 0,2 µM de cada oligo (AP1 e GSP1) e 2,5 unidades da enzima *Platinum Taq DNA Polimerase* (5U/µl, Invitrogen, cat. 10966-030). O volume final da reação foi de 20 µl, o qual foi obtido adicionando-se água deionizada autoclavada.

O produto da primeira PCR foi diluído na proporção 1:50, e 0,5 µL da diluição foram usados como o molde para a *nested-PCR*, onde se utilizou o oligo AP2 do adaptador (5'ACTATAGGGCACGCGTGGT3') e um oligo *nested* gene-específico (GSP2, Tabela 2.1), internos à região amplificada. O volume final da reação foi de 25 µl. A concentração dos reagentes e as condições da amplificação dos fragmentos de interesse foram as mesmas utilizadas na primeira PCR.

Tabela 2.1. Oligonucleotídios gene-específicos utilizados para a amplificação da região promotora dos genes de interesse.

GENE	GSP1	GSP2
<i>GAPDH</i>	5'CAGCAACAAGTTCTACATCATCCC3'	5'CAATTCTTCCAAAGCCATTGATTCC3'
<i>AN2</i>	5'CTTAGTCCGTCAGTGTACGC3'	5'GCTACACGTACCACACTAGAATAAGC3'
<i>PR1</i>	5'CACGAGCTGCATTATGGGCGTCCAGG3'	5'GCTAGAAAGGAAGGACTTGAAGCCAGG3'
<i>NPR1</i>	5'CATACGCAGATCATCGCCTGCCATAGC3'	5'CCCAGCAGTGGATCTCTTCTTTCTGCC3'
	5'GCCCTTGCAAACCAAGTTCCCTGCG3'	5'CATCTGCAGCAGCTTTGTGAAGAACG3'
	5'GGAAACTATAGTAGGGCGTCCAGCAC3'	
	5'CCAAGCAGTCAGGAGAAGACGACGCG3'	5'GGGAGAGGCGTTGAAGTGAGACGACG3'
	5'GACGACTGAACTGGAGCCGGAGC3'	5'CGGTGATCGGCTAGGAGACTGACG3'

Para o desenho dos oligonucleotídios gene-específicos foram utilizadas as sequências das ESTs correspondentes a cada gene (selecionadas no banco de dados) e os seguintes parâmetros foram utilizados: tamanho - entre 26 e 30 pares de bases (pb) - ideal 27 pb; Tm (*Temperature melting*) - entre 65 e 70 °C - ideal 67 °C; quantidade de GC - entre 40 e 60% - ideal 50%.

Os 25 µL resultantes da segunda reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 0,5X (tampão TAE 50X: 242 g de Tris base; 57,1 ml de ácido acético glacial; 100 ml ou 18,61 g de EDTA 0,5M (pH8,0); água ultra-pura q.s.p. 1000 ml; ajustar o pH a 8.5 com KOH), contendo brometo de etídeo a uma concentração de 0,1% (v/v), a uma voltagem de 120 V por 2 horas. Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi retirado da cuba e levado para o aparelho de fotodocumentação.

Os fragmentos amplificados na segunda PCR, e que não estavam presentes na reação controle realizada empregando somente o oligo AP2, foram purificados do gel utilizando-se *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, cat. 28706) seguindo as orientações do fabricante. Em média 2 fragmentos por biblioteca foram isolados.

II.5. Clonagem dos fragmentos

Os fragmentos de interesse isolados do gel foram ligados ao vetor de clonagem *pGem-T Easy* (kit *pGem-T Vector Systems*, Promega cat. A1360). A reação de ligação contendo 10 µL de tampão, 1 µL de plasmídeo, 1 µL de enzima ligase (todos componentes fornecidos pelo kit) e 8 µL do fragmento de interesse foi incubada a 4°C por 15 horas.

Células competentes da cepa JM109 de *E. coli* (Promega, cat L2001) foram utilizadas. Cem microlitros de células competentes foram adicionados de 4 µL de fragmentos ligados ao vetor e deixadas em gelo durante 20 minutos. A transformação foi realizada empregando choque térmico conforme protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 1989).

Decorrido o tempo de crescimento, as colônias de coloração branca foram repicadas em poços de microplaca do tipo ELISA (*Costar*, cat. 3795) contendo 140 µL de meio 2YT-HMFM (1,6% (p/v) de triptona, 1% (p/v) de extrato de levedura, 0,5% (p/v) de NaCl, 0,0076% (p/v) de MgSO₄ (7H₂O), 0,045% (p/v) de Citrato de Sódio, 0,09% (p/v) de (NH₄)₂SO₄, 4,4% (p/v) de glicerol, 0,18% (p/v) de KH₂PO₄ e 0,47% (p/v) de K₂HPO₄ em água deionizada) acrescido de 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 15 horas, tempo após o qual foram fechadas com adesivo selador (AB-Gene, cat. AB0558) e transferidas para freezer - 20°C.

Foi realizada então uma reação de PCR para verificar se os clones transformados continham os insertos. A reação foi feita com 1 µL do conteúdo de cada poço da placa de ELISA, aos quais foram adicionados 24 µL de um coquetel contendo 0,4 mM de dNTPs, 0,25 µM dos oligonucleotídeos AP2 e GSP2, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences), 0,4 mM de MgCl₂ (Fermentas Life Sciences) e 10% (v/v) de tampão (Fermentas Life Sciences) composto de 750 mM de Tris-HCl (pH 8,8) e 200 mM de (NH₄)₂SO₄ em água deionizada autoclavada.

A reação de PCR foi constituída de uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação (95°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos). Após os 30 ciclos, as amostras foram mantidas por 10 minutos a uma temperatura de 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo brometo de etídeo a uma concentração de 0,1% (v/v), a uma voltagem de 110 V por 1 hora. Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi retirado da cuba e levado para o aparelho de fotodocumentação, sendo assim possível identificar quais os clones que continham os insertos.

Os clones transformados foram mantidos a -80°C até o início da etapa seguinte, quando então os plasmídeos foram extraídos das células. Para esta etapa foram utilizadas placas de 96 poços fundos (AB-GENE cat. AB0564), dentro dos quais foi adicionado 1 mL de meio *Circle Grow* (QBIO-GENE cat. 3000-142) contendo 100 µg/mL de ampicilina. Em seguida, 2 µL do conteúdo de cada poço da placa ELISA contendo as colônias foram adicionados a cada poço das placas de poços fundos, onde já estava o meio *Circle Grow*. As placas foram seladas com adesivo selador, e este foi furado com uma agulha sobre cada poço da placa. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C em shaker (G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co., Inc.) a 370 rpm por 22 horas.

Após o período de incubação, o adesivo das placas foi substituído por um novo, e as placas foram centrifugadas (Centrifuge S810R, Eppendorf) a 3.000 rpm por 6 minutos, para que as células aderissem ao fundo da placa. O sobrenadante foi descartado por inversão das placas. A cada poço foram adicionados 240 µL de meio GTE [2,6% (v/v) de Tris 1M pH 7,4, 2,0% (v/v) de EDTA 0,5M pH 8,0 e 4,6% (v/v) de solução de glicose a 20%, em água deionizada autoclavada]. As placas foram novamente seladas e as células foram lavadas por agitação sobre *vortex* por 2 minutos. As placas foram novamente centrifugadas a 4.000 rpm por 6 minutos, e o sobrenadante foi descartado por inversão. As células sofreram outra lavagem com 80 µL de meio GTE, por agitação em *vortex* por 5

minutos. As placas foram deixadas sobre a bancada enquanto as novas placas foram preparadas.

Cada poço das novas placas (do tipo ELISA) recebeu 5 μ L de RNase (Ribonuclease A, Sigma R6513) a uma concentração de 10 mg/ml, preparada em solução de Tris 10 mM pH 7,5 e NaCl 15 mM em água deionizada autoclavada. Então 60 μ L de suspensão de células foram aliqüotados de cada poço das placas de poços fundos e transferidos para cada poço das placas ELISA. A cada poço adicionaram-se também 60 μ L de solução NaOH 0,2 M – SDS 1%. As placas foram seladas e agitadas por inversão (10 vezes), sendo então incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Nesta etapa, a parede celular e a membrana das células foram rompidas.

As placas sofreram um pulso na centrífuga para limpar o adesivo selador. O adesivo foi retirado e cada poço recebeu 60 μ L de solução de KOAc 3M a 4°C. As placas novamente foram seladas e agitadas 10 vezes por inversão. Novamente as placas sofreram um pulso na centrífuga para limpar o adesivo selador, que foi retirado. As placas foram incubadas a 90°C por 50 minutos. Após a incubação, as placas foram resfriadas em gelo por 10 minutos e centrifugada a 4.000 rpm por 4 minutos.

Uma placa-filtro (Millipore cat. MAGNV 2250) foi fixada sobre uma placa ELISA, com o auxílio de elásticos, de modo que os poços das duas placas ficassem alinhados. Então todo o volume de cada poço das placas anteriores foi aliqüotado e transferido para cada poço de uma placa filtro, deixando-se apenas um precipitado branco nas placas, que foram descartadas.

Os conjuntos placa-filtro + placa ELISA foram centrifugados a 4.000 rpm por 4 minutos, a 20°C. A placa-filtro foi removida e descartada. A cada poço das placas ELISA contendo o filtrado foram adicionados 110 μ L de isopropanol. As placas foram seladas e invertidas por 20 vezes, sendo então centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos, a 20°C.

O sobrenadante foi descartado por inversão, e 200 µL de etanol 70% foram adicionados. As placas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi novamente descartado. As placas foram colocadas invertidas sobre papel absorvente, e nesta posição, foram centrifugadas a 600 rpm por 1 minuto. Então foram deixadas para secar sobre a bancada por 30 minutos. Decorrido o tempo de secagem, adicionou-se 60 µL de água deionizada autoclavada. As placas foram mantidas sobre a bancada, ao abrigo da luz, por 15 horas.

A qualidade e concentração do DNA plasmidial foram verificadas em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de comparação um plasmídeo comercial (P-Gem 3Z, parte integrante do kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems). As placas contendo os plasmídeos extraídos foram congeladas a -20 °C.

Os plasmídeos foram analisados via padrão de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* e visualizados 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).

II.6. Seqüenciamento da região de interesse dos plasmídeos

A reação de sequenciamento foi preparada em água deionizada autoclavada com 4 µL de plasmídeo, 0,5 µM de oligo SP6 ou T7, 2 µL de *Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) e 2 µL de tampão *Save Money* (preparado com 10% (v/v) de MgCl₂ 50 mM e 20% (v/v) de Tris HCl pH 9,0 em água deionizada autoclavada).

A reação de sequenciamento foi feita em termociclador (PTC-100 MJ Research), no qual as amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 96 °C por 2 minutos, e em seguida, a 25 ciclos de

amplificação (96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos). A reação foi congelada a -20°C.

Antes do seqüenciamento foi realizada uma etapa de purificação. A cada poço da placa foram adicionados 80 µL de 65% (v/v) de isopropanol. A placa foi deixada em repouso, ao abrigo da luz, por 15 minutos, e então foi centrifugada a 4.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o excesso absorvido com papel toalha. Então foram adicionados 200 µL de etanol 70% (v/v) a cada poço. A placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. A placa foi deixada á temperatura ambiente, em local protegido da luz, por uma hora, para que os poços ficassem totalmente secos. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida deionizada (*Hi-Di™*, Applied Biosystems). Imediatamente antes do sequenciamento as amostras foram desnaturadas em termociclador, a 90°C por 3 minutos, e depois imediatamente colocadas sobre gelo por 5 minutos.

O sequenciamento foi realizado em seqüenciador *3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems), e as seqüências obtidas foram analisadas pelo *3730/3730xl Data Collection Software v3.0* (Applied Biosystems). Uma vez obtidas, as seqüências foram processadas com o auxílio do conjunto de softwares *Phred*, *Phrap*, *Consed* e *Cross_Match* (Laboratory of Phil Green, Genome Sciences Department, University of Washington, disponíveis em <http://www.phrap.org/index.html>). Através do uso destes programas retirou-se das seqüências a parte relativa ao vetor e ao adaptador, restando assim apenas a seqüência do inserto. Também foram excluídos trechos de má qualidade e seqüências cujas bases não puderam ser identificadas com segurança (parâmetro *Phred* >20). Após o uso destes programas, obtiveram-se arquivos do tipo “Fasta” contendo apenas as seqüências de interesse e de boa qualidade.

As seqüências “Fasta” foram processadas pelo software *CAP3 Sequence Assembly Program* (disponível em <http://seq.cs.iastate.edu>). Este software permitiu a identificação de *contigs*, para a qual foi requerida uma sobreposição de no mínimo 20 pares de base entre duas seqüências.

Para cada inserto, pelo menos três clones foram seqüenciados e analisados. A fim de verificar se as referidas seqüências apresentavam uma região de sobreposição em suas extremidades procedeu-se o alinhamento das seqüências *consensus* obtidas com as seqüências de nucleotídeos dos *contigs* originais (obtidos no banco de dados de ESTs de café; Vieira *et al.*, 2006). Para tal foi empregada a ferramenta *BL2seq* (Tatusova & Madden, 1999).

II.7. Análise das seqüências e busca de domínios regulatórios

Esta etapa teve por objetivo analisar as seqüências promotoras consensuais obtidas para cada candidato e compará-las com banco de dados de elementos regulatórios de plantas.

Foram utilizados os seguintes bancos de dados:

AGRIS (Davuluri *et al.*, 2003) - <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB>

AthaMap: (Bülow *et al.*, 2006) - http://www.athamap.de/search_gene.php

DoOP (Barta *et al.*, 2005) - <http://doop.abc.hu>

PLACE (Higo *et al.*, 1999) - <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>

ppdb (Yamamoto & Obokata, 2008) - <http://www.ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>

Promoter 2.0 (Knudsen, 1999) - <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter>

PROSCAN - <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>

RARGE (Seki *et al.*, 2002) - <http://rarge.gsc.riken.jp/cdna/promoter/index.pl>

RegSite - <http://softberry.com>

TRRD (Kolchanov *et al.*, 2002) - <http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/trrd//browse.shtml>

II.8. Construções gênicas em pCAMBIA 1305.1

Procedimentos padrões foram utilizados na realização das construções gênicas, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Os diferentes promotores putativos foram fusionados ao gene repórter *uidA* (*gusA* - obtido de *Staphylococcus sp.*), codificador da proteína β -glucuronidase (GUSPlus), presente no vetor pCAMBIA 1305.1. Para expressão específica em plantas, o referido gene repórter apresenta um intron derivado do gene *catalase* (*cat-*

1) de mamona (*Ricinus communis* L.) (Ohta *et al.*, 1990; Vancanneyt *et al.*, 1990).

II.8.1. Desenho de oligonucleotídeos

Para a obtenção das construções contendo o gene repórter GUS sob controle dos promotores em estudo, oligonucleotídeos específicos foram desenhados para cada uma das seqüências promotoras, sendo um deles posicionado à montante e adjacente ao início da região codificadora de GUS (incluindo o ATG do *contig*) (oligonucleotídeo *reverse*) e o outro na porção 5' do fragmento amplificado por *GenomeWalker* (oligonucleotídeos *forward*). Na extremidade 5' de cada um desses oligonucleotídios foi adicionado um sítio para uma enzima de restrição, a fim de permitir a inserção direcional do fragmento promotor no vetor de expressão, e garantir a fusão transcricional com o gene repórter presente no vetor binário pCAMBIA 1305.1. Aos oligonucleotídeos *forward* foram adicionados sítios para a enzima de restrição *XhoI* e aos oligonucleotídeos *reverse* foram adicionados sítios para a enzima *NcoI* (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Oligonucleotídios utilizados para a amplificação da região promotora dos genes de interesse visando a inserção em pCAMBIA. F = *forward*, R = *reverse*. Em vermelho encontra-se o sítio para a enzima de restrição *XhoI* e em verde o sítio para a enzima *NcoI*.

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEOS
GAPDH	F 5' AAA CTCGAG TATGCCCTTCATTAATGATGC3'
	R 5' CT CCATGG CATCTATGGCTTTAATTGAG3'
AN2	F 5' AAA CTCGAG ATCCCCAAATTGACAAAACATAATTCC3'
	R 5' CT CCATGG CATACTAATAGTACTGCTACACGTACC3'
PR1	F 5' AAA CTCGAG GATTCTGAGAGTGATGTAAGC3'
	R 5' CT CCATGG TATTGCATAGGTTAGCTTGC3'
	R 5' CT CCATGG TGTTGCATAGGTTAGCGTGC3'
NPR1	F 5' AAA CTCGAG CTGCAAGATCATCTAGCACC3'
	R 5' CT CCATGG TCGAGGGCAAAGGTGTAATAG3'

II.8.2. Amplificação dos fragmentos

Os iniciadores descritos na Tabela 2.2 foram utilizados para amplificar os fragmentos promotores putativos clonados no vetor *pGem-T Easy* (Promega) empregando a enzima *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen). Nas reações de amplificação foram utilizados (concentração final): 1 µL de DNA plasmidial a 2,5 ng/µL, tampão de PCR (1X), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleotídeo (dNTP mix 10 mM), 0,2 µM de cada oligo (F e R) e 2,5 unidades da enzima *Platinum Taq DNA Polimerase* (5 U/µl, Invitrogen). O volume final da reação foi de 50 µl, o qual foi obtido adicionando-se água deionizada autoclavada.

A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-100 MJ Research) com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 64°C e 2 minutos a 72°C, e por fim, um ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos.

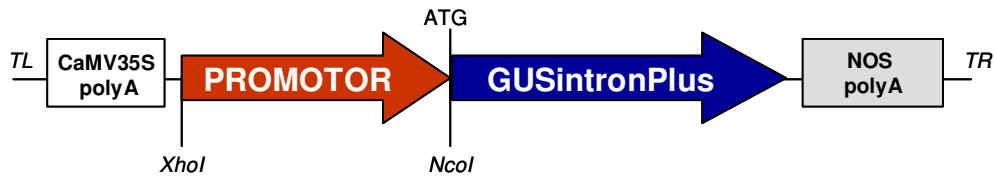
II.8.3. Restrição dos fragmentos e do vetor de expressão em plantas

Os fragmentos amplificados bem como o vetor de expressão em plantas pCAMBIA 1305.1 foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* (Fermentas cat. FD0694) e *NcoI* (Fermentas cat. FD0573).

Após a digestão, os fragmentos de interesse foram purificados em gel de agarose utilizando-se *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, cat. A9281) e ligados ao vetor binário produzindo os seguintes recombinantes: pGAPDH-*uidA*-nos, pAN2-*uidA*-nos, pPR1-*uidA*-nos e pNPR1-*uidA*-nos, respectivamente.

A Figura 2.2 apresenta o mapa de restrição do vetor binário utilizado neste trabalho bem como a representação esquemática dos cassetes de transformação utilizados para a análise funcional dos promotores putativos de café empregando expressão transiente em plantas.

A)



B)

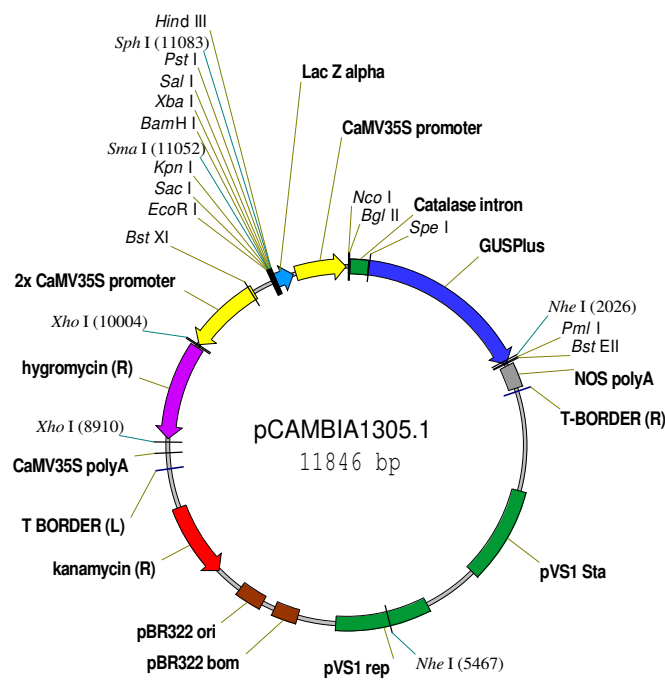


Figura 2.2 - Construções gênicas empregadas. A) Estrutura dos cassetes de transformação utilizados para a análise funcional dos promotores putativos de café. B) Mapa de restrição do vetor binário pCAMBIA 1305.1 contendo o gene repórter GUSPlus (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>).

II.9. Clonagem em vetor binário para transformação de plantas

A ligação dos referidos fragmentos promotores ao vetor de binário para transformação de plantas (pCAMBIA 1305.1) foi realizada utilizando tampão de reação 1 X, aproximadamente 10 ng de vetor, 50 ng de fragmento e 1 U de *T4 DNA ligase* (Fermentas), segundo recomendações do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *E. coli* cepa JM109 como descrito anteriormente (item II.5). Cerca de cinco colônias foram selecionadas para extração de DNA plasmidial utilizando o *PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen, cat. K210003). Uma parte da cultura utilizada na extração de plasmídeos foi mantida congelada (-80 °C) como cultura permanente. Os clones foram analisados quanto ao tamanho dos plasmídeos, bem como ao padrão de digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *NcoI*. Aqueles que apresentaram todos os padrões esperados foram seqüenciados, como descrito no item II.6, utilizando dessa vez o oligo 5'GTCGAAGACGCCACGGGTCTGG3', que é complementar à porção 5' do gene repórter GUS, permitindo verificar se a inserção do fragmento promotor putativo em relação ao gene repórter estava correta.

II.10. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Os cassetes de transformação contendo os promotores putativos de café foram transferidos para células competentes de *A. tumefaciens* linhagem GV3101, contendo o pMP90 como plasmídeo Ti (*Tumor inducing*) (Koncz & Schell, 1986).

Células competentes de *A. tumefaciens* foram obtidas da seguinte maneira: uma colônia isolada foi pré-cultivada em 3 mL de meio YEP (10 g/L extrato de levedura, 10 g/L peptona, 5 g/L NaCl, pH 7,2 ajustado com 1 M NaOH) suplementado com rifampicina (50 µg/mL) e gentamicina (25 µg/mL) por 24 horas a 28 °C (180 rpm). Um mL desta cultura foi transferido para 50 mL de meio YEP contendo rifampicina e gentamicina, utilizando-se as mesmas concentrações finais descritas acima. As

agrobactérias cresceram por mais 16 horas (28 °C, 180 rpm) até atingir uma absorbância a 600 nm entre 0,5-0,9. A cultura foi incubada no gelo por 30 minutos e centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em 10 mL de uma solução 0,5 M NaCl, e centrifugada novamente (5.000 rpm, 5 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi novamente descartado e as células finalmente ressuspensas em 1 mL de CaCl₂ (20 mM) gelado. As células foram aliqüotadas em tubos do tipo Eppendorf e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após este procedimento as células foram armazenadas a -80 °C.

A transformação foi iniciada com a adição de cerca de 500 ng do vetor binário transformado em 50 µL de *A. tumefaciens* competente descongelada (10 minutos no gelo). O DNA plasmidial das seguintes construções foi utilizado: pGAPDH-*uidA*-nos, pAN2-*uidA*-nos, pPR1-*uidA*-nos e pNPR1-*uidA*-nos, respectivamente. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. Após este período, a mistura foi imersa em nitrogênio líquido por 1 minuto e, a seguir, descongelada em banho-maria (37 °C) por 5 minutos. Depois, 250 µL de meio YEP suplementado com MgCl₂ (10 mM) e glicose (20 mM) foram adicionados, e as células mantidas sob agitação (180 rpm) a 28 °C por 4 horas. As células foram plaqueadas em meio LB agar contendo canamicina (100 µg/mL), rifampicina (50 µg/mL) e gentamicina (25 µg/mL) sendo incubadas a 28 °C por cerca de 2 dias.

Cerca de cinco colônias foram selecionadas para extração de DNA plasmidial utilizando o *PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen). Uma parte da cultura utilizada na extração de plasmídeos foi mantida congelada (-80 °C) como cultura permanente (onde foram adicionados 0,3 mL de glicerol estéril 87%). Os clones recombinantes foram verificados por PCR conforme descrito no item II.8.2 deste capítulo. Contudo, como oligo *forward* foi utilizada a seqüência relativa ao gene repórter GUS como relatado no item II.9 deste capítulo.

Os plasmídeos também foram analisados via padrão de digestão com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. 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), conforme descrito no item II.6.

II.11. Análise funcional das regiões promotoras putativas por expressão transiente

As análises funcionais das regiões promotoras putativas de café foram empreendidas utilizando-se protocolos de expressão transiente em folhas de tabaco (Kotzer *et al.*, 2004), e em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* cv MicroTom) (Orzaez *et al.*, 2006).

As plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Helaine Carrer, do Departamento de Ciências Biológicas - CEBTEC (Centro de Biotecnologia Agrícola) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ - USP).

As plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv MicroTom) em fase de frutificação foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, do Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ - USP).

II.11.1. Transformação transiente de plantas por agroinfiltração

A transformação transiente de folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana e *Nicotiana benthamiana*) e frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* cv MicroTom) foi realizada por meio de agroinoculação. As culturas de *A. tumefaciens* transformadas com os vetores de interesse foram crescidas em 10 mL de meio LB complementado pelos

antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas, e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em tampão de infiltração [10 mM MgSO₄ (Merck), 20 mM MES hidratado pH 5,5 (Sigma, cat. M5287) e 200 µM acetosiringona (Sigma, cat. D13440-6), e deixado por no mínimo 3 horas em temperatura ambiente, sem agitação. Utilizando seringas estéreis de 1 mL (sem agulha), a epiderme inferior de folhas jovens de tabaco foram infiltradas com uma solução de *A. tumefaciens* (A_{600nm} de ~0,5) contendo os vetores binários com os promotores em estudo.

Os frutos de tomates em diferentes fases de desenvolvimento também foram infiltrados com uma solução de *A. tumefaciens* (A_{600nm} de ~0,5), empregando-se para tal seringas estéreis de 1 mL com agulha descartável BD estéril (0,55 mm x 20 mm). A agulha foi introduzida cerca de 3-4 mm dentro do fruto, através do ápice do estilo. A solução foi gentilmente injetada até que houvesse uma ligeira mudança na cor do fruto. Quando o fruto estava completamente infiltrado, gotas de solução saíam pelos hidatódios e pelas sépalas. Somente frutos completamente infiltrados foram utilizados nos experimentos de transformação transiente.

Os experimentos foram realizados em quaduplicata, com 4 plantas/tratamento. Três dias após a agroinoculação foram realizadas as análises histoquímicas e fluorimétricas de GUS para determinação da atividade dos promotores.

Os vetores pCAMBIA 1305.1 e pCAMBIA 1381Z foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente, nos ensaios de transformação transiente de plantas por agroinfiltração.

II.11.2. Ensaio histoquímico da atividade GUS

A detecção histoquímica da atividade GUS foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Jefferson (1987). Amostras de tecidos de um experimento foram mantidas no escuro, por 24 horas, e incubadas a 37°C com uma solução contendo 10 mg de X-GLUC (Fermentas, cat. R0851) dissolvido em 100 µL de DMSO (Sigma, cat.

D2438) e diluído em 50 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (20 mM NaH_2PO_4 e 30 mM Na_2HPO_4 , Synth) contendo 10 mM de β -mercaptoetanol (Plus One, Amersham Pharmacia, cat. 17-1317-01), 10 mM de Na_2EDTA pH 8.0 (Synth), 0.1% (p/v) de sarcosil (Sigma, cat. L-9150), 0.1% (v/v) de Triton X-100 (Sigma, cat. T8787), 5 mM de ferrocianeto de potássio $\{\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]\}$, Synth} e 5 mM de ferricianeto de potássio $\{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]\}$, Synth}. Após este período, as amostras foram mantidas em 85% (v/v) etanol (Dinâmica) para a remoção da clorofila.

II.11.3. Ensaio fluorimétrico da atividade GUS

O ensaio fluorimétrico foi realizado empregando-se o substrato 4-metilumbeliferona- β -D-glucuronídeo (MUG), que é hidrolizado pela enzima GUS, resultando em ácido glucurônico e 4-metilumbeliferona (MU), que apresenta fluorescência em pH alcalino (Jefferson, 1987; Brasileiro & Carneiro, 1998).

Discos foliares retirados das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, em triplicata, foram macerados em nitrogênio líquido e ressuspendidos em 1 mL do tampão de extração de proteínas [0,5 M fosfato de sódio monobásico pH 7,0 (Synth), 50 mM EDTA pH 8,0 (GIBCO–BRL, cat. 15576-028), 0,1% (p/v) sarcosil; 0,1% (v/v) Triton X-100 10% (v/v), 10 mM β -mercaptoetanol]. Em seguida procedeu-se uma centrifugação a 12.000 x g, por 15 minutos, a 4°C. O extrato protéico resultante foi utilizado para análise da atividade GUS.

Para tal foram preparadas duas repetições de cada amostra contendo, respectivamente, 10 μL do extrato protéico proveniente dos discos foliares, e 200 μL do tampão de ensaio GUS [tampão de extração de proteínas contendo 1 mM do substrato MUG (Sigma, cat. M-9130)]. A mistura foi incubada a 37°C no escuro. A cada 15 minutos, desde o início da reação, uma alíquota de 20 μL foi amostrada e colocada em 1.980 μL de tampão de parada (0,2 M Na_2CO_3). Este procedimento foi realizado 5 vezes. A atividade enzimática foi determinada com o uso do Fluorímetro *DyNA*

Quant 200 (Hoefer/Pharmacia), utilizando-se MU como padrão de calibração, de acordo com Brasileiro & Carneiro (1998). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Greenberg [0,01% (p/v) azul de bromofenol (Sigma, cat. B-5525), 7,6% (v/v) etanol absoluto (Dinâmica), 1,2% (v/v) ácido acético glacial (Synth) e 2% (v/v) Triton X-100 em água deionizada estéril]. Para tal utilizou-se 10 µL do extrato protéico, 200 µL da solução de Greenberg em 1 mL de água deionizada estéril. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro *Ultrospec 7100 pro* (Amersham Biosciences) a uma absorvância de 595 nm e a curva-padrão foi obtida a partir de uma solução 25 µg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma, cat. A7030), de acordo com Brasileiro & Carneiro (1998).

Os valores, em unidades de fluorescência, obtidos no ensaio fluorimétrico representam a quantidade de MU liberada pela atividade da β-glucuronidase. Esses valores também representam a fluorescência de compostos presentes no extrato (lipídios, proteínas, fenóis, etc.), e a fluorescência que resulta da quebra do substrato (MUG) pela atividade endógena de GUS ou por hidrólise espontânea. Portanto, para a determinação da atividade GUS, é importante avaliar amostras que contenham extratos de plantas não-transformadas (branco da reação) e de amostras sem extrato, com adição do substrato MUG (branco do substrato). O valor da leitura do branco do substrato deve ser subtraído das leituras das amostras. Apenas as amostras cujo valor tenha sido no mínimo duas vezes o valor do controle não-transformado podem ser consideradas positivas, ou seja, apresentam atividade da GUS exógena.

No fluorímetro *DyNA Quant 200*, devidamente calibrado, uma leitura de 500 unidades corresponde a 50 nM de MU, ou seja, 10 unidades de fluorescência = 1 nM de MU. Portanto, para calcular a quantidade de MU formada pela reação enzimática, os valores das leituras são divididos por 10, obtendo-se a concentração molar correspondente de MU (em nM).

A atividade GUS é expressa em moles de MU formados por minuto. Portanto, para se determinar a quantidade total de MU presente na amostra, multiplica-se o valor obtido anteriormente pelo volume da cuveta, expresso em litros, que corresponde a 0,002 L.

Para o cálculo da atividade específica, é necessário determinar, inicialmente, a quantidade de proteína contida no extrato (em $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, calcula-se o volume de extrato presente na leitura (considerando-se a diluição no tampão de reação, bem como a diluição no tampão de parada - 0,2 M Na_2CO_3) e multiplica-se pela concentração da proteína.

II.12. Resultados obtidos

II.12.1. Análise funcional das putativas regiões promotoras

Visando avaliar a funcionalidade e especificidade das regiões promotoras isoladas no presente trabalho, cassetes de expressão foram desenvolvidos de acordo com o item II.9. deste capítulo e utilizados em experimentos de expressão transiente em folhas de tabaco e frutos de tomate. Para tal foram utilizadas as seguintes construções: controle positivo (vetor pCAMBIA 1305.1), pGAPDH-*uidA*-nos, pAN2-*uidA*-nos, pPR1b.1-*uidA*-nos, pPR1b.2-*uidA*-nos, pNPR1-*uidA*-nos e controle negativo (pCAMBIA 1381Z).

Todas as construções foram agroinfiltradas em folhas de tabaco. Contudo, somente as construções pGAPDH-*uidA*-nos, pAN2-*uidA*-nos, juntamente com os controles positivo e negativo, foram agroinjetadas em frutos de tomate.

Por meio do ensaio histoquímico da enzima β -glucuronidase em folhas de tabaco, observou-se que apenas as construções contendo os promotores dos genes de defesa *pPR1b.1*, *pPR1b.2* e *pNPR1* foram funcionais, ou seja, foi detectada atividade GUS nos tecidos infiltrados (Figura 2.3). É importante ressaltar que o promotor do gene *NPR1* somente foi funcional mediante aplicação de 0,5 mM de ácido salicílico (AS, Sigma,

cat. S-7401) (Figura 2.3F). Entretanto, a análise fluorimétrica da atividade GUS em folhas de tabaco revelou que a construção pGAPDH-*uidA*-nos é funcional (Figura 2.4). Por outro lado, não foi detectada atividade GUS na construção pAN2-*uidA*-nos, fato esperado, pois nessa construção o gene repórter encontra-se sob o controle de um promotor putativamente fruto-específico.

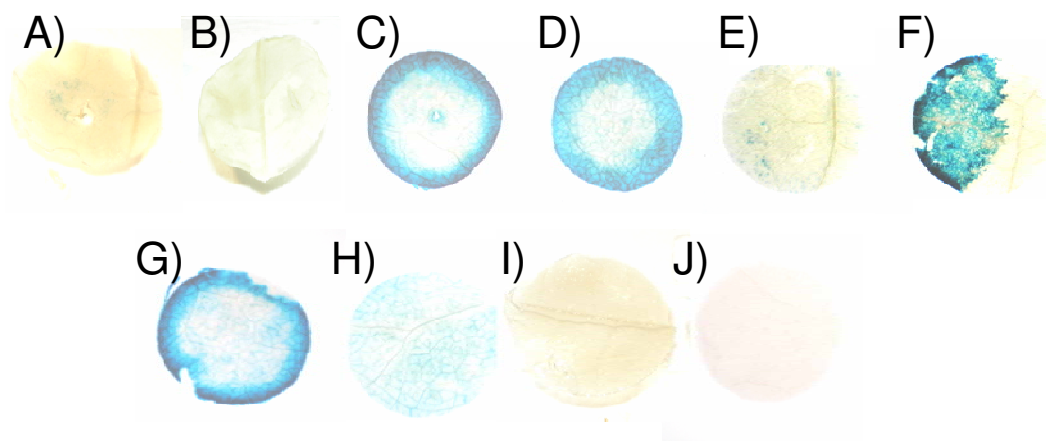


Figura 2.3 - Ensaio histoquímico para a atividade GUS em folhas de tabaco infiltradas com as seguintes construções: A) pGAPDH-*uidA*-nos; B) pAN2-*uidA*-nos; C) pPR1b.1-*uidA*-nos; D) pPR1b.2-*uidA*-nos; E) pNPR1-*uidA*-nos, sem aplicação de ácido salicílico; F) pNPR1-*uidA*-nos, com aplicação de 0,5 mM ácido salicílico; G) controle positivo (vetor pCAMBIA 1305.1); H) controle negativo (pCAMBIA 1381Z); I) controle negativo (injeção do meio de infiltração); J) controle negativo (folha sem tratamento).

Como o promotor relativo ao gene de defesa *NPR1* foi ativado mediante aplicação de AS, procurou-se investigar se os demais promotores dos genes de defesa em estudo (*PR1b.1* e *PR1b.2*) também eram AS-dependentes (Figura 2.4). Como resultado não foi encontrada diferença significativa na expressão da enzima β -glucuronidase nos tecidos infiltrados com as construções pPR1b.1-*uidA*-nos e pPR1b.2-*uidA*-nos, bem como nos controles positivo e negativo. Assim, somente o promotor *CaNPR1* mostrou-se responsivo a aplicação de AS.

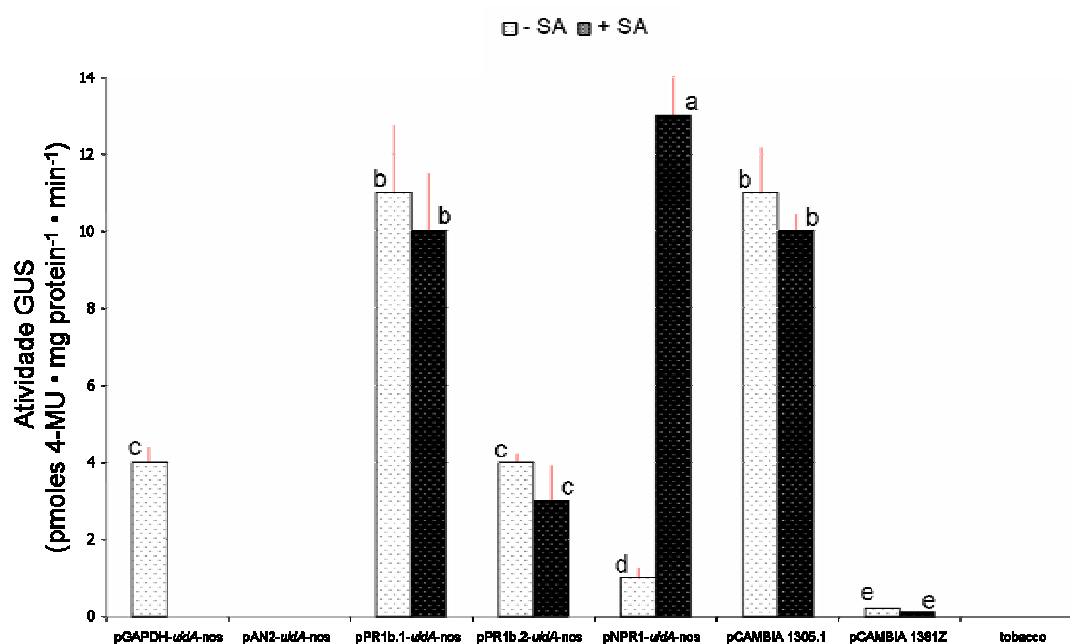


Figura 2.4 - Ensaio fluorimétrico para a atividade GUS em folhas de tabaco (*N. tabacum* cv Petit Havana) infiltradas com as construções em estudo. A barra em vermelho representa o desvio padrão. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Fisher's LSD test, $P \leq 0.05$).

Para verificar a funcionalidade do promotor fruto-específico foi realizada a agroinfiltração desta construção (pAN2-*uidA*-nos) em frutos de tomate em diferentes estágios do desenvolvimento. Nesta ocasião, aproveitou-se a oportunidade para testar a atividade GUS da construção pGAPDH-*uidA*-nos. Os controles positivos e negativos foram semelhantes aos empregados anteriormente. Na Figura 2.5 é possível observar que a atividade GUS foi detectada em todas as amostras de fruto infiltradas com as diferentes construções, incluindo o controle negativo (vetor pCAMBIA 1381Z), o qual não apresenta um promotor à montante da região codificadora do gene repórter *uidA* (*gusA*).

Segundo Plegt & Bino (1989), Hu *et al.* (1990) e Hodal *et al.* (1992), algumas plantas ou tecidos, particularmente órgãos reprodutivos, apresentam atividade similar à da enzima GUS. Na maioria das vezes, essa atividade endógena é muito inferior à observada em plantas transgênicas, quando o gene repórter está sob o controle de um promotor forte. No entanto, dependendo do promotor utilizado e do tipo de tecido, a atividade endógena de GUS pode ser até mais elevada do que a resultante da expressão do gene repórter, o que interfere nas análises (Twell *et al.*, 1989; Brasileiro & Carneiro, 1998). A atividade GUS em tecidos não transgênicos (falsos positivos) também pode ser decorrente da presença de contaminações endofíticas (bactérias ou fungos) (Tör *et al.*, 1992). Assim, para a certificação da funcionalidade dos promotores dos genes *CaGAPDH* e *CaAN2*, será realizada a transformação estável de plantas de tomates cv MicroTom, segundo metodologia utilizada no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, sob orientação do Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres.

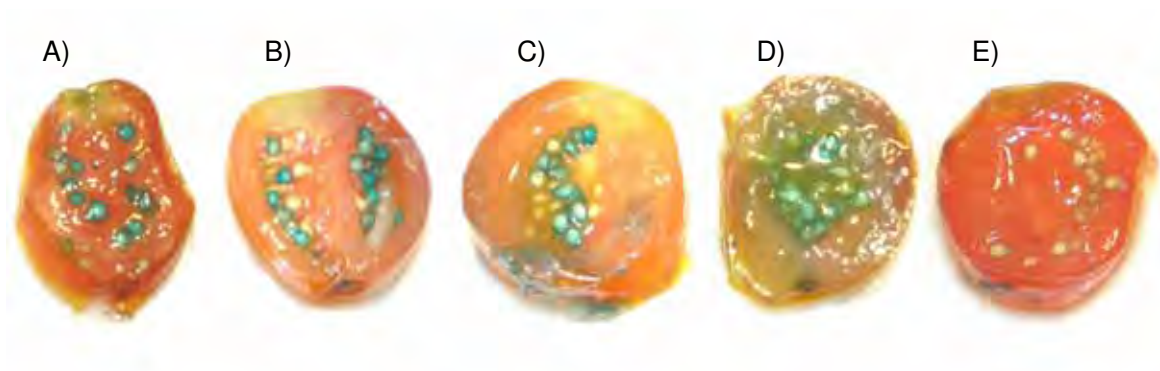


Figura 2.5 - Ensaio histoquímico para a atividade GUS em frutos de tomate infiltrados com as seguintes construções: A) pGAPDH-*uidA*-nos; B) pAN2-*uidA*-nos; C) controle positivo (vetor pCAMBIA 1305.1); D) controle negativo (pCAMBIA 1381Z); E) controle negativo (injeção do meio de infiltração).

II.12.2. Caracterização das putativas regiões promotoras isoladas

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

As seqüências promotoras analisadas foram amplificadas empregando seqüências de ESTs obtidas no Banco do Genoma Café (Vieira *et al.*, 2006). O acesso a este Banco de Dados é restrito e condicionado à autorização pelo Comitê Gestor do Genoma Café, cujos membros são formados pela FAPESP, Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D/Café) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Os dados são, portanto, confidenciais e não podem ser divulgados publicamente durante o período previsto de confiabilidade. Desta maneira, as seqüências obtidas não serão apresentadas neste trabalho.

De acordo com análises *in silico* realizadas junto ao banco PLACE, ao longo da região promotora do gene ubíquo (1459 pb; denominada *pCaGAPDH*) foram encontrados 353 elementos *cis*-regulatórios putativos, enquanto que nos 1186 pb correspondentes à região promotora do gene fruto-específico (*pCaAN2*) foram encontrados 275. Em relação aos genes de defesa, foram identificadas duas diferentes regiões promotoras para o gene *CaPR1b* (as quais apresentam 95% de identidade): *pCaPR1b.1*, com 201 putativos *cis*-elementos em 820 pb, e *pCaPR1b.2*, apresentando 247 em 822 pb. Foi identificada uma região promotora de 1444 pb para o gene *CaNPR1* (*pCaNPR1*), a qual apresenta 364 putativos *cis*-elementos regulatórios.

II.12.2.1. Promotor do gene *GAPDH* de café (*pCaGAPDH*)

II.12.2.1.1. O gene *GAPDH*

A EST que codifica a *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) de café foi identificada em análises *in silico* (*Northern* eletrônico) realizadas no banco de dados de ESTs de café (*Contig 7855*) (www.lge.ibi.unicamp.br/cafe). A expressão ubíqua do gene correspondente (denominado *CaGAPDH*) foi comprovada por ensaios de PCR qualitativa e quantitativa (ver Figuras 1.8 e 1.9g). De acordo com Barsalobres-Cavallari *et al.* (2009), o gene *CaGAPDH* é um potencial normalizador (referência interna) para estudos de expressão gênica, por apresentar níveis de transcritos equivalentes nos diferentes órgãos/tecidos de café arábica analisados.

A região codificadora do gene *CaGAPDH* apresenta 82% de identidade (BLASTN) e 88% de similaridade (BLASTP) com o gene *GapC* que codifica a *GAPDH* citosólica de *Nicotiana tabacum* (Shih *et al.*, 1986).

Através da Figura 2.6, onde é apresentada uma árvore filogenética baseada na seqüência protéica de genes *GAPDH*, é possível observar que a proteína *GapC* é altamente conservada entre diferentes

organismos. Isto é evidenciado pelo fato de que o grupo monofilético dos animais está contido no clado dos vegetais, um reflexo de que este gene sofreu poucas mutações desde o ancestral em comum entre os animais e vegetais. Ainda é possível observar que as GAPDH cloroplastidiais GapA e GapB formam um clado com a proteína GAPDH de *E. coli*.

II.12.2.1.2. A enzima GAPDH

A enzima GAPDH, presente em todos os organismos vivos, está envolvida no metabolismo do carbono (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993). As plantas possuem dois tipos de proteínas GAPDH: as enzimas GAPDH NAD- (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) dependentes, e as NADP- (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) dependentes (Cerff & Chambers, 1979; Cerff, 1982).

No cloroplasto, a proteína GAPDH (EC 1.2.1.13) apresenta-se como homotetrâmero, constituída por quatro subunidades de GapA (EC 1.2.1.13:1), ou como heterotetrâmero, constituída por duas subunidades de GapA e duas subunidades de GapB (EC 1.2.1.13:2) (Cerff, 1982; Brinkmann, *et al.*, 1989; Shin *et al.*, 1991). Estas enzimas são NADP-dependentes e estão envolvidas no processo fotossintético de fixação e redução de carbono que ocorre no estroma cloroplastidial (ciclo de Calvin-Benson). A função destas proteínas é catalisar a oxidação do *glyceraldehyde-3-phosphate* (G3P) em ácido difosfoglicérico, usando um ânion ortofosfato (PO_4^{3-}) como co-fator nas reações catalíticas.

A enzima GAPDH (EC 1.2.1.12) citosólica NAD-dependente é um homotetrâmero de idênticas subunidades constituídas por GapC (Cerff, 1982; Martin & Cerff, 1986; Brinkmann, *et al.*, 1989). GapC é encontrada, e conservada, em todos os organismos participando do processo glicolítico (Tso *et al.*, 1985), no qual catalisa a conversão de G3P em 1,3-bisfosfoglicerato. É uma enzima importante na via Embden-Meyerhoff, não só por atuar na glicólise, como também nos processos de gliconeogênese (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993; Plaxton, 1996; Valverde *et al.*, 1999).

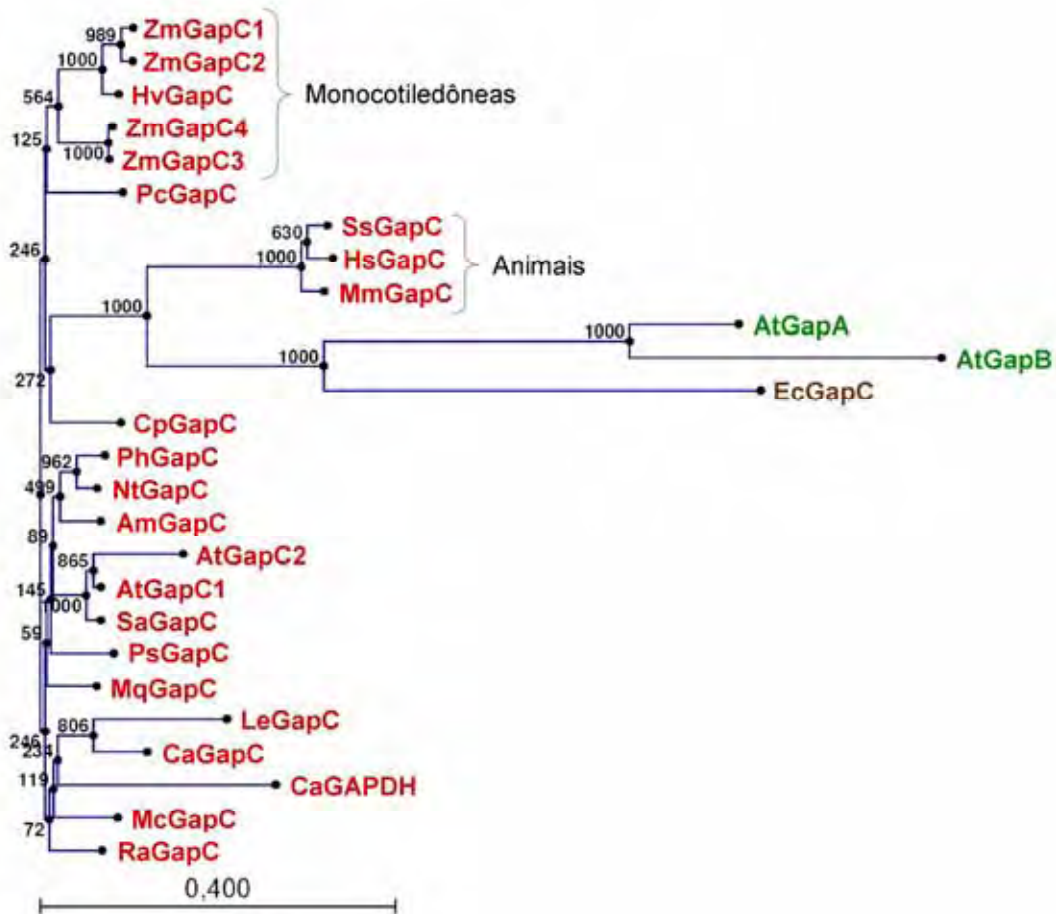


Figura 2.6 - Árvore filogenética de proteínas GAPDH baseada no método *neighbor joining*. Os valores de *bootstrap* foram realizados com base em 1000 repetições e estão indicados ao lado dos ramos. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramo nas unidades idênticas às das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o programa *CLC Sequence Viewer 5.1.1*. Em vermelho estão representadas as proteínas citoplasmáticas; em verde as cloroplastidiais e em marrom as de origem bacteriana. As seqüências de aminoácidos utilizadas foram as seguintes: ZmGapC1 (CAA30151, *Z. mays*), ZmGapC2 (Q09054, *Z. mays*), HvGapC (CAA42901, *Hordeum vulgare*), ZmGapC4 (NP_001105951, *Z. mays*), ZmGapC3 (Q43247, *Zea mays*), PcGapC (CAA42902, *Petroselinum crispum*), SsGapC (P00355, *Sus scrofa*), HsGapC (NP_002037, *Homo sapiens*), MmGapC (P16858, *Mus musculus*), AtGapA (AAD10209, *Arabidopsis thaliana*), AtGapB (NP_174996, *A. thaliana*), EcGapC (YP_001458212, *Escherichia coli*), CpGapC (CAA55116, *Craterostigma plantagineum*), PhGapC (CAA42904, *Petunia x hybrida*), NtGapC (CAB39974, *Nicotiana tabacum*), AmGapC (CAA42103, *Antirrhinum majus*), AtGapC2 (NP_001077530, *A. thaliana*), AtGapC1 (NP_187062, *A. thaliana*), SaGapC (CAA27844, *Sinapis alba*), PsGapC (AAA33667, *Pisum sativum*), MqGapC (CAA42905, *Magnolia quinquepetala*), LeGapC (AAB54003, *Lycopersicon esculentum*), CaGapC (CAC80376, *Capsicum annuum*), CaGAPDH (*Coffea arabica*), McGapC (AAA33033, *Mesembryanthemum crystallinum*), RaGapC (CAA42903, *Ranunculus acris*).

Uma quarta isoforma da proteína GAPDH é a NP-GAPDH (EC 1.2.1.9), também chamada de Pi-independente G3P:NADP⁺-oxidoreductase, uma proteína citosólica *non-phosphorylating* NADP-dependente, que catalisa a oxidação irreversível de G3P em 3-fosfoglicerato (3PGA) (Cerff, 1982; Serrano *et al.*, 1993; Valverde *et al.*, 2005). A quinta isoforma desta proteína é GapCp (EC 1.2.1.12), proteína plastidial NAD-dependente envolvida no processo glicolítico para produção de energia em plantas não-verdes (Meyer-Gauen *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 2003; Marri *et al.*, 2005). Tanto as enzimas GAPDH citosólicas como as plastidiais são codificadas por genes nucleares (Weeden & Gottlieb, 1980; Gottlieb, 1982; Cerff & Klopstech, 1982).

Muito se sabe a respeito da estrutura gênica, evolução e propriedades funcionais da GAPDH (Martin & Cerff, 1986; Shih & Goodman, 1988; Smith, 1989; Koksharova *et al.*, 1998; Fagan *et al.*, 1998; Viscogliosi & Müller, 1998; Fillinger *et al.*, 2000; Liaud *et al.*, 2000; Figge & Cerff, 2001; Qian & Keeling, 2001; Harper & Keeling, 2003; Perusse & Schoen, 2004; Takishita *et al.*, 2004; Ebihara *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2005; Erales *et al.*, 2008; Schuettpelz *et al.*, 2008; Archibald, 2009; Takishita & Inagaki, 2009). Em plantas, a maioria dos estudos tem como foco as isoformas cloroplastidiais da proteína GAPDH, pois estas estão envolvidas no processo fotossintético (Melandri *et al.*, 1970; Wolosiuk & Buchanan, 1978; Cerff, 1979; Conley *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 2003; Sparla *et al.*, 2005; Marri *et al.*, 2005; Fermani *et al.*, 2007; Takishita *et al.*, 2008; Takishita *et al.*, 2009).

Em relação às isoformas citosólicas, alguns estudos de relação estrutura-função (Mateos & Serrano, 1992; Habenicht *et al.*, 1994; Michels *et al.*, 1994; Manjunath & Sachs, 1997; Petersen *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004; Hancock *et al.*, 2005; Fourrat *et al.*, 2007; Holtgreffe *et al.*, 2008, Rius *et al.*, 2008; Schuettpelz *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009) e das propriedades cinéticas (Gómez Casati *et al.*, 2000; Bustos & Iglesias, 2002; Iglesias *et al.*, 2002; Bustos & Iglesias, 2003) foram conduzidos. Contudo, poucos estudos evidenciam funções *in vivo* (Laxalt *et al.*, 1996; Hänsch *et al.*, 2003; Fernie *et al.*, 2004; Hajirezaei *et al.*, 2006; Rius *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). De

acordo com Chuong *et al.* (2004), proteínas GapC estão associadas ao citoesqueleto de diferentes organismos, inclusive de plantas. Adicionalmente, foi relatado que estas isoformas participam do metabolismo de carboidratos em *Arabidopsis*, tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias (Giege *et al.*, 2003; Holtgrawe *et al.*, 2005). Segundo Giege *et al.* (2003), proteínas glicolíticas podem ser importantes no metabolismo energético em mitocôndrias, bem como na regulação de suas funções. Adicionalmente, a presença de GapC e NP-GAPDH no citosol estabelece um *bypass* do fluxo de carbono durante a glicólise, o que é um importante mecanismo para a flexibilidade dos organismos, principalmente em resposta aos estresses ambientais. Contudo, as conseqüências precisas da via de “economia” do carbono em relação ao crescimento e desenvolvimento de plantas ainda não foram exploradas.

II.12.2.1.3. Caracterização do promotor do gene *CaGAPDH*

Análises *in silico* utilizando bancos de dados específicos evidenciaram a presença de 353 elementos *cis*-regulatórios putativos em 1459 pb da região promotora do gene ubíquo (*pCaGAPDH*) de café.

Dentre os 353 elementos *cis*-regulatórios putativos encontrados no *pCaGAPDH*, 86 diferentes tipos de *cis*-elementos foram identificados. Dentre estes, a classe mais representada foi a GT1CONSENSUS (GRWAAW), com 26 motivos. De acordo com a literatura, este elemento está relacionado com fatores de transcrição regulados por luz (Terzaghi & Cashmore, 1995), e que também podem controlar tecido-especificidade (Villain *et al.*, 1996). Mutações deste *cis*-elemento no promotor do gene *PR1a* de *Nicotiana tabacum* mostraram sua influência negativa nos níveis de expressão deste gene (Buchel *et al.*, 1999). Zhou (1999) apresenta uma revisão sobre os mecanismos de regulação da transcrição em plantas por estes elementos e seus fatores reguladores.

Em relação aos demais promotores identificados neste trabalho, onze *cis*-elementos foram exclusivos de *pCaGAPDH*. Foram encontradas duas repetições dos elementos ATHB5ATCORE, ATHB2ATCONSENSUS, BOXLCOREDPCAL e HBOXCONSENSUSPVCHS; e uma repetição dos elementos HBOXPVCHS15, MYB1LEPR, BOXCPSAS1, SBOXATRBCS, PROXBBNAPA, SEF3MOTIFGM, e SP8BFIBSP8BIB. Os elementos BOXLCOREDPCAL (Maeda *et al.*, 2005), HBOXCONSENSUSPVCHS (Loake *et al.*, 1992; Terzaghi & Cashmore, 1995; Mhiri *et al.*, 1997; Lindsay *et al.*, 2002), HBOXPVCHS15 (Yu *et al.*, 1993) e MYB1LEPR (Chakravarthy *et al.*, 2003) estão relacionados com defesa das plantas contra agentes elicitores bióticos ou abióticos. O elemento BOXCPSAS1 está negativamente relacionado com a presença de luz (Ngai *et al.*, 1997). Já o elemento SBOXATRBCS, presente em vários promotores do gene *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit (rbcS)* em *Arabidopsis*, foi descrito como positivamente regulado por luz e negativamente regulado por açúcar e ácido abscísico (ABA) (Acevedo-Hernandez *et al.*, 2005). Os elementos PROXBBNAPA (Busk & Pages, 1998; Ezcurra *et al.*, 1999; Ezcurra *et al.*, 2000), SEF3MOTIFGM (Allen *et al.*, 1989; Lessard *et al.*, 1991) e SP8BFIBSP8BIB (Ishiguro & Nakamura, 1992; Ishiguro & Nakamura, 1994) estão relacionados com tecido-especificidade, sendo os dois primeiros relatados em promotores semente-específicos, e o último em promotores específicos de raiz. Os elementos ATHB2ATCONSENSUS e ATHB5ATCORE estão relacionados a fatores de transcrição do tipo HDzip (*Homeodomain-leucine zipper*) (Sessa *et al.*, 1993; Johannesson *et al.*, 2001; Henriksson *et al.*, 2005).

As análises *in silico* evidenciaram também a presença de oito elementos do tipo GATABOX nesse promotor. Este *cis*-elemento foi encontrado no promotor do gene *GapA* de *Arabidopsis*, que codifica a subunidade A do gene *GADPH* de função cloroplastidial, o qual é responsivo à luz e confere tecido-especificidade (Conley *et al.*, 1994).

O motivo TBOXATGAPB (T-Box) foi encontrado duas vezes no *pCaGAPDH* (posições -70 e -1250). De acordo com Chan *et al.* (2001), mutações nos elementos T-Box encontrados nas posições -79 e -89 do promotor do gene *GapB* (que codifica a subunidade B do gene *GADPH* de função cloroplastidial de *A. thaliana*), resultou em redução da transcrição de genes positivamente regulados por luz.

O promotor do gene *GapC* de *Arabidopsis* (que codifica proteínas GAPDH de função citoplasmática) foi estudado por Yang *et al.* (1993). Segundo estes autores, este promotor é induzido por choque térmico e por condições anaeróbicas. A presença de oito elementos do tipo CCAATBOX1 no promotor do gene *CaGAPDH* é indicativa de uma possível regulação por choque térmico. Este *cis*-elemento está presente na região promotora de genes *hsp* (*heat shock protein*) e agem sinergisticamente com HSE (*Heat Shock Elements*) para aumentar a atividade do promotor em condições de choque térmico (Williams & Morimoto, 1990; Rieping & Schöffl, 1992; Chinn & Comai, 1996; Haralampidis *et al.*, 2002; Wenkel *et al.*, 2006). Adicionalmente, dois elementos do tipo ANAERO1CONSENSUS (ARE, *Anaerobic Response Element*), juntamente com dois elementos dos tipos ACGTATERD1 e ABRELATERD1 (G-box core), respectivamente, foram identificados no *pCaGAPDH*. Estes *cis*-elementos são encontrados em regiões promotoras de genes “anaeróbicos”, ou seja, relacionados com a via de fermentação, de acordo com análise *in silico* realizada por Mohanty *et al.* (2005).

Segundo Yang *et al.* (1993), o promotor do gene *AtGapC* apresenta tecido-especificidade em condições anaeróbicas, ou seja, quando o seu promotor foi fusionado ao gene repórter GUS, observou-se atividade da enzima somente nas raízes de plantas de tabaco transgênicas transformadas com tal cassete. Em milho, *GapC* é codificada por uma pequena família gênica constituída pelos genes *gpc1*, *gpc2*, *gpc3* e *gpc4* (Kersanach *et al.*, 1987; Brinkman *et al.*, 1989; Russell & Sachs, 1989; Russell & Sachs, 1991). Segundo dados da literatura, as proteínas *GapC3/4* são sintetizadas em raízes em condições anaeróbicas (Russell & Sachs,

1989; Xie & Wu, 1989; Manjunath & Sachs, 1997). De acordo com Manjunath & Sachs (1997), estas isoformas não são induzidas em condições de frio, choque térmico ou estresse salino. Em contraste, os genes *gpc1* e *gpc2* se mostraram constitutivos ou tiveram sua expressão diminuída somente após um longo período de anoxia (Russell & Sachs, 1989).

Os demais putativos *cis*-elementos regulatórios presentes no *pCaGAPDH* foram agrupados de acordo com a definição apresentada no banco de dados PLACE (Figura 2.7), a saber: defesa, luz, fatores de transcrição, outros (açúcar, aminoácidos, fitohormônios, íons, fermentação, desidratação), e tecido-especificidade (fruto, meristema, floema, pólen, raiz, semente, xilema). Pela análise da Figura 2.7 é possível verificar que a maioria dos *cis*-elementos identificados estão relacionados a fatores de transcrição (29%), seguidos de elementos relacionados a tecido-especificidade (26%), sendo que a maioria destes (12%) é encontrada em promotores de genes que codificam proteínas específicas de semente. A classe menos representada é a que apresenta os *cis*-elementos relacionados à defesa (8%). Na Figura 2.8 encontra-se um esquema da estrutura deste promotor.

Como é possível constatar, diversos dos elementos putativos identificados na caracterização *in silico* deste promotor tem respaldo funcional da literatura. É importante ressaltar que os níveis de expressão dos genes *GapC* podem variar de acordo com o tipo de estresse e condições biológicas às quais as plantas são submetidas (Shih & Goodman, 1988; Yang *et al.*, 1993; Velasco *et al.*, 1994; Laxalt *et al.*, 1996; Manjunath & Sachs, 1997; Hänsch *et al.*, 2003; Hajirezaei *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Rius *et al.*, 2008).

pCaGAPDH

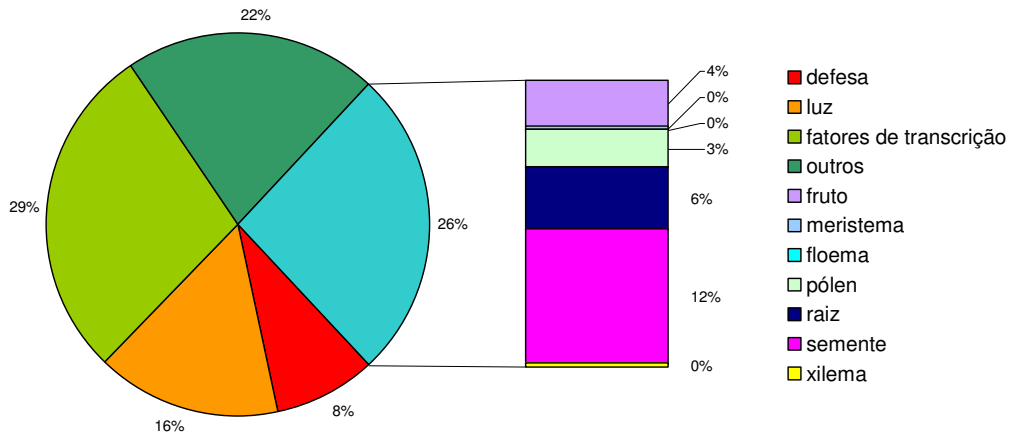


Figura 2.7 - Diferentes classes de elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor putativo do gene *GAPDH* de café (*pCaGAPDH*).

A)



B)

aba	auxina	calcio	citocinim	giberilin
fruto	meristema	floema	pólen	raiz
semente	xilema	BELL	bZIP	DOF
E2Z	G-Box	MADS	myb	myc
RAV1	RAV2	S1F		

Figura 2.8 - Esquema da estrutura de elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor putativo do gene *CaGAPDH* (*pCaGAPDH*). As cores em (A) representam as diferentes classes de elementos regulatórios e identificados de acordo com escala de cores disponibilizada no quadro em (B). As marcas em preto abaixo das caixas coloridas em (A) indicam os putativos TATA-Box encontrados no promotor do gene *GAPDH* de café.

II.12.2.2. Promotor do gene *AN2* de *Coffea arabica* (*pCaAN2*)

II.12.2.2.1. O gene *AN2*

Em *Petunia*, o gene *AN2* (*anthocyanin 2*) codifica um fator de transcrição do tipo MYB, necessário para a síntese de antocianina, que atua, principalmente, regulando a expressão de genes *DFR* (diidroflavonol redutase) (Quattrocchio *et al.*, 1998; Quattrocchio *et al.*, 1999; Spelt *et al.*, 2000; Spelt *et al.*, 2002).

A EST que codifica o fator AN2 de café foi selecionado como um candidato fruto-específico pelas análises *in silico* (*Northern* eletrônico) realizadas no banco de dados de ESTs de café (*Contig* 3913) (www.lge.ibi.unicamp.br/cafe). A expressão fruto-específica do gene correspondente (denominado *CaAN2*) foi comprovada por ensaios de PCR quantitativa (ver Figura 1.12). A região codificadora do gene *CaAN2* apresenta 80% de identidade (BLASTN) e 58% de similaridade (BLASTP) com o gene *AN2* de *Petunia integrifolia* (Figura 2.9).

Genes *MYB* fazem parte da maior família de fatores de transcrição descritos até hoje. Em contraste com outros eucariotos, que contém poucos genes por genoma haplóide, o número de genes desta família no genoma das plantas é consideravelmente maior (Lipsick, 1996; Romero *et al.*, 1998; Stracke *et al.*, 2001). Pelo menos 85 genes MYB-R2R3 foram identificados em *A. thaliana* (Romero *et al.*, 1998).

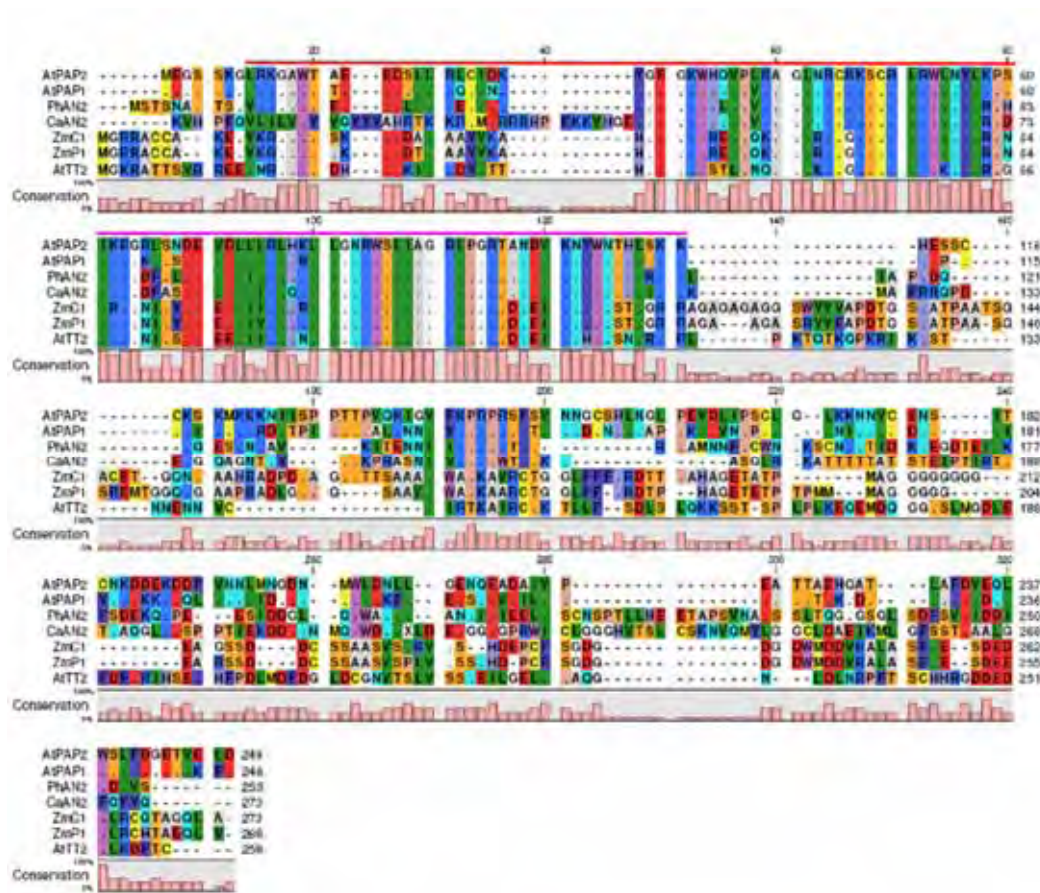


Figura 2.9 - Seqüência protéica codificada pelo gene *CaAN2* e comparações com proteínas AN2 de outras espécies. As linhas em vermelho e rosa indicam as repetições R2 e R3, respectivamente, de proteínas MYB-R2R3, de acordo com Wilkins *et al.* (2009). As seqüências protéicas foram alinhadas utilizando-se o programa CLC Sequence Viewer 5.1.1. No alinhamento foram utilizadas proteínas do tipo MYB relatadas como reguladoras da biossíntese de antocianinas (Mathews *et al.*, 2003): *Arabidopsis* PAP2 (AtPAP2; gi|11935173); *Arabidopsis* PAP1 (AtPAP1; gi|11935171); *Petunia* AN2 (PhAN2; gi|7673084); *Coffea arabica* AN2 (CaAN2); *Zea mays* C1 (ZmC1; gi|127585); *Z. mays* P1 (ZmP1; gi|7438350); *Arabidopsis* TT2 (AtTT2; gi|14272363).

Proteínas MYB de animais são formadas por três repetições (R1, R2 e R3). Nas plantas, a maioria destas proteínas possui duas repetições imperfeitas (R2R3), no entanto, já foram relatadas proteínas contendo uma ou três repetições (Martin & Paz-Ares, 1997; Kranz *et al.*, 1998; Kranz *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2009). Essa estrutura modular compreende domínios funcionais que permitem que a ativação da transcrição seja altamente regulada (Du *et al.*, 2009). O domínio de ligação ao DNA pode ser formado por um, dois ou três motivos hélice-volta-hélice variáveis (R1, R2 e R3), que apresentam 51-52 aminoácidos (Tanikawa *et al.*, 1993). Tais motivos apresentam três resíduos de triptofano (W) regularmente espaçados, que desempenham função no dobramento do centro hidrofóbico do domínio. O primeiro triptofano da repetição R3 pode substituído por outro aminoácido hidrofóbico na maioria das proteínas MYB de plantas (Martin & Paz-Ares, 1997). O domínio de transativação (TAD; *Transactivation Domain*), que funciona na regulação da transcrição em *trans*, varia tanto em composição quanto em sua posição relativa dentro das proteínas MYB de diversos organismos (Urao *et al.*, 1996; Sainz, *et al.*, 1997).

Comparações entre proteínas MYB de animais e plantas revelaram que há maior conservação entre a mesma repetição em diferentes organismos do que entre as repetições em uma mesma proteína (Martin & Paz-Ares, 1997). Pelo fato de genes MYB-R2R3 serem, praticamente, exclusivos das plantas, especula-se que os mesmos estejam envolvidos na regulação de processos e funções específicos (Martin & Paz-Ares, 1997; Wilkins *et al.*, 2009).

As proteínas MYB podem ser classificadas em três subfamílias de acordo com o número de repetições adjacentes no domínio (Rosinsk & Atchley, 1998; Jin & Martin, 1999). Proteínas com uma repetição são denominadas MYB-R1, com duas repetições como MYB-R2R3 e com três repetições como MYB-R3. Proteínas com apenas uma repetição são bastante divergentes e incluem fatores que se ligam à seqüência consenso do DNA telomérico (TTTAGGG) (Stracke *et al.*, 2001).

A seqüência alvo do domínio MYB no promotor dos genes é um motivo consenso denominado sítio de ligação ao MYB (MBS; *MYB-Binding Site*), que podem ser de três tipos: MBS1, MBS2 e MBS2G (Kamiya *et al.*, 2002).

Considerando todas as proteínas MYB percebe-se que há grande diversidade de funções, como a de reguladores transcricionais, e bioquímicas, relacionadas ao relógio circadiano e na formação da raiz (Jin & Martin, 1999). A família MYB-R2R3, a maior dentre as plantas, também apresenta alta diversidade funcional. A única característica em comum aos membros desta família é que todas as proteínas estão envolvidas em processos únicos das plantas (Jin & Martin, 1999).

II.12.2.2.2. Atividade biológica de proteínas MYB-R2R3

Segundo Wilkins *et al.* (2009), muitas proteínas MYB-R2R3 modulam a expressão de genes codificadores de enzimas envolvidas na via biossintética dos fenilpropanóides.

Os fenilpropanóides são produzidos pela via do chiquimato (Dewick, 1997). Sabe-se que a rota do ácido chiquímico, decorrente da conversão de precursores de carboidratos, derivados da glicose e da rota da pentose fosfato, em aminoácidos aromáticos (presente em plantas, fungos e bactérias), não ocorre em animais. Em conseqüência, os mesmos não podem sintetizar três aminoácidos aromáticos – fenilalanina, tirosina e triptofano – que são, portanto, nutrientes essenciais a serem incorporados na dieta. A formação de muitos compostos fenólicos vegetais, incluindo fenilpropanóides simples, cumarinas, derivados do ácido benzóico, lignina, antocianinas, isoflavonas, taninos condensados e outros flavonóides, inicia-se com a fenilalanina (Yamada, 2004).

A via dos fenilpropanóides é iniciada pela PAL (fenilalanina amônio liase), que catalisa a eliminação de um resíduo amônia no aminoácido fenilalanina para formar o ácido *trans*-cinâmico. A partir deste

composto, outros milhares serão formados, muitos sendo específicos de uma determinada espécie (Dixon & Paiva, 1995).

Antocianinas (do grego *anthos*: flor; *kyanos*: azul) são pigmentos naturais que estão presentes nas células epidermais das plantas, dentro de vacúolos, proporcionando diferentes cores aos tecidos vegetais (Brouillard, 1982; Rimari & Strommer, 1998; Konczak *et al.*, 2005). Atualmente, sabe-se que as antocianinas são responsáveis também pelas colorações laranja, rosa, escarlate, vermelha, violeta e púrpura (Wrolstad, 2000; Aaby *et al.*, 2005). As antocianinas pertencem à família dos flavonóides, um importante grupo de compostos fenólicos solúveis em água e de baixo potencial de oxi-redução (Mathew & Parpia, 1971; Van Der Sluis *et al.*, 2000; Winkel-Shirley, 2001). Em órgãos reprodutivos e em frutos, as antocianinas atuam tanto na pigmentação, como também na atração de polinizadores e dispersores de sementes (Brouillard, 1983; Holton & Cornish, 1995; Bohm, 1998; Winkel-Shirley, 2002), na proteção contra danos provocados pela luz ultravioleta (Mazza & Miniati, 1993; Field *et al.*, 2001; Winkel-Shirley, 2002; Merzlyak *et al.*, 2008), como antioxidantes (Fauconneau *et al.*, 1997; Nijveldt *et al.*, 2001; Gould *et al.*, 2002; Ross & Kasum, 2002), sendo também importantes agentes de defesa contra insetos e microrganismos fitopatogênicos como vírus, bactérias e fungos (Hedin *et al.*, 1983; Harborne, 1988; Shirley, 1996; Zuanazzi & Montanha, 2004). As antocianinas são amplamente encontradas nos frutos de várias espécies, sendo a principal responsável pela coloração característica dos frutos e também de flores (Bobbio *et al.*, 2000; Nyman & Kumpulainen, 2001; Lima *et al.*, 2002b; Morais *et al.*, 2002; Manhita *et al.*, 2006; Mattivi *et al.*, 2006; Pawlowska *et al.*, 2006).

A biossíntese de antocianinas, bem como a regulação dos genes envolvidos na sua formação, foi estudada em diferentes espécies vegetais (Dooner *et al.*, 1991; Holton & Cornish, 1995). A presença de antocianinas em flores é a mais estudada. De acordo com Wiering & De Vlaming (1984) e Gerats & Martin (1992), existem pelo menos 35 genes envolvidos na coloração de flores de *Petunia hybrida* Vilm. Genes estruturais

e regulatórios envolvidos na via de biosíntese das antocianinas também foram isolados e caracterizados em milho (*Zea mays* L.) (Paz-Ares *et al.*, 1986; Radicella *et al.*, 1991; Grotewold *et al.*, 1998), *Antirrhinum majus* L. (Martin *et al.*, 1991), *Perilla frutescens* L. (Gong *et al.*, 1997), *Arabidopsis thaliana* (Pelletier *et al.*, 1997), etc. O estudo da biosíntese de antocianinas em frutos é limitado e focalizado em maçã (*Malus sylvestris* L. Mill. var. domestica) (Honda *et al.*, 2002), uva (*Vitis vinifera* L. e *V. labrusca* L.) (Sparvoli *et al.*, 1994; Boss *et al.*, 1996; Gollop *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002), e pêssago (*Prunus persica* L.) (Tsuda *et al.*, 2004). Pouco é sabido sobre antocianinas em café.

Estudos mostraram que antocianinas são sintetizadas quando dois tipos de genes interagem: genes estruturais e genes regulatórios. Os genes estruturais codificam enzimas envolvidas na biosíntese de antocianinas, já os genes regulatórios codificam fatores de transcrição que controlam a expressão dos genes estruturais (Dooner *et al.*, 1991; Goodrich *et al.*, 1992; Quattrocchio *et al.*, 1993; Procissi *et al.*, 1997). Assim, qualquer alteração nos níveis de expressão de genes estruturais e/ou regulatórios pode resultar em perda da coloração.

Atualmente, a via biossintética de antocianinas está bem elucidada e a maioria dos genes estruturais que codificam as enzimas responsáveis por cada parte do processo foram isoladas (Holton & Cornish, 1995). A síntese de antocianinas é derivada da via dos fenilpropanóides e consiste em várias etapas enzimáticas (Figura 2.10).

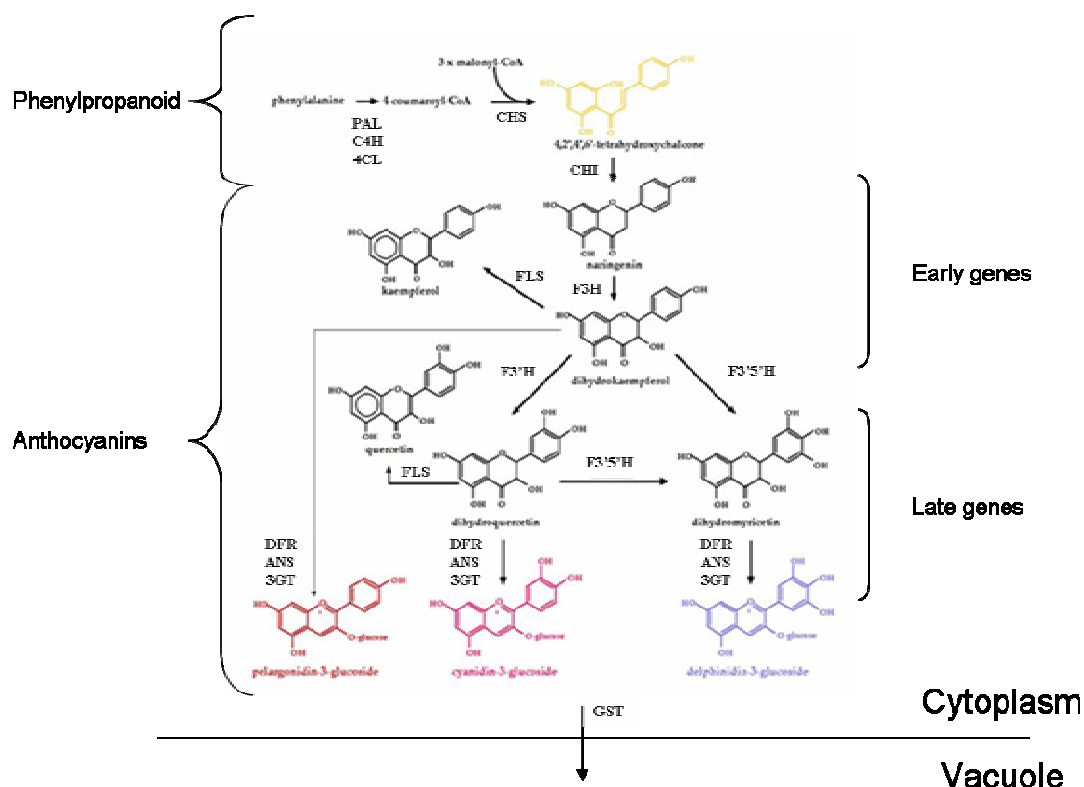


Figura 2.10 - Genes estruturais envolvidos na biossíntese de antocianinas. PAL, *phenylalanine ammonia-lyase*; C4H, *cinnamate 4-hydroxylase*; 4CL, *4-coumarate:CoA ligase*; CHS, *chalcona sintetase*; CHI, *chalcona isomerase*; F3H, *flavanone 3-hydroxylase*; FLS, *flavonol sintetase*; F3'H, *flavonoide 3'-hidroxilase*; F3'5'H, *flavonoide 3',5'-hidroxilase*; DFR, *diidroflavonol redutase*; ANS, *antocianidina sintetase*; 3GT, *antocianidina 3-glicosiltransferase*; GST, *glutathione S-transferase*. Fonte: adaptado de Holton & Cornish (1995) e Florigene (2009).

O controle da biossíntese de antocianinas por genes regulatórios é ponto chave para a regulação dos genes estruturais, que conduzem à produção das proteínas envolvidas no processo biossintético. Sobre os mecanismos regulatórios, a tecido-especificidade de genes estruturais é estritamente correlacionada com a combinação de dois tipos diferentes de fatores de transcrição: um homólogo a proteínas proto-oncogênicas de vertebrados c-MYB (*myeloblastosis*; Mol *et al.*, 1998) e o

outro, proteínas MYC que apresentam o domínio bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*) (Paz-Ares *et al.*, 1987). De acordo com Koes *et al.* (2005), estes fatores de transcrição são conservados e regulam a via biossintética de antocianinas em um grande número de plantas. O domínio bHLH de fatores de transcrição do tipo MYC podem interagir com diferentes *cis*-elementos presentes na região promotora dos genes envolvidos na biossintese de antocianinas (Zhang *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004). Entretanto, proteínas MYB são os componentes chave da via biossintética, pois promovem a tecido-especificidade para um grupo de genes ativados. Também é necessário o envolvimento de proteínas do tipo WD40 no processo (De Vetten *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1999; Sompornpailin *et al.*, 2002).

O primeiro sistema vegetal onde se demonstrou o envolvimento de proteínas MYB e bHLH foi o milho (*Zea mays*). A expressão de um membro da família *myb* (gene *C1/P1*) (Cone *et al.*, 1986; Paz-Ares *et al.*, 1986; Paz-Ares *et al.*, 1987; Cone *et al.*, 1993) e um da família bHLH (gene *R/B*) (Chandler *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1989; Perrot & Cone, 1989; Tonelli *et al.*, 1991), por exemplo, são necessários e suficientes para induzir a expressão da maioria dos genes estruturais envolvidos na biossintese de antocianinas em milho, de *CHS* até *GST* (Jin *et al.*, 1999; Quattrocchio *et al.*, 1999; Borevitz *et al.*, 2000; Aharoni *et al.*, 2001; Boddu *et al.*, 2006).

O gene *AN2* de *Petunia* é um dos reguladores da conversão de dihidroflavonois em antocianinas (Wiering, 1974; Gerats *et al.*, 1982), atuando sobre os genes estruturais: diidroflavonol redutase (DFR), antocianidina sintetase (ANS) e antocianidina 3-glicosiltransferase (3GT), entre outros (Farcy & Cornu, 1979; Gerats *et al.*, 1984).

II.12.2.2.3. Caracterização do promotor do gene *CaAN2*

Análises *in silico* utilizando bancos de dados específicos evidenciaram a presença de 275 elementos *cis*-regulatórios putativos em 1186 pb da região promotora do gene fruto-específico (*pCaAN2*) de café.

Dos 275 putativos elementos *cis*-regulatórios encontrados no *pCaAN2*, 88 tipos diferentes foram identificados. Dentre estes, a classe mais representada foi a DOFCOREZM (AAAG), com 20 motivos encontrados. De acordo com a literatura, este motivo é sitio de ligação para proteínas do tipo Dof (*DNA binding with one finger domain*). Estas proteínas são fatores de transcrição exclusivos de plantas (Yanagisawa & Schmidt, 1999; Yanagisawa, 2000).

Em relação aos outros promotores descritos no presente estudo, sete *cis*-elementos foram exclusivos do *pCaAN2* (GAREAT, MYB2AT, AACACOREOSGLUB1, ACGTOSGLUB1, UPRMOTIFIAT, ABREOSRAB21 e AMMORESIIUDCRNIA1). Cada um destes foi encontrado somente uma vez. O primeiro a ser descrito é o AMMORESIIUDCRNIA1, elemento responsivo à amônia e nitrato redutase (Loppes & Radoux, 2001). O motivo UPRMOTIFIAT está relatado com a regulação dos genes *SAR1B*, *HSP-90*, *SBR-like*, *Ca-ATPase 4*, *CNX1*, *PDI*, etc., envolvidos no processo de morte celular em *Arabidopsis* (Martinez & Chrispeels, *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003). Os elementos ACGTOSGLUB1 e AACACOREOSGLUB1 estão relacionados com o controle da expressão específica do gene *glutelin* em endosperma de arroz (Washida *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). O *cis*-elemento GAREAT está relacionado com resposta ao ácido giberélico (GA) (Ogawa *et al.*, 2003), e ABREOSRAB21 ao ABA (ABRE) (Marcotte *et al.*, 1989; Skriver & Mundy, 1990; Busk & Pages, 1998). MYB2AT é o motivo de ligação para fatores de transcrição do tipo MYB (Martin & Paz-Ares, 1997; Yanhui *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis* estes fatores de transcrição estão envolvidos na regulação de genes responsivos ao estresse hídrico (Urao *et al.*, 1993).

Os ácidos giberélico (GA) e abscísico (ABA) são fitohormônios que atuam como mensageiros químicos dos sinais ambientais. Podem, por exemplo, reprimir ou induzir a dormência de sementes pela percepção, respectivamente, de baixas temperaturas por um tempo prolongado durante o inverno, ou do aumento progressivo do comprimento dos dias no final do inverno (Botelho & Perez, 2001; Yamaguchi & Kamiya, 2002).

No promotor do gene *CaAN2* foram encontrados cinco *cis*-elementos putativos relacionados ao GA sendo eles: ABREOSRAB21, POLASIG3, PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A, T/GBOXATPIN2 e TAAAGSTKST1, os quais aparecem, respectivamente, 1 vez, 2 vezes, 2 vezes, 2 vezes e 4 vezes. De acordo com a literatura, as GAs aumentam o acúmulo de antocianina em flores de *Petunia* através do aumento da transcrição de genes estruturais envolvidos na via biossintética dos flavonóides (Weiss *et al.*, 1992).

GAMYB foi a primeira proteína MYB identificada em células de aleurona de cevada como responsivas ao GA (Gubler *et al.*, 1995). Proteínas ortólogas têm sido identificadas em outras monocotiledôneas, como por exemplo, arroz, trigo e *Lolium temulentum* (Hattori *et al.*, 1992; Gubler *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 1996). A proteína GAMYB se liga à *cis*-elementos GA-responsivos, induzindo a expressão específica de genes em células do aleurona (Gocal *et al.*, 1999; Gubler *et al.*, 1999; Piazza *et al.*, 2002). Foi demonstrado que *HvGAMYb* de cevada e *OsGAMYb* de arroz, os quais são requeridos para a expressão do gene codificador da α -amilase no aleurona, são regulados por GA (Gubler *et al.*, 1997; Diaz *et al.*, 2002).

No promotor do gene *CaAN2* foram encontrados 22 *cis*-elementos putativos relacionados ao ABA: ABRELATERD1 (5 vezes), ABREOSRAB21 (1 vez), ABRERATCAL (1 vez), ACGTATERD1 (12 vezes), ARR1AT (8 vezes), ACGTOSGLUB1 (1 vez), AMMORESIIUDCRNIA1 (1 vez), ANAERO1CONSENSUS (2 vezes), ASF1MOTIFCAMV (3 vezes), BIHD1OS (1 vez), BOXIINTPATPB (3 vezes), MYB2AT (1 vez), CAATBOX1 (16 vezes), IBOXCORENT (1 vez), MYB1AT (1 vez), MYBCORE (3 vezes), MYB2CONSENSUSAT (2 vezes), MYCATRD22 (1 vez), MYCATERD1 (1

vez), MYCCONSENSUSAT (10 vezes), NODCON1GM (1 vez), POLLEN1LELAT52 (9 vezes), PRECONSCRHSP70A (2 vezes) e T/GBOXATPIN2 (2 vezes).

Em uva, o acúmulo de antocianinas é aumentado pela presença de ABA (Kataoka *et al.*, 1982). Ban e colaboradores (2003) reportaram que aplicações exógenas de ABA aumentam o acúmulo de sete transcritos envolvidos na via biossintética das antocianinas. Jeong *et al.* (2004) também examinaram os efeitos do ABA na regulação de genes envolvidos na biossíntese de antocianinas em uva.

Butelli *et al.* (2008) desenvolveram frutos de tomate com altos níveis de antocianina através de expressão seletiva de fatores de transcrição. Para tal, os autores expressaram os genes *Delila* (*Del*) e *Rosea1* (*Ros1*) de *Antirrhinum majus* em tomates (*Solanum lycopersicum* cv. MicroTom) transgênicos. *Del* codifica fatores de transcrição do tipo MYC, que apresentam o domínio bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*) e *Ros1* codifica fatores de transcrição do tipo MYB (Goodrich *et al.*, 1992; Schwinn *et al.*, 2006).

Os demais *cis*-elementos regulatórios putativos presentes no *pCaAN2* foram agrupados de acordo com a definição apresentada no banco de dados PLACE (Figura 2.11), a saber: defesa, luz, fatores de transcrição, outros (açúcar, aminoácidos, fitohormônios, íons, fermentação, desidratação), e tecido-especificidade (fruto, meristema, floema, pólen, raiz, semente, xilema). Através da Figura 2.11 é possível verificar que a maioria dos *cis*-elementos identificados está relacionada a fatores de transcrição (27%), seguidos de elementos responsivos à luz (23%). A classe menos representada é a que apresenta os *cis*-elementos relacionados à defesa (7%). Na Figura 2.12 encontra-se um esquema da estrutura deste promotor.

pCaAN2

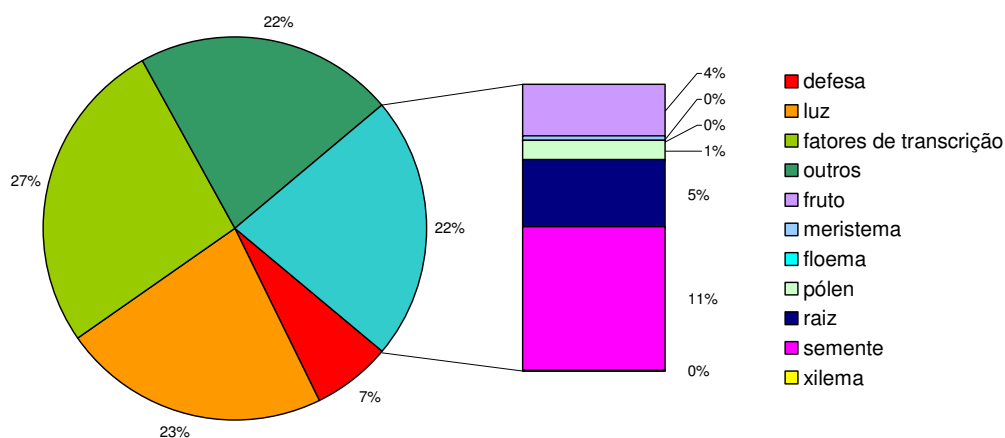
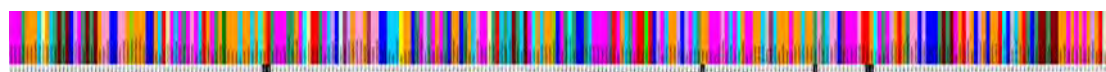


Figura 2.11 - Diferentes classes de elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor putativo do gene AN2 (*pCaAN2*).

A)



B)

aba	auxina	calcio	citocinim	giberilina
fruto	meristema	floema	pólen	raiz
semente	xilema	BELL	bZIP	DOF
E2Z	G-Box	MADS	myb	myc
RAV1	RAV2	SIF		

Figura 2.12 - Esquema da estrutura de elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor putativo do gene *CaAN2* (*pCaAN2*). As cores em (A) representam as diferentes classes de elementos regulatórios e identificados de acordo com escala de cores disponibilizada no quadro em (B). As marcas em preto abaixo das caixas coloridas em (A) indicam os putativos TATA-Box encontrados no promotor do gene AN2 de café.

II.12.2.3. Promotores de genes de defesa do café

A seguir serão apresentados com maior detalhamento, e no formato de artigo, os resultados referentes ao isolamento e caracterização dos promotores dos genes de defesa *CaPR1b.1*, *CaPR1b.2* e *CaNPR1*. Como já relatado anteriormente, esta parte do trabalho foi realizada no *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD, Montpellier, França), conduzidos sob orientação da Dra. Diana Fernandez (Equipe *Résistance des Plantes aux Bioagresseurs* - RPB).

Expression profiling of the host response to fungal infection: molecular characterization of pathogen defense-related genes in coffee (*Coffea arabica*)

Carla F. Barsalobres-Cavallari^{1,2§}, Anne-Sophie Petitot¹, Fábio E. Severino², Ivan G. Maia², Diana Fernandez¹

¹Résistance des Plantes aux Bioagresseurs, IRD, 911 Avenue d'Agropolis, BP64501, 34394, Montpellier, France

²Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular, IB, UNESP, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil

§Corresponding author

Fax: +55-14-3815-3744

Phone: +55-14-3811-6229

Email addresses:

CFB-C: cfbarsal@ibb.unesp.br

A-SP: anne-sophie.petitot@ird.fr

FES: fabio.bjj@gmail.com

IGM: igmaia@ibb.unesp.br

DF: diana.fernandez@ird.fr

Abstract

Background

Salicylic acid (SA) plays an important role in the onset of defense reactions against environmental stressors in plants. The rise in SA levels triggers the activation of a number of defense genes. Among these genes, the best characterized code either for proteins with antimicrobial activity, such as pathogenesis-related proteins 1 (PR1), or for an essential regulator of plant systemic acquired resistance (SAR), namely the NPR1 proteins (for Nonexpressor of PR genes). Here we used a combination of gene expression analysis in response to fungal infection and a comparative promoter analysis to infer the biological role of the *Coffea arabica* PR1 and NPR1 genes.

Results

Coffee expressed sequence tags (ESTs) matching the putative basic form of PR1 and the NPR1 coding genes (termed *CaPR1b* and *CaNPR1*, respectively) were retrieved from suppression subtractive libraries, associated with expression of early resistance mechanisms of coffee plants to the leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*. A genome walking strategy was used to isolate *CaPR1b* and *CaNPR1* genes, including promoter regions, from the genomic DNA of *C. arabica*. Transcription of the *CaPR1b* gene was strongly induced following infection of coffee plants with *H. vastatrix*. In contrast, *CaNPR1* transcript levels were not affected in response to this pathogen. The promoters of the *CaPR1b* and *CaNPR1* genes were characterized and transiently expressed by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana* leaves for functional analyses. Activity of the *CaNPR1* promoter was found to be SA-dependent while the activity of the *CaPR1b* promoter was not. Our results also show that the core WRKY-binding consensus sequence (W-box) is enriched in both promoters, as well as the binding sites for Myb, RAV1 and bZIP proteins.

Conclusions

The gene expression and promoter functional analysis described here provided compelling evidence that suggests *CaPR1b* and *CaNPR1* may function as components of coffee plant defense responses to the rust pathogen. Data obtained in this work also suggest that SA may be an important signaling element in the coffee resistance responses to *H. vastatrix*.

Background

Plants, like animals, are continually exposed to pathogen attack and have developed an innate surveillance mechanism that enables them to rapidly ward off attempted invaders [1]. Inducible defense against a number of pathogens remains localized in the primary infection sites that are often visible as necrotic local lesions on the leaves. This local reaction is referred to as the hypersensitive response (HR). Subsequently, the HR triggers a general resistance mechanism that renders uninfected parts of the plant tolerant to further pathogen attack, a phenomenon called systemic acquired resistance (SAR) [2]. The elicitation of the HR and SAR reactions is accompanied by the coordinated induction of a heterogeneous group of proteins in the infected and uninfected leaves, commonly referred to as pathogenesis-related (PR) proteins [3]. Plant PR proteins are defined as proteins encoded by host plants that are induced in pathological or related situations, and represent major quantitative changes in soluble protein during the defense response. PR proteins work as key features underlying the deployment of both pre-formed and inducible defense responses [4]. These proteins are found in many plant species, and are strongly induced by pathogen attack, by exposure to salicylic acid (SA), and by developmental cues [5, 6].

Basic and acidic PR proteins are found, each of these counterparts having both apoplastic and vacuolar localization [7]. The expression of a number of genes encoding PR proteins is characteristically induced to high levels in both local and systemic tissues

after the accumulation of SA [8]. Accumulation of PR proteins can also be triggered by the plant hormone ethylene (ET) [9, 10]. Moreover, methyl jasmonate (MeJA), a lipid-based signal, which accumulates during some defense responses [11], has been shown to enhance the expression of some basic PR proteins [12]. In some cases, these proteins also differ from their acidic counterparts in their subcellular distribution, being largely located at relatively low levels in the plant vacuole [13]. Moreover, the accumulation of basic PR proteins shows organ-specific regulation [14], suggesting they may play key roles in plant development in addition to their proposed function in the defense response [15].

Originally described in tobacco leaves upon virus infection, PR proteins were first classified into PR1 to PR5 families, based on serological properties and later on sequence data. Now plant PR proteins comprise a large group of 17 protein families, even though PR15 to PR17 families have been recognized only recently [3]. In tobacco, for example, at least nine distinct families of PR proteins have been identified [5].

Among them, the members of the *PR1* gene family have been frequently used as marker genes for plant defense-related responses.

In *Arabidopsis thaliana*, 22 genes are listed as predicted *PR1* genes that encode proteins homologous to the tobacco PR1a protein, which was first reported as an acidic protein that accumulates in tobacco leaves infected with *Tobacco mosaic virus* (TMV) [3].

Among these genes, only one *PR1* gene (At2g14610), which encodes a basic protein, was reported to be pathogen-responsive [3].

Expression of SAR is strictly correlated with the accumulation of PR1 proteins.

Conversely, SAR and *PR* gene expression are impaired in the absence of SA [5, 16-18].

It has been demonstrated that SA acts upstream of *NPR1* (for *Nonexpressor of PR genes*; also known as *NIM1 - non-immunity*, or *SAI1 - salicylic acid insensitivity*) [19],

which was identified as a key positive regulator of the SA-dependent signaling pathway. NPR1 is required for the transduction of the SA signal to activate PR gene expression and SAR in *Arabidopsis* mutant plants [16, 20, 21].

The *NPR1* gene was cloned in 1997 [22]. According to Cao et al. [23], *NPR1* is constitutively expressed and its transcript levels increased only two-fold following SA treatment, suggesting a regulation at the protein level. It is known that upon pathogen attack, accumulation of SA causes a change in the cytosolic cellular redox [24], leading to the conversion of the inactive NPR1, present as cytosolic disulfide-bound oligomers in the absence of pathogen attack, into active monomers [25]. NPR1 monomers are transported into the nucleus where they interact with the TGA class of basic leucine zipper transcription factors [25-27]. This interaction, in turn, stimulates the binding of TGA factors to SA responsive elements in the promoters of *PR* genes, launching the onset of SAR [28, 29]. Accordingly, by using an inducible *NPR1* transgene and profiling gene expression shortly after induction of NPR1 nuclear entry, it was demonstrated that *PR1* expression in *Arabidopsis* is directly controlled by NPR1 [20, 30].

Current studies have also pointed to the involvement of WRKY transcription factors in SA defense responses downstream or in parallel with NPR1 [31, 32].

npr1 mutant was isolated in a genetic screen for plants that failed to express *PR2* gene after SAR induction [20]. Originally, the *npr1* mutant was thought to be only deficient in SA-mediated defense. However, it was also shown that NPR1 plays a role in other defense signaling pathways. In this mutant, the establishment of induced systemic resistance (a biologically elicited, systemic defense response activated by specific strains of non-pathogenic rhizobacteria), as well as the jasmonic acid- (JA) and ET- signaling responses are mediated by NPR1, independently of SA [33, 34]. Among other

functions, NPR1 can negatively regulate SA biosynthesis during pathogen attack [35]. Indeed, NPR1 has been shown to mediate the SA-induced suppression of JA-dependent responses [36]. These studies have highlighted the diverse roles that NPR1 plays in plants.

In *Arabidopsis*, the NPR1-dependent SA pathway controls the expression of *PR1*, *PR2* (β -1,3-glucanase) and *PR5* (*thaumatin-like*) genes. *AtNPR1* has been over-expressed in *Arabidopsis*, rice, tomato and wheat, resulting in enhanced bacterial and fungal resistance [23, 37, 38].

Given the pivotal role of *PR1* and *NPR1* genes in plant defense, we are especially interested in determining the contribution and regulation of these genes during biotic stress responses in coffee (*Coffea arabica*). One of the major limiting factors for coffee production are fungal diseases, such as the coffee leaf rust (or orange rust) caused by *Hemileia vastatrix* Berkeley and Broome, and the coffee berry disease caused by *Colletotrichum kahawae* Bridge and Waller [39].

Taking advantage of the sequence data available in the coffee EST databases [40-42], the first step of the current study was to identify cDNAs encoding proteins with similarity to AtPR1 and AtNPR1. The expression pattern of the corresponding genes, *CaPR1b* and *CaNPR1*, was then investigated after coffee inoculation with *H. vastatrix*. To gain further insight into promoter functionality, expression cassettes bearing these promoters were transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves, and the consequences on promoter activity were verified after treatment with SA.

Results and Discussion

Identification and characterization of the *CaPR1b* cDNA

Coffee ESTs matching putative *PR1* genes were first searched in suppression subtractive libraries associated with expression of genes involved in the early resistance

responses of coffee plants to *Hemileia vastatrix* [40]. One coffee EST sharing significant similarity to AtPR1 protein from *Arabidopsis thaliana* (NP_179068) was identified. Sequence comparison of the retrieved EST with data from the Brazilian coffee EST database [42] enabled us to obtain a full-length cDNA clone, named *CaPR1b* (DQ335594). It contains an open reading frame of 672 nucleotides encoding a polypeptide of 161 amino acids with a predicted molecular mass of 17.642 kDa. The protein encoded by *CaPR1b* shared 65% similarity to a putative PR1 protein from a *Vitis* hybrid cultivar (BAF95881; Choi *et al.*, unpublished). It also shared 65% identity/58% similarity, and 64% identity/56% similarity, to the acidic- (CAA29660) [43] and basic-type PR1 (CAA35665) [44] proteins from *Nicotiana tabacum*, respectively. An alignment of the deduced amino acid sequence of *CaPR1b* with known PR1 proteins is presented in Figure 1.

The cloned PR1-like protein from coffee is basic in nature since its predicted isoelectric point was found to be 9.28. Analysis for key amino acid signatures revealed a hydrophobic signal sequence and the presence of six conserved cysteine residues, which are characteristic features of the PR1 family members [45]. Moreover, three putative myristoylation sites [46] and a putative phosphorylation site [47] were also identified (Figure 1). Hereafter we will refer to the *CaPR1b* gene as *CaPR1b*.

***CaPR1b* gene expression in coffee leaves following *Hemileia vastatrix* infection**

To test whether the expression of *CaPR1b* resembles the expression patterns of *PR1* genes from different plant species, a quantitative PCR (qPCR) assay was conducted.

The expression levels of *CaPR1b* were determined in leaves of *C. arabica* inoculated or not (control plants) with *H. vastatrix* race II, that elicits a compatible reaction in coffee. Using triplicate cDNA samples originating from three independent biotic stress assays, the expression levels of *CaPR1b* gene were normalized with that of a gene encoding

GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), which was selected as an internal control gene [48]. As observed for other *PR1* genes, *CaPR1b* gene expression is also responsive to biotic stress. *CaPR1b* expression was up-regulated by coffee leaf rust inoculation at 8 (7.6-fold) and 12 (12.2-fold) hours post inoculation (hpi). This can be seen in Figure 2A, where the gene expression levels were transformed into logarithm to obtain normal distribution of the data. The inducible expression pattern in response to fungal infection is consistent with the described antifungal and antimicrobial activities associated with PR1 proteins from some plant species [49-51].

Based on the above results we suggest that *CaPR1b* could be classified as a basic PR1 protein since it possesses many of the criteria that define this class of proteins. The name "pathogenesis related protein" is a collective term that encompasses all proteins that are present at almost undetectable levels in healthy tissue but are induced at the protein level following pathogen infection. The classification of these proteins is based on their pathogen inducible expression rather than defined functional roles in defence [3]. Moreover, *CaPR1b* has other features characteristic of PR proteins including an N-terminal signal peptide [3] that directs the molecule into the extracellular space.

***CaPR1b* promoter cloning and functional analysis**

A PCR-based genome walking strategy was used to isolate the *CaPR1b* 5'-flanking region. For this, gene-specific primers were designed based on the isolated *CaPR1b* cDNA. As a result, two genomic clones representing different versions of the *CaPR1b* 5'-flanking region were amplified from coffee genomic DNA. These clones, termed *pCaPR1b.1* (820 bp) and *pCaPR1b.2* (822 bp), respectively, shared 95% nucleotide identity.

A transcription start site motif (CAC), which matches the consensus for plant transcription start sites, was identified within the promoter sequences of *CaPR1b.1* and

CaPR1b.2. The adenine within this motif is the preferred site of initiation [52].

Predicted TATA-boxes were detected at positions -63 and -65 upstream of this putative start site in the *CaPR1b.1* and *CaPR1b.2* promoters, respectively (Figure 3), which is consistent with the distance of the TATA-box from the transcription start site in most plant genes [52].

A comparative analysis revealed that in addition to several nucleotide insertions and substitutions, differences were also perceived concerning the presence of putative defense-related *cis*-acting elements within the amplified regions (Figure 3). An unlike number of hormone- and stress-related elements varied between *pCaPR1b.1* and *pCaPR1b.2*, *i.e.*, GCC-boxes [14], W-boxes [53], ERE, ethylene-responsive element [54], etc.

The basic explanation that could account for the recovery of two slightly different *CaPR1b* promoters is that *C. arabica* is an allotetraploid ($2n = 4x = 44$ chromosomes) displaying two constitutive genomes [55]. Thus, similar genes could reside in each of the sub-genomes that comprise the tetraploid, and thereby account for their low similarity, in accordance with other results on other *C. arabica* cloned genes [56].

However, we can not exclude the possibility that the amplified sequences belong to paralog genes that may have originated from gene duplication events.

To determine whether the isolated 5'-flanking regions contained promoter activity, chimeric *pCaPR1b.1::GUS* and *pCaPR1b.2::GUS* reporter constructs were introduced into tobacco (*N. benthamiana*) leaf tissues by *Agrobacterium tumefaciens* infiltration.

The functionality of the cloned promoters was revealed by histochemical and fluorometric GUS assays (Figure 4). As it can be observed in Figure 4A, both promoters are functional; GUS activity was three times more pronounced in leaves infiltrated with *pCaPR1b.1::GUS* than in leaves infiltrated with *pCaPR1b.2::GUS*. The expression of

CaPR1b promoters was not induced by SA treatments (Figure 4B). The level of GUS activity detected in *pCaPR1b.1::GUS* infiltrated tissues was comparable to the one observed in tissues infiltrated with a cassette containing the 35S promoter (Figure 4B). This could be a result of the activation of a cellular defense response triggered by recognition of *A. tumefaciens* as a disease agent as pointed by Escobar and Dandekar [57]. The induction observed could also be an effect of wounding, since the *CaPR1b.1* promoter presents a wound-inducible JERE motif (JA responsive element) that is absent in *pCaPR1b.2* (Figure 3).

Characterization of the *CaPR1b* promoters

Considering the defense-responsive *cis*-elements, seven elements were present in both promoters and three were exclusively present in *pCaPR1b.2*. The former could account to the observed differences in promoter functionality (Figure 4B). The first one is the core of GCC-box found in many pathogen-responsive genes such as *PDF1.2*, *Thi2.1*, and *PR4* [58, 59]. The GCC-box has also been shown to function as an ERE that is necessary, and in some cases sufficient, for the regulation of transcription by ET [54, 60]. This element is involved in an ET-mediated response to pathogens [61] and abiotic stress [62]. In addition, the GCC-box is implicated in ozone-responsive expression of tobacco basic-type pathogenesis-related PR1 protein gene via ET-dependent signaling [63]. According to Brown *et al.* [64], the GCC-box appears to play important roles in regulating jasmonate-responsive gene expression. Chakravarthy *et al.* [65] reported that the tomato transcription factor Pti4 regulates defence-related gene expression via GCC-box and non-GCC-box *cis*-elements (Myb1 and G-box, respectively).

The second defense-related motif present merely in *pCaPR1b.2* is the HSRE (HSR203 responsive element), initially found in tobacco (*N. tabacum*). This *cis*-element is responsible for the marked induction of the *HSR203J* gene during the hypersensitive

response. According to Pontier *et al.* [66], *HSR203J* is specifically activated during the early steps of incompatible plant-pathogen interactions.

The last defense-related motif found exclusively in *pCaPR1b.2* is the plant Myb binding site. This binding site (also called box P) is similar to H-box-like elements described in the promoters of several other plant genes involved in phenylpropanoid biosynthesis [67, 68]. According to Logemann *et al.* [69], a box P failed to confer elicitor or light responsiveness of a reporter gene in transient expression assays. Consequently this element appears to be necessary but not sufficient for elicitor or light-mediated gene activation.

Isolation and characterization of the complete coffee *NPR1* gene sequence

To isolate the *NPR1* cDNA from coffee (*CaNPR1*), an EST encoding a NPR1 protein was retrieved in the cDNA library constructed by Fernandez *et al.* [40]. This EST was used to design a pair of *nested* gene-specific primers to conduct the genome walking procedure for amplification of the 5' flanking region of *CaNPR1*. However, this EST contained a 687 bp that covered the C-terminal part of the encoded protein as determined by a BLASTX search. An additional search for ESTs coding for *NPR1* was also conducted in the Brazilian Coffee EST database, and a similar result was obtained. Hence, the 5'-flanking region of the *CaNPR1* gene was amplified using a set of nine gene-specific primers (CaNPR1-1 to CaNPR1-9). The first two (CaNPR1-1 and CaNPR1-2) were designed based on the starting EST sequence selected in the database, while the others were designed based on the nucleotide sequences of the fragments amplified by genome walking.

By applying genome walking techniques, a 4375 bp-long genomic fragment encompassing the entire *CaNPR1* coding region, including two exons and one intron, as well as its 5' upstream region (1444 bp; Figure 5A) was obtained. The *CaNPR1* open

reading frame encoded a protein of 609 amino acids (Figure 5B). The deduced amino acid sequence of CaNPR1 displayed highest identity with the NPR1 proteins from different Solanaceae including *Capsicum annuum* (ABG38308, 71%), *Nicotiana tabacum* (ABH04326, 71%) and *Lycopersicon esculentum* (AAT57637, 71%).

Detailed analysis of the *CaNPR1* sequence revealed that it harbors the three main domains of NPR1 proteins: the BTB/POZ domain, an ankyrin (ANK) repeat domain, and the nuclear localization signal (NLS) (Figures 5B and 6). These are typical features of NPR1 genes, which are highly conserved across many species.

In healthy tissues, NPR1 is an oligomeric, cytosolic protein. Following SA treatment, *Arabidopsis* NPR1 dimers become monomers and move into nuclei to interact with TGA transcription factors for transcriptional activation of *PR1* [70]. Previous studies have demonstrated that residues Cys⁸², Cys¹⁵⁰, Cys¹⁵⁵, Cys¹⁶⁰ and Cys²¹⁶ present in the BTB/POZ domain are involved in oligomer-monomer transition [25, 71]. All these 5 cysteine residues are conserved in *CaNPR1* (Figure 6).

Curiously, an unexpected leucine zipper pattern was found in the CaNPR1 protein (Figures 5B and 6). This domain has never been reported in NPR1 proteins. Leucine zippers function as protein dimerization motifs and have been proposed to explain how some eukaryotic gene regulatory proteins work. The leucine zipper pattern is present in many gene regulatory proteins such as octamer-binding transcription factor 2 (Oct-2/OTF-2) [72], CCATT-box and enhancer binding protein (C/EBP) [73], nuclear oncogene *fos* and *jun* [74], cAMP response element (CRE) binding proteins (CREB, CRE-BP1, and ATFs) [75], and C-myc, L-myc and N-myc oncogenes [76].

Phylogenetic analysis of NPR1 homologs

Phylogenetic analysis was based on the entire amino acid sequences of NPR1 proteins.

Analysis using bootstrap consensus for neighbor joining showed that CaNPR1 was

grouped with members of the Solanaceae family like tobacco (*N. tabacum*), tomato (*L. esculentum*) and peppers (*C. annuum*) (Figure 7). This suggests a conserved pattern in the NPR1 sequences among plant families that belong to the Asterid I clade of dicots [77]. The closer taxonomic affinities of coffee and Solanaceae are also paralleled by a number of striking botanic and genetic similarities, including the production of fleshy berries, a similar genome content ($C = 950$ and 640 Mb for tomato and coffee, respectively) [78], similar basic chromosome number ($x = 12$ for tomato and most other Solanaceae; $x = 11$ for coffee) and similar chromosome architecture with highly condensed pericentric heterochromatin and decondensed euchromatin at the pachytene stage of meiosis [79, 80]. In addition, a computational comparison of the coffee EST-derived unigene set with the sequence databases for *Arabidopsis* and Solanaceous species, indicate that the latter are much better genomic models for coffee than is *Arabidopsis* [41]. The ability to identify orthologous genes between coffee and tomato opens the door to eventually developing detailed comparative maps for these two species and to the sharing of genomic and biological tools/discoveries an outcome that should expedite research in both taxa.

Within the monocots and dicots, a relative close grouping among NPR1 proteins from the Asterid I clade of dicots and from monocots belonging to different families is observed (Figure 7). Nevertheless, plants belonging to the Brassicaceae family (*A. thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*) formed a separate sub-clade. Corroborating data from Hepworth *et al.* [81], there was a relatively close grouping among *AtNPR1* to *AtNPR4* genes, which have been implicated in signaling of defense responses, while *AtNPR5* and *AtNPR6* (called *AtBOP1* and *AtBOP2*), which are involved in the regulation of developmental patterning of leaves and flowers, form a distinct group.

Expression pattern of *CaNPR1* during compatible interaction with *Hemileia vastatrix*

To test whether the expression of *CaNPR1* is affected by biotic stress, transcript accumulation in coffee plants exposed to *H. vastatrix* infection was monitored by quantitative real-time PCR. As a result, no significant changes in *CaNPR1* transcript levels were observed (Figure 2B), thus suggesting that *CaNPR1* expression is not regulated at transcriptional level upon *H. vastatrix* infection. This is in line with previous studies showing that constitutive expression of NPR1 genes is not affected by pathogen infection [29, 82, 83].

Sequence analysis of *CaNPR1* promoter

Only one sequence corresponding to the 5' upstream region of *CaNPR1* gene was identified for 11 clones analyzed, suggesting either that the upstream sequences of the two *CaNPR1* copies of the tetraploid *C. arabica* genome are identical or that our gene walking strategy impaired cloning of only one of the duplicated sequence.

To assess the set of putative *cis*-acting elements present in the *CaNPR1* promoter, an *in silico* search in PLACE using the 1444-bp sequence as query was performed. In this analysis we looked for: (a) TATA-box consensus sequences and (b) consensus sequences described for binding of defense-related transcription factors.

The first TATA-box present in the *CaNPR1* promoter was placed 496 nucleotides upstream of the start codon (Figure 8). The presence of CAAT motifs that are generally associated with gene regulation was also observed. The CAAT-boxes are core promoter sequences important in binding RNA Polymerase II [84].

Many potential binding sites for Myb and Myc transcription factors were also identified within the *CaNPR1* promoter sequence. Members of the Myb family are involved in diverse physiological and biochemical processes including the regulation of secondary metabolism, cell morphogenesis, meristem formation, floral and seed development, and

the control of the cell cycle. Some Myb transcription factors also play important roles in various defense and stress responses and the light and hormone signaling pathways [85]. In addition to the mentioned Myb binding sites, several *cis*-elements previously reported to be directly or indirectly regulated by plant hormones, such as auxin, abscisic acid, cytokinin, gibberellin, ethylene, jasmonic acid, and salicylic acid, were observed. The presence of such a large number of hormone responsive *cis*-elements suggests that *CaNPR1* expression might be regulated by hormone action. Other important elements detected in the *CaNPR1* promoter were those related to defense (ELRECOREPCR1, MYBPLANT, T/GBOXATPIN2, GT1GMSCAM4, PALBOXAPC and W-box), thus suggesting a regulation during biotic stress conditions [69, 86-90].

Transient expression of the *CaNPR1* promoter in *N. benthamiana* leaves

GUS expression driven by the *CaNPR1* promoter was evaluated using a transient expression assay in leaves of *N. benthamiana* and compared to that obtained using the CaMV 35S promoter. Transient GUS activity was assayed fluorometrically and histochemically at 3 day post-infiltration (Figures 4B and 9A). Surprisingly, the level of GUS activity driven by the *CaNPR1* promoter was very weak compared to that driven by the 35S promoter.

***CaNPR1* promoter is SA-dependent**

As previously mentioned, the *NPR1* gene is identified as a key regulator of the SA-mediated SAR pathway in *Arabidopsis* [16, 20, 21, 91], and its expression levels become elevated upon induction by SA and the synthetic chemicals 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) [22, 92]. Given that the upstream promoter region of *CaNPR1* harbor *cis*-acting elements implicated in plant hormone inducibility, we examined whether this promoter shows a SA-inducible expression pattern. As a result, a significant alteration in the level of GUS activity was

detected in SA-treated leaves as compared to control leaves treated with water (Figures 4B and 9B). GUS activity, as assayed by fluorimetric tests, was higher in SA-treated leaves than in leaves infiltrated with the CaMV 35S::*GUS* construct.

These data demonstrate that SA strongly stimulates the transcriptional activity of the *CaNPR1* promoter, and suggest that different *cis*-acting elements located in this region, such as the plant hormone- and/or infection-related motifs, might contribute to SA responsiveness.

Common regulatory motifs in *CaPR1b* and *CaNPR1* promoters

To reveal aspects of common transcriptional activation, a comparative analysis of the *CaPR1b* and *CaNPR1* promoter regions was performed. In this analysis, the binding sites for transcription factors that play important roles in defense signaling such as WRKY, ERF, bZIP, MYB and RAV1 [93-95] were searched.

A search in PLACE revealed the presence of 32 W-boxes, 16 of them being canonical W-box [(T)TGACY, where Y is C or T] and 16 being W-box like elements (WLE) containing a TGAC core. These W-box elements are present within the three promoters analyzed (*CaPR1b.1*, *CaPR1b.2* and *CaNPR1*) at an average of 10.7 copies/promoter compared to the average of 2.24 across all *A. thaliana* promoters [96, 97]. It has been proposed that the W-box could act as a SA-responsive element in the activation of PR genes indicating that WRKY transcription factors may be important in regulating the expression of the *CaPR1b* and *CaNPR1* genes.

Moreover, we also found 13 RAV1AAT elements, and 7 ASF1 motif elements (Figures 3 and 8). The W-box, RAV1AAT, and the ASF1 motif are known binding sites for the transcription factors WRKY, RAV1, and bZIP, respectively [98-100]. In addition, many *cis*-elements involved in JA or ET responsiveness, called JA responsive element (JERE) or the ethylene response element (ERE), were observed (Figures 3 and 8).

Coffea arabica* response to *H. vastatrix

H. vastatrix infects the lower surface of the leaves where it produces large, orange colonies of urediospores, leading to premature leaf fall and yield losses in coffee (*C. arabica*) production [39].

Since it is desirable to have a molecular marker for disease susceptibility or resistance, or both, in the arabica coffee and *H. vastatrix* pathosystem, we checked for accumulation of *CaPR1b* transcripts in coffee in response to pathogen inoculation in a compatible interaction with the coffee leaf rust fungus. We found a strong accumulation of these transcripts around 8 to 12 hours after fungal infection (Figure 2A). These results are in accordance with the increase in *CaPR1b* transcript accumulation observed during coffee/*H. vastatrix* interactions [101]. *CaPR1b* transcripts accumulated at high levels in coffee leaves in both compatible and incompatible interactions during early fungal infection stages that corresponded to fungal entry in the stomata and pioneer haustoria formation in subsidiary cells [101]. However, in later stages, *CaPR1b* activation was sustained only in the coffee/*H. vastatrix* incompatible interaction suggesting that *CaPR1b* may be a suitable marker for HR and SAR development in coffee [101].

In contrast, the *CaNPR1* gene was not activated by rust pathogen inoculation (Figure 2B) which is in accordance with other results in soybean and grapevine [82, 83], but for its expression the presence of SA is critical (Figure 9B).

From these results, it is tempting to speculate that the mechanisms underlying *C. arabica* resistance to the rust pathogen are SA-dependent and that the *CaPR1b* and *CaNPR1* genes are essential markers of the coffee resistance responses to pathogens.

Conclusions

We have isolated the orthologous sequences of the *Arabidopsis* defense-related *PR1b* and *NPR1* genes in coffee, that we called *CaPR1b* and *CaNPR1*. The transcriptional

regulation of *CaPR1b* and *CaNPR1* in response to fungal or SA-treatments suggest that these genes likely play a role during coffee defense responses to *H. vastatrix* infection. In brief, our studies have also shown that coffee genome sequence resources, gene promoter cloning experiments, and transient expression in heterologous systems make it possible to rapidly obtain functional characterization of coffee gene promoters. We anticipate that transgenic plants containing *CaPR1b* and *CaNPR1* promoter-reporter constructs will provide tools for the future analysis of defense signaling networks. Further work will also concentrate on the functional analyses of the coffee WRKY transcription factor, CaWRKY1, interacting with the pathogen defense-related gene promoters reported here.

Methods

Biological material

Coffea arabica cv. Mundo Novo (IAC 388-17-1) and *C. arabica* cv Caturra were obtained from IAC (Instituto Agronômico de Campinas - Campinas, São Paulo, Brazil). Plants were grown in potting soil for 4 months (16h/8h light/dark; 28°C; 70% RH) before use for leaf DNA extraction (*C. arabica* cv Caturra) or pathogen inoculation (*C. arabica* cv Mundo Novo). Plants of *Nicotiana benthamiana* were grown in potting soil under a 16/8h photoperiod for 2 weeks prior to being used for *Agrobacterium* infiltration. *Hemileia vastatrix* race II was kindly provided by Dr. Maria do Céu Silva (CIFC, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro - Oeiras, Portugal).

Biotic stress treatments

For biotic stress assays, 4-month old *Coffea arabica* cv. Mundo Novo plants were kept in a growth chamber (16h/8h light/dark; 23°C; 70% RH) for at least one week, before being inoculated with the coffee leaf rust fungus *Hemileia vastatrix* race II, that elicits a compatible reaction in coffee. The urediniospores (100 mg) were diluted in 10 mL of

sterile water under dark conditions. Leaves from the second pair of plagiotropic shoots from the apex of coffee plants were inoculated with urediniospores. To allow spore germination, the inoculated leaves were covered with a wet black plastic film for 24h. The inoculated leaves were not detached from the plants. Mock-inoculated controls as well as non-inoculated controls were performed. The biological samples were obtained from three independent experiments.

Leaves were randomly sampled at different time-points after inoculation: 0, 8, 12, and 24 h, and immediately deep-frozen. To confirm the infection by the leaf rust fungus, some inoculated leaves were maintained in the plants.

Quantitative gene expression analyses

RNA extraction, reverse transcription, and quantitative PCR experiments (acquisition, analysis and interpretation of data) were performed as described in Barsalobres-Cavallari *et al.* [48]. The specific oligonucleotides used for gene expression studies are shown in Table 1.

Cloning the *CaPR1b* and *CaNPR1* 5' upstream sequences

The genomic DNA from *C. arabica* cv Caturra was isolated using the DNeasy Plant Minikit (Qiagen, France) following the manufacturer's recommendations. The Universal Genome Walker™ Kit (Clontech Laboratories) was used to isolate the promoter regions investigated following the manufacturer's instructions. The promoter region of *CaPR1b* was amplified using two gene-specific primers (GSP) designed based on the *CaPR1b* cDNA sequences (Table 2). On the other hand, the promoter region of *CaNPR1* was amplified using nine GSPs (termed CaNPR1-1 to CaNPR1-9), where the first two (CaNPR1-1 and CaNPR1-2) were designed based on the EST sequence retrieved in the coffee database, while the others were designed based on the nucleotide sequences of the genome walking amplified fragments (Table 2). All the amplified

genomic fragments were cloned into the pGEM-Teasy vector (Promega) and sequenced (Cogenics Genome Express).

Sequence analysis

Protein sequence alignment and the phylogenetic tree were performed using the CLC Sequence Viewer 5.1.1 program. For the phylogenetic and molecular evolutionary analyses, the neighbor joining method with 1000 bootstraps was used.

The DNA sequences were analyzed with the BLAST network services at the National Center for Biotechnology Information [102]. The software tool TSSP was used for the prediction of the transcription start site, polymerase II binding site and TATA-box [103], and the PlantCARE and PLACE databases were used for the prediction of *cis*-acting elements [104, 105].

Construction of β -glucuronidase (GUS) reporter cassettes

The expression cassettes were created by PCR amplification of the full-length putative promoter fragment using a 5' forward oligonucleotide (designated 'primer F') and a reverse oligonucleotide (designated 'primer R'), which were designed based on the nucleotide sequence of the amplified promoters (Table 3). The sequence of the upstream primer F contained an *XhoI* site at the 5'-end. The sequence of the downstream primer R contained an *NcoI* site at the 5'-end. After digestion with *XhoI/NcoI*, each fragment was subcloned into a similarly digested pCAMBIA 1305.1 vector. This vector contains the selectable marker gene, *hygromycin phosphotransferase (hptII)* under the control of the CaMV 35S promoter and CaMV 35S terminator, and utilizes as reporter the β -glucuronidase coding sequence from *Staphylococcus* sp. (*gusA* "*GUSPlus*TM" gene) harboring a catalase intron for specific expression in plants [106]. This reporter is under the control of the CaMV 35S promoter and of the NOS terminator. In the resulting cassettes however, both 35S promoters were substituted by the promoters tested, and

then verified by sequencing. The other 35S promoters present were also removed once they can *trans*-affect and alters the expression pattern of the *iudA* reporter gene. All the constructs were verified by sequencing. The defense-related promoter::GUS fusion constructs, as well as the negative (::GUS) and positive (*CaMV 35S*::GUS) control constructs, were introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (with the pMP90 Ti-plasmid) [107] by electroporation (4mm gap size, 2.5 kV, 25 μ FD, and 200 Ohm for 4,6 msec; Gene Pulser Xcell, Bio-Rad).

***Agrobacterium*-mediated transient expression assays**

Tobacco plants (*Nicotiana benthamiana*) at the 6-leaf stage were used for agroinfiltration. These plants were raised in a greenhouse under a temperature regime of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and the day length was artificially extended to 16h of light a day.

The day preceding infiltration, liquid cultures of *A. tumefaciens* were initiated from bacteria growing on agar plates, in a LBi medium [containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rifampicin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin, 200 μM acetosyringone (Sigma-Aldrich) and 20 mM MES pH 5,6] at 28°C . The *Agrobacterium* cells were harvested by centrifugation for 15 min at 3000 rpm, resuspended for 3h in infiltration media [10 mM MgSO_4 , 200 μM acetosyringone, and 20 mM MES pH 5.6] and adjusted to an absorbance at 600 nm of 0.5 to infiltrate into the tobacco leaves. After infiltrating the *Agrobacterium* suspension using a needle-less syringe, the tobacco plants were maintained in a greenhouse for 72h and then leaf discs were harvested for GUS activity analyses.

Abiotic treatments

After 72h, the plants of *N. benthamiana* agroinfiltrated with the constructs investigated were used as test plants for abiotic stress response. Salicylic acid (SA) treatments were performed by infiltrating leaves with a 0.5 mM solution of SA using a needle-less

syringe in the same areas that were used for agroinfiltration. Water-infiltrated (mock-control) and non-infiltrated leaves were used as negative controls. Leaf discs were collected 3h after treatment. Two factor ANOVA was used to compare different treatments, and Fisher's least significant difference (LSD) comparisons were performed at a P value of 0.05.

GUS activity measurement

Both fluorometric and histochemical GUS assays were conducted according to Jefferson et al. [108]. In brief, for the fluorometric GUS assay, the leaf discs were homogenized in 1 mL extraction buffer [50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium lauryl sarcosine (w/v) and 10 mM β-mercaptoethanol]. The homogenate was centrifuged for 10 min at 12,000 rpm at 4°C, and the supernatant was measured. Protein contents were measured according to the Bradford [109] method, using bovine serum albumin (BSA) as standard. GUS activity was measured and expressed as pmol of 4-methylumbelliferone (4-MU) generated per minute per microgram of soluble proteins.

For the histochemical analysis, the leaf tissues were vacuum-infiltrated using a staining solution consisting of 1 mg/mL X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Glucuronic Acid), 20 mM NaH₂PO₄, 30 mM Na₂HPO₄, 0.25 mM K₃FeCN₆ and 0.25 mM K₄FeCN₆, and were then incubated for 16h at 37°C. After staining, the tissue sections were fixed by incubation in a solution containing 10% formaldehyde, 5% acetic acid and 50% ethanol for 4h at room temperature, and the chlorophyll was removed using ethanol 95% for 24h.

Abbreviations

HR, hypersensitive response; SAR, systemic acquired resistance; PR, pathogenesis related; NPR1, nonexpressor of *PR* genes; SA, salicylic acid; BTH, benzothiadiazole;

INA, 2,6-dichloroisonicotinic acid; JA, jasmonic acid; ET, ethylene; BTB/POZ, broad complex, tramtrack and bric a brac / pox virus and zinc finger; ANK, ankyrin repeat domain; NLS, nuclear localization signal; qPCR, quantitative PCR; BLAST, basic local alignment search tool; kb, kilobase(s); PLACE, plant *cis*-acting regulatory DNA elements.

Authors' contributions

DF conceived this study. CFB-C, A-SP and DF participated in the design of the study. FES carried out the biotic experiment in coffee. CFB-C and FES did the gene expression analyses. CFB-C and A-SP were involved in gene cloning, designing and preparation of promoter-reporter constructs, transient expression in *N. benthamiana* and conducted the GUS assays. CFB-C conducted the promoter computational analyses, sequence alignment, phylogenetic analyses, abiotic assays and wrote the manuscript. IGM and DF coordinated the study and contributed with reagents/materials/analysis tools. All authors contributed, read, corrected and approved the final manuscript. The authors declare no conflict of interest in this work.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Mirian Perez Maluf (EMBRAPA/IAC) for providing the plant materials used in this study. We are greatly indebted to the research center on coffee rusts (CIFC, Oeiras, Portugal) for providing rust isolates. CFB-C was recipient of a fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, and also of a scholarship from the Colégio Doutoral Franco-Brasileiro from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. FES was recipient of a fellowship from CAPES, Brazil. This project was supported by Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do

Estado de São Paulo (FAPESP), CAPES, Comité Français d'Évaluation de la
Coopération Universitaire et Scientifique avec le Brésil (COFECUB) and the Institut de
Recherche pour le Développement (IRD).

References

1. Jones JDG, Dangl JL: **The plant immune system.** *Nature* 2006, **444**(7117):323-329.
2. Durrant WE, Dong X: **Systemic acquired resistance.** *Annu Rev Phytopathol* 2004, **42**:185-209.
3. van Loon LC, Rep M, Pieterse CM: **Significance of inducible defense-related proteins in infected plants.** *Annu Rev Phytopathol* 2006, **44**:135-162.
4. Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW: **Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system.** *Plant Physiol* 1995, **108**(4):1353-1358.
5. Uknes S, Dincher S, Friedrich L, Negrotto D, Williams S, Thompson-Taylor H, Potter S, Ward E, Ryals J: **Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco.** *Plant Cell* 1993, **5**(2):159-169.
6. Strompen G, Gruner R, Pfitzner UM: **An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco.** *Plant Mol Biol* 1998, **37**(5):871-883.
7. Buchel AS, Brederode FT, Bol JF, Linthorst HJ: **Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo.** *Plant Mol Biol* 1999, **40**(3):387-396.
8. Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I: **Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection.** *Science* 1990, **250**(4983):1002-1004.
9. Brederode FT, Linthorst HJ, Bol JF: **Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding.** *Plant Mol Biol* 1991, **17**(6):1117-1125.
10. Eyal Y, Sagee O, Fluhr R: **Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene.** *Plant Mol Biol* 1992, **19**(4):589-599.
11. Reymond P, Farmer EE: **Jasmonate and salicylate as global signals for defence gene expression.** *curr Opin Plant Biol* 1998, **1**:404-411.
12. Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y: **Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves.** *plant Cell Physiol* 1998, **39**:500-507.
13. Cutt JR, Klessig DF: **Pathogenesis related proteins.** In: *Genes Involved in Plant Defence.* Edited by Boller T, Meins Jr. F. Vienna, Austria: Springer-Verlag; 1992: 209-243.
14. Eyal Y, Meller Y, Lev-Yadun S, Fluhr R: **A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression.** *Plant J* 1993, **4**(2):225-234.
15. Vögeli-Lange R, Fründt C, Hart CM, Beffa R, Nagy F, Meins FJ: **Evidence for a role of β -1,3-glucanase in dicot seed germination.** *plant journal* 1994, **5**:273-278.
16. Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA: **Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(14):6602-6606.
17. Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J: **Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene.** *Mol Plant Microbe Interact* 1995, **8**(6):863-870.

18. Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, Morse A, Ryals J: **Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene.** *Plant Mol Biol* 1995, **29**(5):959-968.
19. Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM: **Arabidopsis local resistance to Botrytis cinerea involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4.** *Plant J* 2003, **35**(2):193-205.
20. Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X: **Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance.** *Plant Cell* 1994, **6**(11):1583-1592.
21. Shah J, Tsui F, Klessig DF: **Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of Arabidopsis thaliana, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene.** *Mol Plant Microbe Interact* 1997, **10**(1):69-78.
22. Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X: **The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats.** *Cell* 1997, **88**(1):57-63.
23. Cao H, Li X, Dong X: **Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(11):6531-6536.
24. Garretton V, Carpinelli J, Jordana X, Holuigue L: **The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species.** *Plant Physiol* 2002, **130**(3):1516-1526.
25. Mou Z, Fan W, Dong X: **Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes.** *Cell* 2003, **113**(7):935-944.
26. Kinkema M, Fan W, Dong X: **Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression.** *Plant Cell* 2000, **12**(12):2339-2350.
27. Fan W, Dong X: **In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis.** *Plant Cell* 2002, **14**(6):1377-1389.
28. Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Li X, Dong X: **Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(11):6523-6528.
29. Dong X: **NPR1, all things considered.** *Curr Opin Plant Biol* 2004, **7**(5):547-552.
30. Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X: **Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance.** *Science* 2005, **308**(5724):1036-1040.
31. Yu D, Chen C, Chen Z: **Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression.** *Plant Cell* 2001, **13**(7):1527-1540.
32. Eulgem T, Somssich IE: **Networks of WRKY transcription factors in defense signaling.** *Curr Opin Plant Biol* 2007, **10**(4):366-371.
33. Pieterse CM, van Wees SC, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, van Loon LC: **A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis.** *Plant Cell* 1998, **10**(9):1571-1580.
34. Pieterse CM, Van Loon LC: **NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways.** *Curr Opin Plant Biol* 2004, **7**(4):456-464.

35. Shah J: **The salicylic acid loop in plant defense.** *Curr Opin Plant Biol* 2003, **6**(4):365-371.
36. Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Mettraux JP, Brown R, Kazan K *et al*: **NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol.** *Plant Cell* 2003, **15**(3):760-770.
37. Chern MS, Fitzgerald HA, Yadav RC, Canlas PE, Dong X, Ronald PC: **Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*.** *Plant J* 2001, **27**(2):101-113.
38. Makandar R, Essig JS, Schapaugh MA, Trick HN, Shah J: **Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1.** *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**(2):123-129.
39. Silva M, Varzea V, Guerra-Guimaraes L, Azinheira H, Fernandez D, Petitot A-S, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M: **Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2006, **18**:119 - 147.
40. Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon M-C, Petitot A-S, C Silva M, Guerra-Guimaraes L, Ribeiro A, Argout X, Nicole M: **Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*).** *Molecular Plant Pathology* 2004, **5**(6):527 - 536.
41. Lin C, Mueller LA, Mc Carthy J, Crouzillat D, Petiard V, Tanksley SD: **Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts.** *Theor Appl Genet* 2005, **112**(1):114-130.
42. Vieira L, Andrade A, Colombo C, Moraes A, Metha A, Oliveira A, Labate C, Marino C, Monteiro-Vitorello C, Monte D *et al*: **Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2006, **18**:95 - 108.
43. Ohshima M, Matsuoka M, Yamamoto N, Tanaka Y, Kano-Murakami Y, Ozeki Y, Kato A, Harada N, Ohashi Y: **Nucleotide sequence of the PR-1 gene of *Nicotiana tabacum*.** *FEBS Lett* 1987, **225**:243-246.
44. Ohshima M, Harada N, Matsuoka M, Ohashi Y: **The nucleotide sequence of pathogenesis-related (PR) 1b protein gene of tobacco.** *Nucleic Acids Res* 1990, **18**:181.
45. Van Loon LC, Van Strien EA: **he families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins.** *Physiol Mol Plant Pathol* 1999, **55**:85-97.
46. Grand RJA: **Acylation of viral and eukaryotic proteins.** *Biochem J* 1989, **258**:625-638.
47. Woodgate JR, Gould KL, Hunter T: **Substrate specificity of protein kinase C.** *Eur J Biochem* 1986, **161**:177-184.
48. Barsalobres-Cavallari C, Severino F, Maluf M, Maia I: **Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions.** *BMC Molecular Biology* 2009, **10**(1):1.
49. Alexander D, Goodman RM, Gut-Rela M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl Goy P, Luntz T, Ward E *et al*: **Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis related protein 1a.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:7327-7331.

50. Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mosinger E: **Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*.** *Plant Physiol* 1995, **108**(1):17-27.
51. Santamaria M, Thomson CJ, Read ND, Loake GJ: **The promoter of a basic PR1-like gene, AtPRB1, from *Arabidopsis* establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate.** *Plant Mol Biol* 2001, **47**(5):641-652.
52. Joshi CP: **An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes.** *Nucleic Acids Res* 1987, **15**:6643-6653.
53. Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE: **The WRKY superfamily of plant transcription factors.** *Trends Plant Sci* 2000, **5**(5):199-206.
54. Ohme-Takagi M, Shinshi H: **Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element.** *Plant Cell* 1995, **7**(2):173-182.
55. Lashermes P, Combes MC, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F, Charrier A: **Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome.** *Mol Gen Genet* 1999, **261**(2):259-266.
56. Petitot A-S, Lecouls A-C, Fernandez D: **Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*.** *Tree Genetics & Genomes* 2008, **4**:379 - 390.
57. Escobar MA, Dandekar AM: ***Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease.** *Trends Plant Sci* 2003, **8**(8):380-386.
58. Zhou JM, Tang XY, Martin GB: **The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes.** *EMBO J* 1997, **16**:3207-3218.
59. Manners JM, Penninckx IA, Vermaere K, Kazan K, Brown RL, Morgan A, Maclean DJ, Curtis MD, Cammue BP, Broekaert WF: **The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid.** *Plant Mol Biol* 1998, **38**(6):1071-1080.
60. Shinshi H, Usami S, Ohme-Takagi M: **Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene.** *Plant Mol Biol* 1995, **27**(5):923-932.
61. Ohme-Takagi M, Suzuki K, Shinshi H: **Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes.** *Plant Cell Physiol* 2000, **41**(11):1187-1192.
62. Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M: ***Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression.** *Plant Cell* 2000, **12**(3):393-404.
63. Grimmig B, Gonzalez-Perez MN, Leubner-Metzger G, Vogeli-Lange R, Meins F, Jr., Hain R, Penuelas J, Heidenreich B, Langebartels C, Ernst D *et al*: **Ozone-induced gene expression occurs via ethylene-dependent and -independent signalling.** *Plant Mol Biol* 2003, **51**(4):599-607.
64. Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ, Manners JM: **A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2003, **132**(2):1020-1032.

65. Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, Martin GB: **The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements.** *Plant Cell* 2003, **15**(12):3033-3050.
66. Pontier D, Balague C, Bezombes-Marion I, Tronchet M, Deslandes L, Roby D: **Identification of a novel pathogen-responsive element in the promoter of the tobacco gene HSR203J, a molecular marker of the hypersensitive response.** *Plant J* 2001, **26**(5):495-507.
67. Sablowski RW, Moyano E, Culianez-Macia FA, Schuch W, Martin C, Bevan M: **A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes.** *EMBO J* 1994, **13**(1):128-137.
68. Zhu HF, Fitzsimmons K, Khandelwal A, Kranz RG: **CPC, a single-repeat R3 MYB, is a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*.** *Mol Plant* 2009, **2**(4):790-802.
69. Logemann E, Parniske M, Hahlbrock K: **Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(13):5905-5909.
70. Dong X: **Genetic dissection of systemic acquired resistance.** *Curr Opin Plant Biol* 2001, **4**(4):309-314.
71. Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X: **Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins.** *Science* 2008, **321**(5891):952-956.
72. Clerc RG, Corcoran LM, LeBowitz JH, Baltimore D, Sharp PA: **The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo box-type domains.** *Genes Dev* 1988, **2**(12A):1570-1581.
73. Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL: **Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins.** *Science* 1989, **246**(4932):911-916.
74. O'Shea EK, Rutkowski R, Stafford WF, 3rd, Kim PS: **Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun.** *Science* 1989, **245**(4918):646-648.
75. Maekawa T, Sakura H, Kanei-Ishii C, Sudo T, Yoshimura T, Fujisawa J, Yoshida M, Ishii S: **Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain.** *EMBO J* 1989, **8**(7):2023-2028.
76. Collum RG, Alt FW: **Are myc proteins transcription factors?** *Cancer Cells* 1990, **2**(3):69-75.
77. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II.** *Botanical Journal of the Linnean Society* 2003, **141**(4):399-436.
78. Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G, Tanksley S: **Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing.** *Plant Cell* 2002, **14**(7):1441-1456.
79. Rick CM: **Some cytogenetic features of the genome in diploid species.** *Stadler Sym* 1971, **1**:153-174.
80. Pinto-Maglio CAF, Cruz ND: **Pachytene chromosome morphology in *Coffea L. II. C. arabica L.* complement.** *caryologia* 1998, **51**:19-35.

81. Hepworth SR, Zhang Y, McKim S, Li X, Haughn GW: **BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis***. *Plant Cell* 2005, **17**(5):1434-1448.
82. Henanff G, Heitz T, Mestre P, Mutterer J, Walter B, Chong J: **Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression**. *BMC Plant Biol* 2009, **9**:54.
83. Sandhu D, Tasma IM, Fransch R, Bhattacharyya MK: **Systemic acquired resistance in soybean is regulated by two proteins, Orthologous to *Arabidopsis* NPR1**. *BMC Plant Biol* 2009, **9**:105.
84. Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierec J, Samach A, Coupland G: **CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis***. *Plant Cell* 2006, **18**(11):2971-2984.
85. Du H, Zhang L, Liu L, Tang XF, Yang WJ, Wu YM, Huang YB, Tang YX: **Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family**. *Biochemistry (Mosc)* 2009, **74**(1):1-11.
86. Tamagnone L, Merida A, Parr A, Mackay S, Cullianez-Macia FA, Roberts K, Martin C: **The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco**. *Plant Cell* 1998, **10**(2):135-154.
87. Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH *et al*: **Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor**. *Plant Physiol* 2004, **135**(4):2150-2161.
88. Boter M, Ruiz-Rivero O, Abdeen A, Prat S: **Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis***. *Genes Dev* 2004, **18**(13):1577-1591.
89. Rushton PJ, Reinstadler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE: **Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling**. *Plant Cell* 2002, **14**(4):749-762.
90. Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP: **The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor**. *Plant Physiol* 2004, **134**(3):1006-1016.
91. Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM: **Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening**. *Genetics* 1996, **143**(2):973-982.
92. Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner HY, Johnson J, Delaney TP, Jesse T, Vos P *et al*: **The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B**. *Plant Cell* 1997, **9**(3):425-439.
93. Singh K, Foley RC, Onate-Sanchez L: **Transcription factors in plant defense and stress responses**. *Curr Opin Plant Biol* 2002, **5**(5):430-436.
94. Sohn KH, Lee SC, Jung HW, Hong JK, Hwang BK: **Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance**. *Plant Mol Biol* 2006, **61**(6):897-915.
95. Pandey SP, Somssich IE: **The role of WRKY transcription factors in plant immunity**. *Plant Physiol* 2009, **150**(4):1648-1655.

96. Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA: **The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance.** *Nat Genet* 2000, **26**(4):403-410.
97. Meier S, Bastian R, Donaldson L, Murray S, Bajic V, Gehring C: **Co-expression and promoter content analyses assign a role in biotic and abiotic stress responses to plant natriuretic peptides.** *BMC Plant Biol* 2008, **8**:24.
98. Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K: **Role of *arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression.** *Plant Cell* 1997, **9**(10):1859-1868.
99. Chen C, Chen Z: **Potential of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor.** *Plant Physiol* 2002, **129**(2):706-716.
100. Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K, Shinshi H: **Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1679**(3):279-287.
101. Ramiro DA, Escoute J, Petitot AS, Nicole M, Maluf MP, Fernandez D: **Biphasic haustorial differentiation of the orange rust *Hemileia vastatrix* race II associated with differential defense responses in resistant coffee cultivar.** *plant pathology* 2009.
102. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(17):3389-3402.
103. Shahruradov IA, Gammerman AJ, Hancock JM, Bramley PM, Solovyev VV: **PlantProm: a database of plant promoter sequences.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(1):114-117.
104. Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S: **PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(1):325-327.
105. Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T: **Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**(1):297-300.
106. Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M: **Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation.** *Mol Gen Genet* 1990, **220**(2):245-250.
107. Koncz C, Schell J: **The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector.** *Mol Gen Genet* 1986, **204**:383-396.
108. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW: **GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.** *EMBO J* 1987, **6**(13):3901-3907.
109. Bradford MM: **A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* 1976, **72**:248-254.

Figures

Figure 1 - Predicted amino acid sequence of the *CaPR1b* protein and alignment with similar PR1 proteins from other species

Protein sequences were compared with the CLC Sequence Viewer 5.1.1 program. The hydrophobic signal sequence is depicted as a bold line, the three myristoylation sites as a bold double line, and the single phosphorylation site as a dashed line. Conserved cysteine residues are denoted by an asterisk (*). Abbreviations for given protein sequences are as follows: Vh, *Vitis* hybrid cultivar PR1; Ca, *Coffea arabica* PR1; Nt, *Nicotiana glauca* PR1a (acid) and PR1b (basic) isoforms; At, *Arabidopsis thaliana* PR1.

Figure 2 - Expression pattern of *CaPR1b* and *CaNPR1* following infection with *Hemileia vastatrix*

Leaves of *C. arabica* cv Mundo Novo were inoculated with *H. vastatrix* race II (10 mg spores mL⁻¹). Control leaves were sprayed with water. Leaves were collected at different time points as indicated. The log-transformed gene expression levels are presented and indicate normalized expression levels in inoculated leaves compared to normalized expression levels observed in water-treated leaves at the same time point. The *GAPDH* gene was used as inner control. The two thin dashed lines represent the minimal standard deviation, with a log expression levels difference between 0.5 and -0.5. (A) Induction of *CaPR1b* following infection with *H. vastatrix*. (B) Expression levels of the *CaNPR1b* gene. hpi, hours post inoculation.

Figure 3 - Putative defense-related cis-acting elements present in the *pCaPR1b* promoter sequences

The putative defense-related *cis*-elements are indicated in colour triangles for each element. Arrows indicate the direction of the *cis*-element. Myb, the Myb transcription factor binding site; RAV1AAT, the RAV1 transcription factor binding site; W-box, the WRKY transcription factor binding site; ASF1, the bZIP factor binding site; NF-kB, the binding site for the transcription factors of the Rel family; JERE, the JA responsive

element; ERE, the ET response element; WLE1, the putative WRKY transcription factor binding site; L10 L9 L8 L7 L4, *cis*-acting elements present in the *PR1* gene family; ▽ TATA-box; *, the putative phosphorylation site; <|> antisense / sense.

Figure 4 - Transient expression of *CaPR1b* promoters in tobacco leaves

(A) Histochemical staining. Leaves of *N. benthamiana* were infiltrated with *A. tumefaciens* GV3101 containing empty vector (*::GUS*), or the expression cassettes *pCaPR1b.1::GUS*, *pCaPR1b.2::GUS*, and *35S::GUS*, respectively. Images were captured 3 days after infiltration. Results were comparable in three independent experiments. (B) Fluorimetric assay. After 72h of transient transformation, leaves were infiltrated with a 0.5 mM solution of SA (+SA) or with water (-SA), and collected after 3h. All values are the average of three independent experiments with four independent samples each. GUS activity was determined fluorometrically using 4-MUG as substrate. Bars without a common letter on the top are statistically different (Fisher's LSD test, $P \leq 0.05$). Standard errors are represented by *error bars*.

Figure 5 - Genomic organization of the coffee *NPR1* gene

Schematic representation of the genomic DNA sequence of *CaNPR1* and its coding region. (A) The 4375 bp-long genomic fragment amplified by genome walking contains a coding region that includes two exons and one intron, and a 5' upstream region of 1444 bp. (B) The encoded protein (609 amino acid) harbors the three main domains of NPR1 proteins: the BTB/POZ domain, an ankyrin (ANK) repeat domain, and the nuclear localization signal (NLS). The leucine zipper domain is represented by LZ.

Figure 6 - Conserved regions among NPR1 proteins from different plant species

Multiple alignment of selected plant NPR1 amino acid sequences showing conserved regions. The BTB/POZ domain is represented by a bold red line, the ankyrin repeat domain (ANK) by a bold pink line, the LZ by a bold purple line, and the NLS by a bold

blue line. NPR1 sequences from *Capsicum annuum* (ABG38308.1, Ca), *Nicotiana tabacum* (AAM62410.1, Nt), *Lycopersicon esculentum* (AAT57637.1, Le) and *Arabidopsis thaliana* (NP_176610.1, AAM65726.1, At) were retrieved from the National Center for Biotechnology Information database (NCBI). Protein sequences were compared with the CLC Sequence Viewer 5.1.1 program. Conserved cysteine residues are denoted by an asterisk (*).

Figure 7 - Evolutionary relationship of NPR1 homologs

The evolutionary history was inferred using the neighbor joining method. Bootstrap values based on 1000 replicates are indicated beside the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the CLC Sequence Viewer 5.1.1 program. The NPR1 amino acid sequences used were as follow:

Capsicum annuum (ABG38308.1, Ca), *Nicotiana tabacum* (AAM62410.1, Nt), *Lycopersicon esculentum* (AAT57637.1, Le), *Musa acuminata* (ABL63913.1, Ma), *Oryza sativa* (ABE11613.1, Os), *Hordeum vulgare* (CAJ19095.1, Hv), *Arabidopsis thaliana* (NP_176610.1), *Brassica napus* (AAM88865.2, Bn), and *Brassica juncea* (ABC94642.2, Bj), as well the sequences from *A. thaliana* NPR2 (NP_194342.1, At), NPR3 (NP_199324.2, At), NPR4 (NP_193701.2, At), NPR5 or AtBOP1 (ABH04470.1, At), and NPR6 or AtBOP2 (AAU90063.1, At).

Figure 8 - Prediction of the defense-related cis-acting elements present in the *CaNPR1* promoter sequence

The putative defense-related *cis*-elements are indicated in colour triangles for each element. Arrows indicate the direction of the *cis*-element. Myb, the Myb transcription factor binding site; RAV1AAT, the RAV1 transcription factor binding site; W-box, the WRKY transcription factor binding site; ASF1, the bZIP factor binding site; NF-kB, the binding site for the transcription factors of the Rel family; JERE, the JA responsive

element; ERE, the ET response element; WLE1, the putative WRKY transcription factor binding site; L10 L9 L8 L7 L4, *cis*-acting elements present in the *PR1* gene family; ▽ TATA-box; *, the putative phosphorylation site; <|> antisense / sense.

Figure 9 - GUS activity in tobacco leaves infiltrated with the *pCaNPR1::uidA* expression cassette

(A) Histochemical staining of tobacco leaves infiltrated with *A. tumefaciens* GV3101 containing the *pCaNPR1::GUS* (up/left) or the *35S::GUS* (up/right) expression cassettes. Water-infiltrated leaves (control, down/left) or leaves agroinfiltrated with empty vector (*::GUS*, down/right) were used as control. Treated leaves were collected 3 days after infiltration. (B) After 72h, infiltrated tobacco leaves were re-infiltrated with a 0.5 mM solution of SA or with water, and collected 3h after treatment. All experiments were comparable in three independent experiments.

Tables

Table 1 - Sequence of primers used for quantitative PCR in coffee

Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')
CaNPR1 F	TGGACGAAGGAGCGTGATGTCAGCTT
CaNPR1 R	ACATCCTTGGGCGACGGCCTAACTCT
CaPR1b F	AGGTTGCAGCCTATGCACGTGACTAC
CaPR1b R	GGACCTCCAGAATGCACCAGATTATTG
CaGAPDH F	TTGAAGGGCGGTGCAA
CaGAPDH R	AACATGGGTGCATCCTTGCT

Table 2 - Primers used for genome walking

PRIMER NAME	GENE-SPECIFIC PRIMERS
CaPR1b-GSP1	5' CACGAGCTGCATTATGGGCGTCCAGG3'
CaPR1b-GSP2	5' GCTAGAAAGGAAGGACTTGAAGCCAGG3'
CaNPR1-1	5' CACGAGCTGCATTATGGGCGTCCAGG3'
CaNPR1-2	5' CCCAGCAGTGGATCTCTTCTTTCTGCC3'
CaNPR1-3	5' GCCCTTGCAAACCAAGTCCCTGCG3'
CaNPR1-4	5' CATCTGCAGCAGCTTTGTGAAGAACG3'
CaNPR1-5	5' GGAAACTATAGTAGGGCGTCCAGCAC3'
CaNPR1-6	5' CCAAGCAGTCAGGAGAAGACGACGCG3'
CaNPR1-7	5' GGGAGAGGCGTTGAAGTGAGACGACG3'
CaNPR1-8	5' GACGACTGAACTGGAGCCGGAGC3'
CaNPR1-9	5' CGGTCGATCGGCTAGGAGACTGACG3'

Table 3 - Oligonucleotides used in making promoter constructs

GENE	Primer Sequence
<i>CaPR1b</i>	F 5'AA ACTCGAG GATTCTGAGAGTGATGTAAGC3'
<i>CaPR1b.1</i>	R 5'CT ACCATGG TATTGCATAGGTTAGCTTGC3'
<i>CaPR1b.2</i>	R 5'CT ACCATGG TGTTGCATAGGTTAGCGTGC3'
<i>CaNPR1</i>	F 5'AA ACTCGAG CTGCAAGATCATCTAGCAC3'
	R 5'CT ACCATGG TCGAGGGCAAAGGTGTAATAG3'

XhoI site are in red bold and *NcoI* site are in green bold.

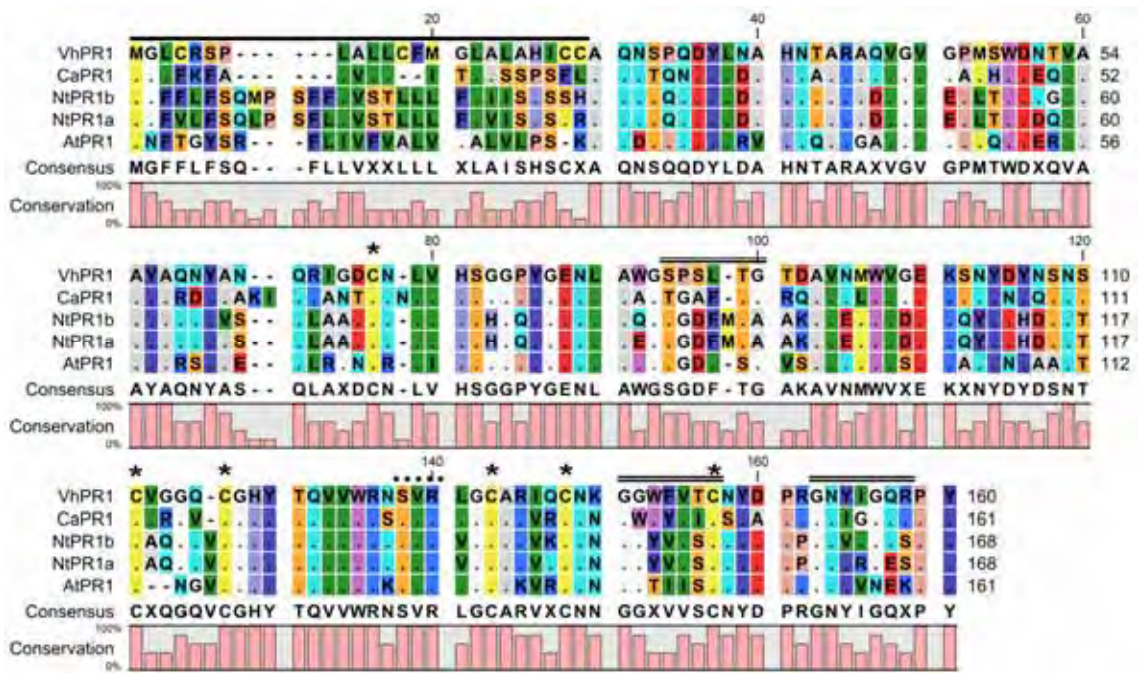
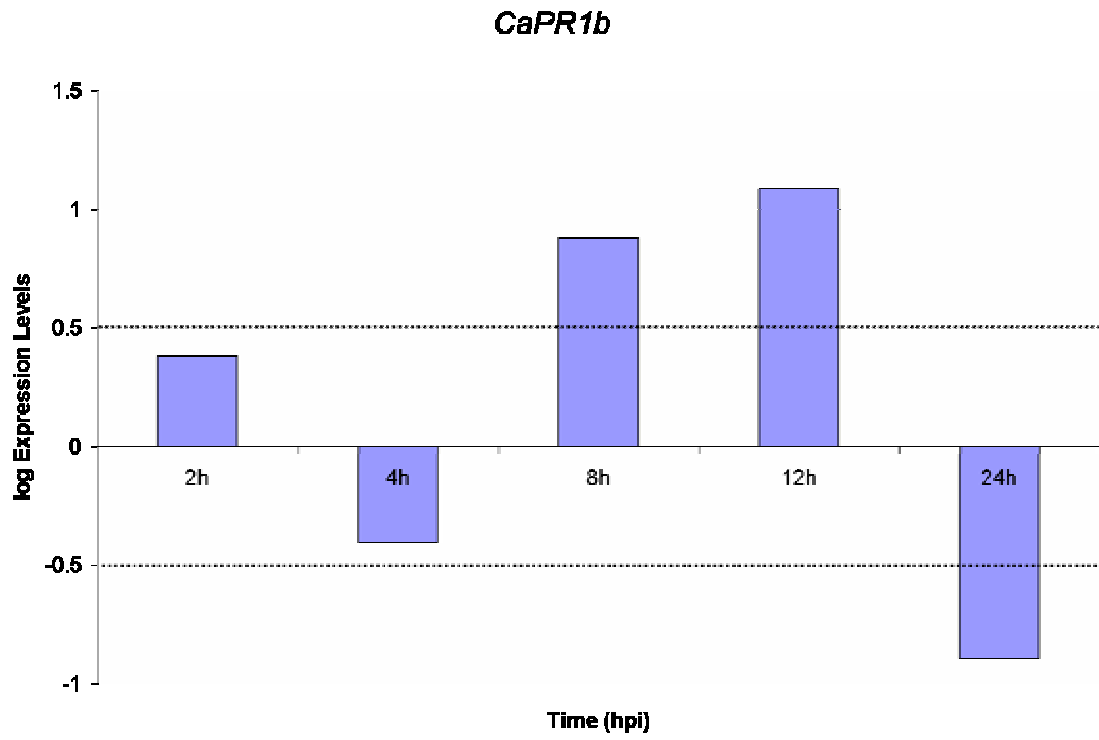


Figure 1

(A)



(B)

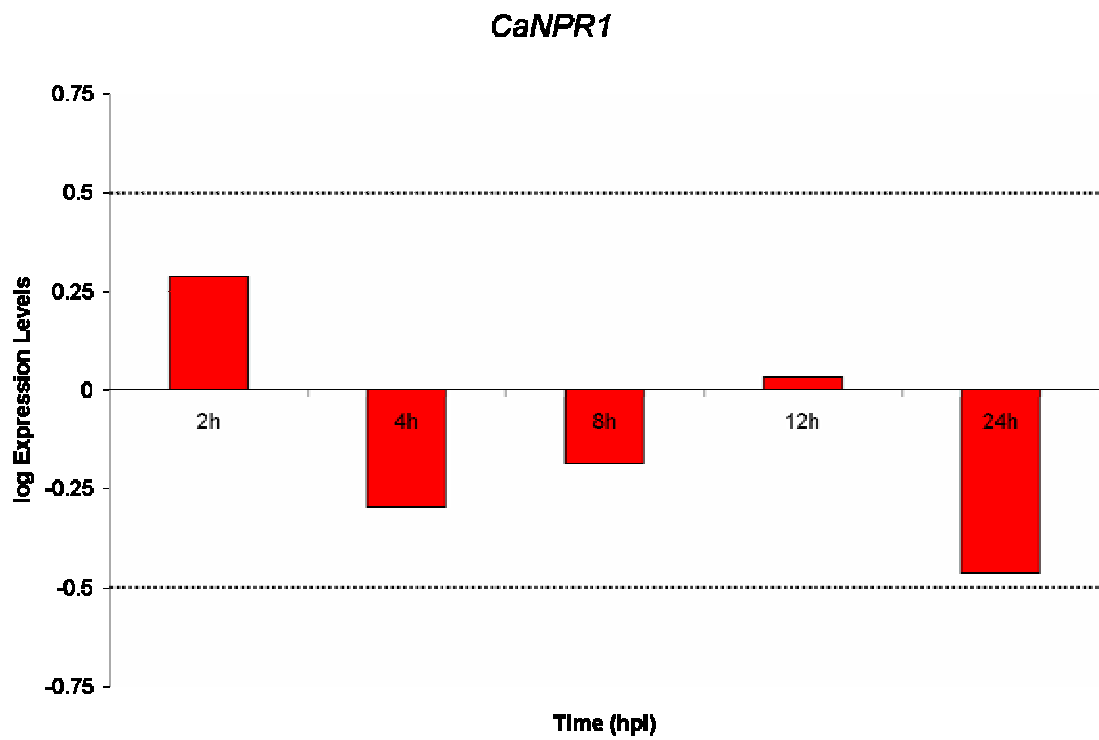


Figure 2

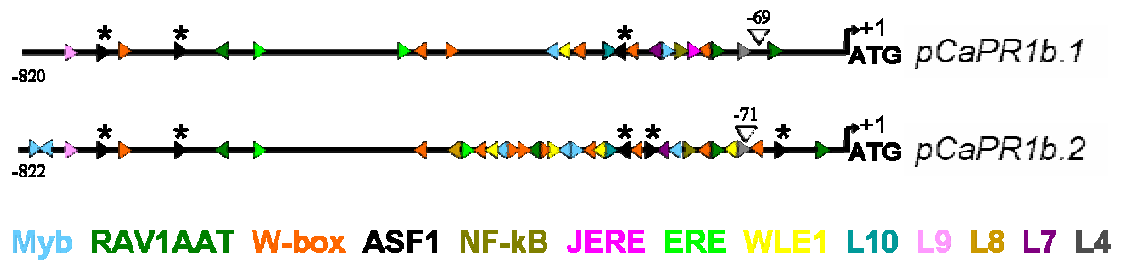
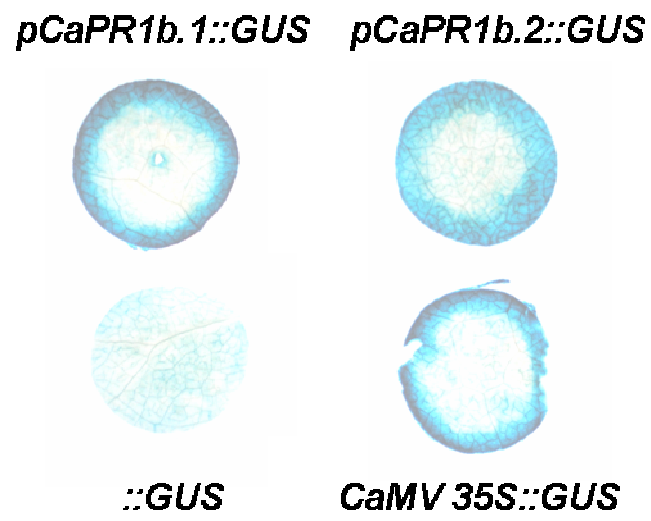


Figure 3

(A)



(B)

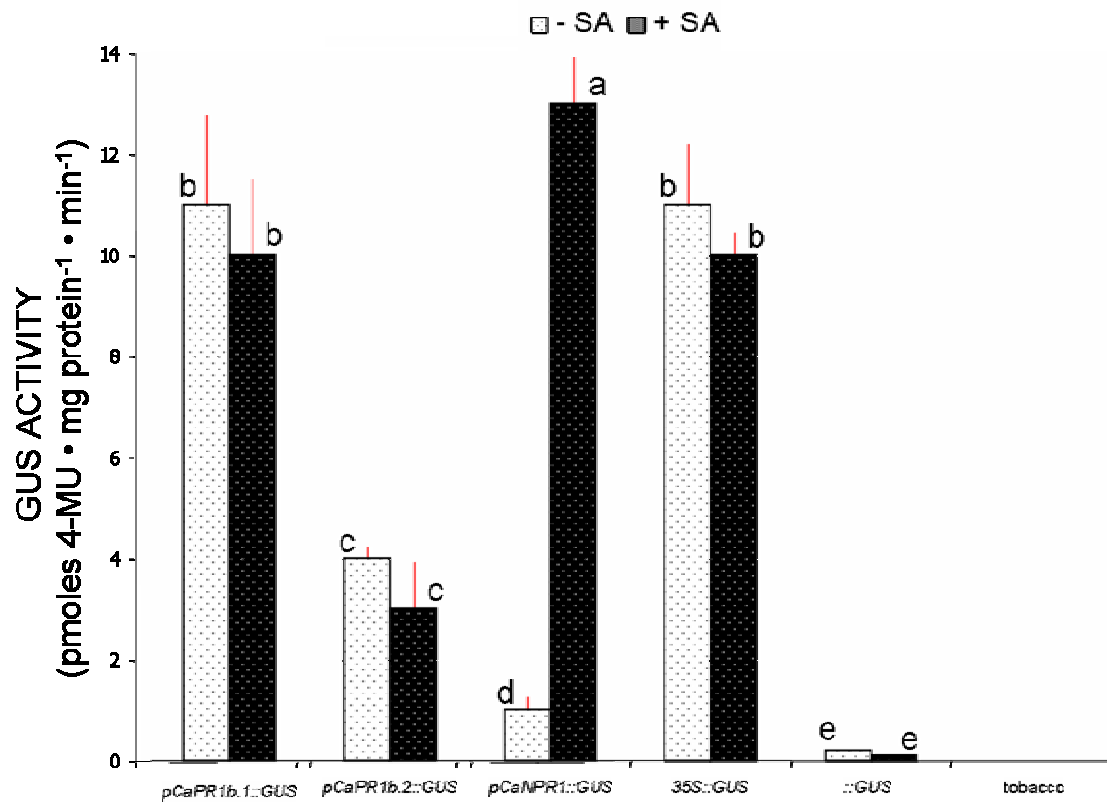
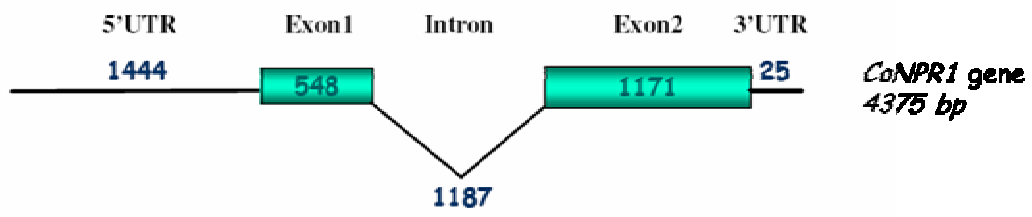


Figure 4

(A)



(B)



Figure 5



Figure 6

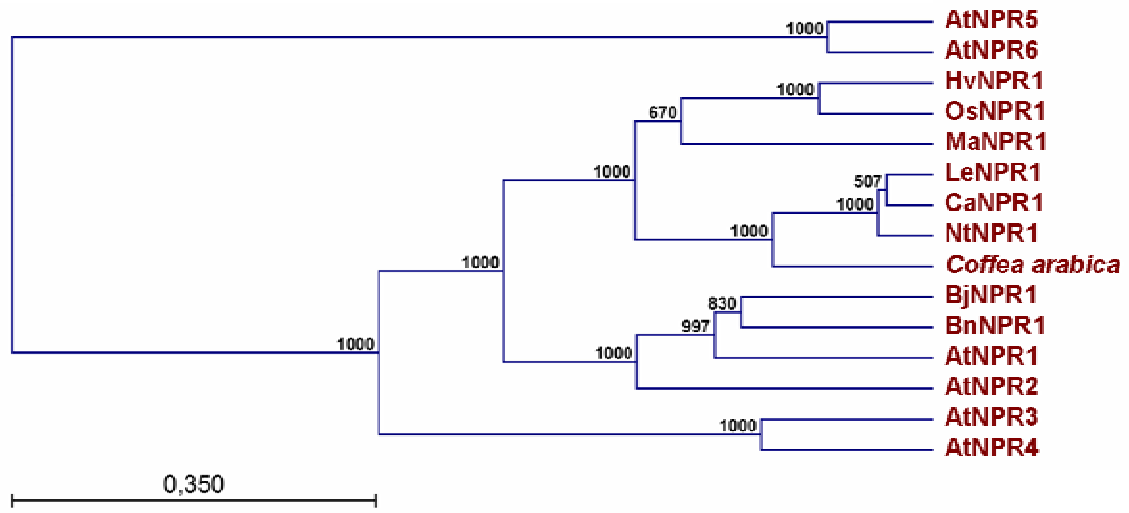


Figure 7

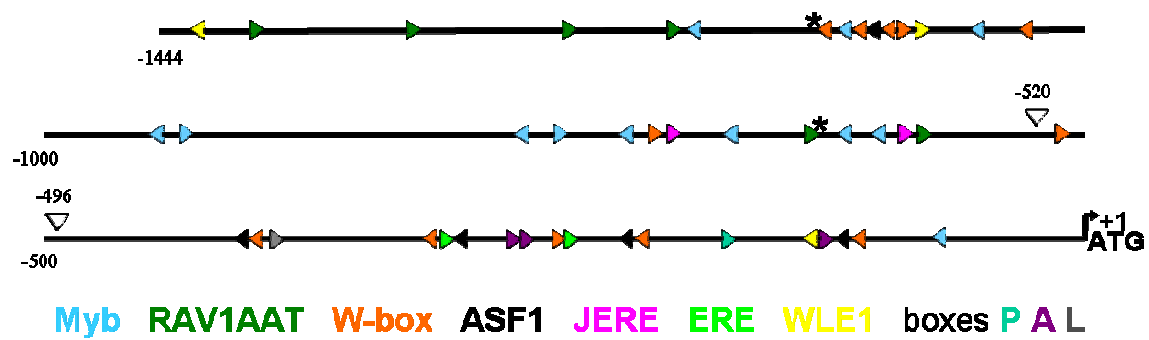
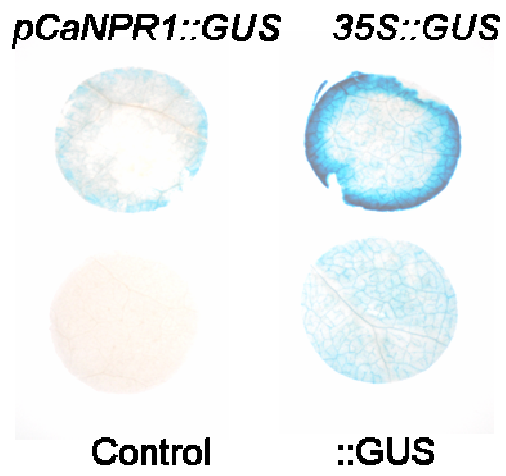


Figure 8

(A)



(B)

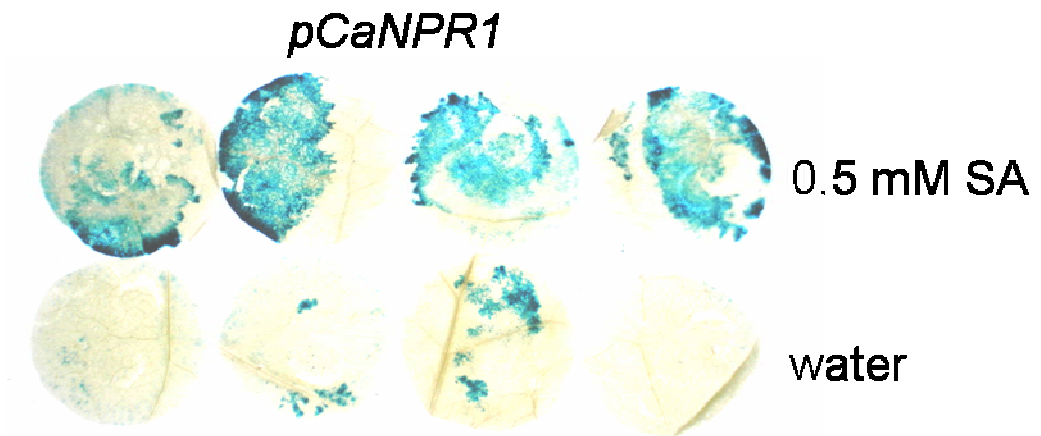


Figure 9

II.13. Conclusões

Neste capítulo foram apresentados os resultados da identificação, caracterização molecular e análise funcional de cinco regiões promotoras de genes do cafeeiro arábica.

O promotor do gene ubíquo *CaGAPDH* (1459 pb) contém 353 prováveis elementos *cis*-regulatórios, enquanto que nos 1186 pb correspondentes à região promotora do gene fruto-específico (*pCaAN2*) foram encontrados 275. Em relação aos genes de defesa, foram identificadas duas diferentes regiões promotoras para o gene *CaPR1b* (as quais apresentam 95% de identidade): *pCaPR1b.1*, com 201 putativos *cis*-elementos em 820 pb, e *pCaPR1b.2*, apresentando 247 em 822 pb. Foi identificada uma região promotora de 1444 pb para o gene *CaNPR1* (*pCaNPR1*), a qual apresenta 364 putativos *cis*-elementos regulatórios.

Análises *in silico* utilizando bancos de dados específicos foram realizadas para a caracterização molecular dos três diferentes tipos de regiões promotoras, relativas ao gene com padrão de expressão constitutivo, fruto-específico e induzidos mediante a presença de agentes patogênicos. Estas análises evidenciaram que diversos dos elementos putativos identificados apresentam respaldo funcional da literatura.

Através de transformação transitória em plantas de tabaco, observou-se que os promotores relacionados com genes de defesa de plantas contra patógenos são funcionais, ou seja, regulam a transcrição do gene *uidA*, que codifica a β -glucuronidase (GUS) como repórter. Entretanto, os dados da atividade funcional dos promotores *pCaGAPDH* e *pCaAN2*, em experimentos de transformação transitória em folhas de tabaco ou em frutos de tomate, são ainda preliminares e necessitam de experimentação adicional.

A disponibilidade desses promotores permite vislumbrar diversos estudos adicionais. Por exemplo, avaliar estes promotores em transformações estáveis; tanto em café quanto em sistemas heterólogos, utilizando genes de interesse agrônômico específicos, para verificar se tais

sequências regulatórias são efetivamente capazes de controlar precisamente a atividade do transgene.

Análises de deleção destes promotores também são necessárias para identificar componentes reguladores, ou seja, verificar se existe algum motivo (*cis*-elemento) regulador responsável por sua atividade (ativação ou repressão). Adicionalmente verificar se estes promotores são induzidos por algum tipo de estresse, seja biótico ou abiótico.

Especificamente em relação aos promotores relacionados com genes de defesa, experimentos de transativação serão conduzidos para avaliar o efeito do fator de transcrição CaWRKY1, isolado previamente pelo grupo da Dra. Diana Fernandez, sobre a expressão de genes repórteres direcionados pelos promotores *pCaPR1b.1*, *pCaPR1b.2* e *pCaNPR1*.

Além do interesse fundamental para a compreensão dos mecanismos de regulação gênica em eucariotos, este estudo apresenta grande potencial para uso futuro em programas de melhoramento genético e biotecnológicos do café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaby, K. *et al.* (2005) Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achieves of strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* 53:4032-4040.
- Acevedo-Hernandez, G.J. *et al.* (2005) Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. *Plant J.* 43:506-519.
- Aharoni, A. *et al.* (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 28:319-332.
- Allen, R.D. *et al.* (1989) Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer. *Plant Cell* 1:623-631.
- Anderson, L.E. *et al.* (2004) Cytosolic glyceraldehyde-3-P dehydrogenase and the B subunit of the chloroplast enzyme are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma* 223:33-43.
- Archibald, J.M. (2009) The puzzle of plastid evolution. *Curr Biol* 19:R81-R88.
- Ban, T. *et al.* (2003) Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 78:586-589.
- Barsalobres-Cavallari, C.F. *et al.* (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology* 10:1.
- Barta, E. *et al.* (2005) DoOP: database of orthologous promoters, collections of clusters of orthologous-upstream sequences from chordates and plants. *Nucleic Acids Res* 33:D86-D90.
- Beilmann, A. *et al.* (1992) Activation of a truncated PR-1 promoter by endogenous enhancers in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 18:65-78.
- Bobbio, F.O. *et al.* (2000) Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20:388-390.
- Boddu, J. *et al.* (2006) Comparative structural and functional characterization of sorghum and maize duplications containing orthologous Myb transcription regulators of 3-deoxyflavonoid biosynthesis. *Plant Mol Biol* 60:185-199.
- Bohm, B. (1998) Introduction of Flavonoids. Harwood Academic Publishers, Singapore.
- Borevitz, J.O. *et al.* (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12:2383-2393.
- Boss, P.K. *et al.* (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol* 111:1059-1066.
- Botelho, B.A. & Perez, S.C.J.G.A. (2001) Estresse hídrico e reguladores de crescimento na germinação de sementes de canafístula. *Scientia Agrícola* 58:43-49.
- Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.C. (1998) Manual de Transformação de Plantas. Embrapa-SPI / Embrapa-Cenargen, Brasília, 309p.
- Brinkmann, H. *et al.* (1989) Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits GapA and GapB of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach. *Plant Mol. Biol.* 13:81-94.
- Brouillard, R. (1982) Chemical structure of anthocyanins. In: Markakis, P. (Ed.) Anthocyanins as Food Colors. Academic Press, New York, USA. p.1-40.
- Brouillard, R. (1983) The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. *Phytochemistry* 22:1311-1323.
- Buchel, A.S. *et al.* (1999) Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Mol. Biol.* 40:387-396.
- Bülow, L. *et al.* (2006) AthaMap: from in silico data to real transcription factor binding sites. *In Silico Biology* 6:0023.
- Busk, P.K. & Pages, M. (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37:425-435.
- Bustos, D.M. & Iglesias, A.A. (2002) Non-phosphorylating GAPDH is post-translationally phosphorylated in heterotrophic cells of wheat (*Triticum aestivum*). *FEBS Letters* 530:169-173.

- Bustos, D.M. & Iglesias, A.A. (2003) Phosphorylated non-phosphorylating GAPDH from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins. *Plant Physiology* 133:2081-2088.
- Butelli, E. *et al.* (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnol.* 26:1301-1308.
- Cerff R. (1995) The chimeric nature of nuclear genomes and the antiquity of introns as demonstrated by the GAPDH gene system. In: Gö, M. & Schimmel, P. (Ed.). *Tracing biological evolution in protein and gene structures.* Elsevier, Amsterdam. p.205-227.
- Cerff, R. & Chambers, S.E. (1979) Subunit structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (EC 1.2.1.12 and EC 1.2.1.13). *J. Biol. Chem.* 254:6094-6098.
- Cerff, R. & Kloppstech, K. (1982) Structural diversity and differential light control of mRNAs coding for angiosperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7624-7628.
- Cerff, R. (1979) Quaternary structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 94:243-247.
- Cerff, R. (1982) Separation and purification of NAD- and NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from higher plants. In: Edelman, M. *et al.* (Ed.). *Methods in chloroplast molecular biology.* Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. p.683-694.
- Chakravarthy, S. *et al.* (2003) The tomato transcription factor Pti4 regulates defence-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* 15:3033-3050.
- Chan, C.S. *et al.* (2001) Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 46:131-141.
- Chandler, V.L. *et al.* (1989) Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: Isolation of B utilizing R genomic sequences. *Plant Cell* 1:1175-1183.
- Chen, W. *et al.* (1996) The promoter of a H2O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J* 10:955-966.
- Chen, Y.H. *et al.* (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* 60:107-124.
- Chinn, A. & Comai, L. (1996) The Heat Shock Cognate 80 gene is flanked by nuclear matrix attachment regions. *Plant Molecular Biology* 12:959-968.
- Chuong, S.D. *et al.* (2004) Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells. *Mol Cell Proteomics* 3:970-983.
- Cone, K.C. *et al.* (1986) Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9631-9635.
- Cone, K.C. *et al.* (1993) Role of the regulatory gene pl in the photocontrol of maize anthocyanin pigmentation. *Plant Cell* 5:1807-1816.
- Conley, T.R. *et al.* (1994) Characterization of *cis*-acting elements in light regulation of the nuclear gene encoding the A subunit of chloroplast isozymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol.* 14:2525-2533.
- Davuluri, R.V. *et al.* (2003) AGRIS: *Arabidopsis* gene regulatory information server, an information resource of *Arabidopsis cis*-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics* 4:25.
- De Vetten, N. *et al.* (1997) The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals. *Genes Dev.* 11:1422-1434.
- Devic, M. *et al.* (1997) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol. Biochem.* 35:331-339.
- Dewick, P.M. (1997) *Medicinal natural products: a biosynthetic approach.* West Sussex: Ed. John Wiley & Sons. 466p.
- Diaz, I. *et al.* (2002) The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. *Plant J* 29:453-464.

- Dixon, R.A. & Paiva, N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Dong, X. (2004) NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:547-552.
- Dooner, H.K. *et al.* (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu Rev Genet* 25:173-199.
- Du, H. *et al.* (2009) Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry* 74:1-11.
- Ebihara, A. *et al.* (2005) Nuclear DNA, chloroplast DNA, and ploidy analysis clarified biological complexity of the *Vandenboschia radicans* complex (Hymenophyllaceae) in Japan and adjacent areas. *American Journal of Botany* 92:1535-1547.
- Erales, J. *et al.* (2008) Exploring CP12 binding proteins revealed aldolase as a new partner for the phosphoribulokinase/glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/CP12 complex - purification and kinetic characterization of this enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Journal* 275:1248-1259.
- Ezcurra, I. *et al.* (1999) Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol Biol* 40:699-709.
- Ezcurra, I. *et al.* (2000) Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J* 24:57-66.
- Fagan, T. *et al.* (1998) The phylogeny of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase indicates lateral gene transfer from cryptomonads to dinoflagellates. *J. Mol. Evol.* 47:633-639.
- Farcy, E. & Cornu, A. (1979) Isolation and characterization of anthocyanin variants originating from the unstable system an2-1 in *Petunia hybrida* (Hort.). *Theor. Appl. Genet.* 55:273-278.
- Fauconneau, B. *et al.* (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* 61:2103-2110.
- Fermani, S. *et al.* (2007) Molecular mechanism of thioredoxin regulation in photosynthetic A2B2-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:11109-11114.
- Fernie, A.R. *et al.* (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* 7:254-261.
- Field, T.S. *et al.* (2001) Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology* 127:566-574.
- Figge, R.M. & Cerff, R. (2001) GAPDH gene diversity in spirochetes: a paradigm for genetic promiscuity. *Mol. Biol. Evol.* 18:2240-2249.
- Fillinger, S. *et al.* (2000) Two glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a non-photosynthetic bacterium. *Journal of Biological Chemistry* 275:14031-14037.
- Florigene (2009) Disponível: <http://www.florigene.com/sales/regulationfr.php>. Acesso em 16 de setembro de 2009.
- Fothergill-Gilmore, L.A. & Michels, P.A. (1993) Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol.* 59:105-235.
- Fourrat, L. *et al.* (2007) Cloning, gene expression and characterization of a novel bacterial NAD-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Neisseria meningitidis* strain Z2491. *Molecular and Cellular Biochemistry* 305:209-219.
- Gerats, A.G.M. & Martin, C. (1992) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: Genetics and molecular biology of flower colour. In: Stafford, H.A. & Ibrahim, R.K. (Ed.). *Recent Advances in Phytochemistry*. v.26. New York: Plenum Press. p.165-199.
- Gerats, A.G.M. *et al.* (1982) Genetic control of the conversion of dihydroflavonols into flavonols and anthocyanins in flowers of *Petunia hybrida*. *Planta* 155:364-368.
- Gerats, A.G.M. *et al.* (1984). Influence of B and PI on UDPG:flavonoid-3-O-glucosyltransferase in *Zea mays* L. *Biochem. Genet.* 22:1161-1169.
- Giege, P. *et al.* (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 15:2140-2151.

- Gocal, G.F.W. *et al.* (1999) Long-day up-regulation of a GAMYB gene during *Lolium temulentum* inflorescence formation. *Plant Physiol* 119:1271-1278.
- Gollop, R. *et al.* (2001) Regulation of the leucoanthocyanidin dioxygenase gene expression in *Vitis vinifera*. *Plant Sci* 161:579-588.
- Gomez Casati, D.F. *et al.* (2000) Structural and kinetic characterization of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from celery leaves. *Plant Science* 154:107-115.
- Gong, Z. *et al.* (1997) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant Mol Biol*. 35:915-927.
- Goodrich, J. *et al.* (1992) A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. *Cell* 68:955-964.
- Gottlieb, L.D. (1982) Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216:373-380.
- Gould, K.S. *et al.* (2002) A unified explanation for anthocyanins in leaves? In: Gould, K.S. & Lee, D.W. (Ed.). *Anthocyanins in Leaves. Advances in Botanical Research*. v.37. London: Academic Press. p.167-192.
- Grotewold, E. *et al.* (1998) Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. *Plant Cell* 10:721-740.
- Grüner, R. & Pfitzner, U.M. (1994) The upstream region of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. *Eur. J. Biochem*. 220:247-255.
- Gubler, F. *et al.* (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: Evidence of myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* 7:1879-1891.
- Gubler, F. *et al.* (1997) Cloning of a rice cDNA encoding a transcription factor homologous to barley GAMyb. *Plant & Cell Physiology* 38:362-365.
- Gubler, F. *et al.* (1999) Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant Journal* 17:1-9.
- Habenicht, A. *et al.* (1994) Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *Journal of Molecular Biology* 237:165-171.
- Hajirezaei, M.R. *et al.* (2006) The influence of cytosolic phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPC) on potato tuber metabolism. *J Exp Bot* 57:2363-2377.
- Hancock, J.T. *et al.* (2005) Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 43:828-835.
- Hänsch, R. *et al.* (2003) Light-dependent anaerobic induction of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4 (GapC4) promoter in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Ann Bot* 91:149-154.
- Haralampidis, K. *et al.* (2002) Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the *Arabidopsis* AtHsp90-1 gene. *Plant Physiol*. 129:1138-1149.
- Harborne, J.R. (1988) The flavonoids: recent advances. In: Goodwin, T.W. (Ed.). *Plant Pigments*. London: Academic Press. p.299-343.
- Harper, J.T. & Keeling, P.J. (2003) Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol. Biol. Evol.* 20:1730-1735.
- Hattori, T. *et al.* (1992) The viviparous-7 gene and abscisic acid activate the C7 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev.* 6:609-618.
- Hedin, P.A. *et al.* (1983) Multiple factors in cotton contributing to resistance to the tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. In: Hedin, P.A. (Ed.). *Plant Resistance to Insects*. American Chemical Society, Washington, D.C. p.347-365.
- Henriksson, E. *et al.* (2005) Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol*. 139:509-518.
- Higo, K. *et al.* (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res* 27:297-300.

- Hodal, L. *et al.* (1992) Detection, expression and specific elimination of endogenous GUS activity in transgenic and nontransgenic plants. *Plant Sci* 87:115-122.
- Holtgrawe, D. *et al.* (2005) Cytoskeleton-associated, carbohydrate-metabolizing enzymes in maize identified by yeast two-hybrid screening. *Physiol Plant* 125:141-156.
- Holtgreffe, S. *et al.* (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol Plant* 133:211-228.
- Holton, T.A. & Cornish, E.C. (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7:1071-1083.
- Honda, C. *et al.* (2002) Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. *Plant Sci.* 40:955-962.
- Hu, C. *et al.* (1990) Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep* 9:1-5.
- Iglesias, A.A. *et al.* (2002) On the interaction of substrate analogues with non-phosphorylating glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase from celery leaves. *Plant Science* 162:689-696.
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter* 5:387-405.
- Jeong, S.T. *et al.* (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci.* 167:247-252.
- Jin, H. & Martin, C. (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* 41:577-585.
- Johannesson, H. *et al.* (2001) DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Mol Biol* 45:63-73.
- Johnson, C. *et al.* (2003) Salicylic acid and *NPR1* induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1846-1858.
- Kamiya, T. *et al.* (2002) Nucleotide polymorphism at the *Atmyb2* locus of the wild plant *Arabidopsis thaliana*. *Genet. Res.* 80:89-98.
- Kang, H.G. & Singh, K.B. (2000) Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: Overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J* 21:329-339.
- Kataoka, I. *et al.* (1982) Effect of abscisic acid and defoliation on anthocyanin accumulation in Kyoho grapes (*Vitis vinifera* L. × *V. labruscana* Bailey). *Vitis* 21:325-332.
- Kenanach, R. *et al.* (1994) Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *Nature* 367:387-389.
- Kinkema, M. *et al.* (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* 12:2339-2350.
- Knudsen, S. (1999) Promoter 2.0: for the recognition of PolIII promoter sequences. *Bioinformatics* 15:356-361.
- Kobayashi, S. *et al.* (2001) Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGFT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci.* 160:543-550.
- Kobayashi, S. *et al.* (2002) Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* 215:924-933.
- Koes, R. *et al.* (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* 10:236-242.
- Koksharova, O. *et al.* (1998) Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* 36:183-194.
- Kolchanov, N.A. *et al.* (2002) Transcription Regulatory Regions Database (TRRD): its status in 2002. *Nucl. Acids Res.* 30:312-317.
- Koncz, C. & Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204:383-396.
- Konczak, I. *et al.* (2005) Regulating the composition of anthocyanins and phenolic acids in a sweetpotato cell culture towards production of polyphenolic complex with enhanced physiological activity. *Trends Food Sci Technol* 16:377-388.
- Kotzer, A.M. *et al.* (2004) AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *J Cell Sci* 117:6377-6389.

- Kranz, H.D. *et al.* (1998) Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:263-276.
- Kranz, H.D. *et al.* (2000) c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *The Plant Journal* 21:231-235.
- Laxalt, A.M. *et al.* (1996) Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Molecular Biology* 30:961-972.
- Lessard, P.A. *et al.* (1991) Multiple nuclear factors interact with upstream sequences of differentially regulated beta-conglycinin genes. *Plant Mol Biol* 16:397-413.
- Liaud, M.F. *et al.* (2000) Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol. Biol. Evol.* 17:213-223.
- Lima, V.L.A.G. *et al.* (2002) Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. *Scientia Agrícola* 59:447-450.
- Lindsay, W.P. *et al.* (2002) KAP-2, a protein that binds to the H-box in a bean chalcone synthase promoter, is a novel plant transcription factor with sequence identity to the large subunit of human Ku autoantigen. *Plant Mol Biol* 49:503-514.
- Lipsick, J.S. (1996) One billion years of Myb. *Oncogene* 13:223-235.
- Loake, G.J. *et al.* (1992) Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9230-9234.
- Loppes, R. & Radoux, M. (2001) Identification of short promoter regions involved in the transcriptional expression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 45:215-227.
- Lu, G.T. *et al.* (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for extracellular polysaccharide production and full virulence. *Microbiology* 155:1602-1612.
- Ludwig, S.R. *et al.* (1989) Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7092-7096.
- Maeda, K. *et al.* (2005) DcMYB1 acts as a transcriptional activator of the carrot phenylalanine ammonia-lyase gene (DcPAL1) in response to elicitor treatment, UV-B irradiation and the dilution effect. *Plant Mol Biol.* 59:739-752.
- Manhita, A.C. *et al.* (2006) Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples. *Journal of Chromatography A* 1129:14-20.
- Manjunath, S. & Sachs, M.M. (1997) Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. *Plant Molecular Biology* 33:97-112.
- Marcotte Jr., W.R. *et al.* (1989) Abscisic acid-responsive sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1:969-976.
- Marri, L. *et al.* (2005) Coordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoribulokinase and CP12 in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 56:73-80.
- Martin, C. & Paz-Ares, J. (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* 13:67-73.
- Martin, C. *et al.* (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant Journal* 1:37-49.
- Martin, W. & Cerff, R. (1986) Prokaryotic features of a nucleus encoded enzyme: cDNA sequences for chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from mustard. *Eur. J. Biochem* 159:323-331.
- Martinez, I.M. & Chrispeels, M.J. (2003) Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell* 15:561-576.
- Mateos, M.I. & Serrano, A. (1992) Occurrence of phosphorylating and nonphosphorylating NADP+-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in photosynthetic organisms. *Plant Science* 84:163-170.

- Mathew, A.G. & Parpia, H.A.B. (1971) Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food Res.* 19:75-145.
- Mathews, H. *et al.* (2003) Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15:1689-1703.
- Mattivi, F. *et al.* (2006) Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J Agric Food Chem* 54:7692-7702.
- Mazza, G. & Miniati, E. (1993) *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. CRC Press, Boca Raton. 362p.
- Melandri, B.A. *et al.* (1970) D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in photosynthetic cells. 2. Reversible light-induced activation in vivo of NADP⁺-dependent enzyme and its relationship to NAD-dependent activities. *Biochimica et Biophysica Acta* 220:178-184.
- Merzlyak, M.N. *et al.* (2008) Effect of anthocyanins, carotenoids and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 59:349-359.
- Meyer-Gauen, G. *et al.* (1994) Molecular characterization of a novel, nuclear-encoded, NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in plastids of the gymnosperm *Pinus sylvestris* L. *Plant Molecular Biology* 26:1155-1166.
- Mhiri, C. *et al.* (1997) The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol Biol* 33:257-266.
- Michels, S. *et al.* (1994) Arguments against a close relationship between non-phosphorylating and phosphorylating glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenases. *FEBS Letters* 339:97-100.
- Mitsuhara, I. *et al.* (2008) Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Mol Genet Genomics* 279:415-427.
- Mohanty, B. *et al.* (2005) Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. *Ann Bot* 96:669-681.
- Mol, J. *et al.* (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* 3:212-217.
- Morais, H. *et al.* (2002) Stability of anthocyanins extracted from grape skins. *Chromatographia* 56:173-175.
- Moyano, E. *et al.* (1996) Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Antirrhinum* flowers. *Plant Cell* 8:1519-1532.
- Ngai, N. *et al.* (1997) Light-induced transcriptional repression of the pea AS1 gene: identification of *cis*-elements and transfactors. *Plant J* 12:1021-1234.
- Nijveldt, R.J. *et al.* (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74:418-425.
- Nyman, N.A. & Kumpulainen, J.T. (2001) Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 49:4183-4187.
- Ogawa, M. *et al.* (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* 15:1591-1604.
- Oh, D.H. *et al.* (2003) Conservation between animals and plants of the *cis*-acting element involved in the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:225-230.
- Ohta, S. *et al.* (1990) Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol* 31:805-814.
- Orzaez, D. *et al.* (2006) Agroinjection of tomato fruits: a tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiology* 140:3-11.
- Pawlowska, A.M. *et al.* (2006) Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:10234-10238.
- Paz-Ares, J. *et al.* (1986). Molecular cloning of the *c* locus of *Zea mays*: A locus regulating the anthocyanin pathway. *EMBO J.* 5:829-833.
- Paz-Ares, J. *et al.* (1987) The regulatory C1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO Journal* 6:3553-3558.
- Pelletier, M.K. *et al.* (1997) Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 113:1437-1445.

- Perrot, G.H. & Cone, K.C. (1989) Nucleotide sequence of the maize R-S gene. *Nucl. Acids Res.* 17:8003.
- Perusse, J.R. & Schoen, D.J. (2004) Molecular evolution of the GapC gene family in *Amsinckia spectabilis* populations that differ in out-crossing rate. *Journal of Molecular Evolution* 59:427-436.
- Petersen, J. *et al.* (2003) Origin, evolution, and metabolic role of a novel glycolytic GAPDH enzyme recruited by land plant plastids. *Journal of Molecular Evolution* 57:16-26.
- Piazza, P. *et al.* (2002) Members of the c1/pl1 regulatory gene family mediate the response of maize aleurone and mesocotyl to different light qualities and cytokinins. *Plant Physiol* 128:1077-1086.
- Plaxton, W. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 47:185-214.
- Plegt, L. & Bino, R.J. (1989) GUS activity during development of the male gametophyte from transgenic and non-transgenic plants. *Mol Gen Genet* 216:321-327.
- Procissi, A. *et al.* (1997) Light-dependent spatial and temporal expression of pigment regulatory genes in developing maize seeds. *Plant Cell* 9:1547-1557.
- Qian, Q. & Keeling, P.J. (2001) Diplonemid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and prokaryote-to-eukaryote lateral gene transfer. *Protist* 152:193-201.
- Quattrocchio, F. *et al.* (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell* 5:1497-1512.
- Quattrocchio, F. *et al.* (1998) Analysis of bHLH and MYB-domain proteins: Species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J.* 13:475-488.
- Quattrocchio, F. *et al.* (1999) Molecular analysis of the anthocyanin 2 gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* 11:1433-1444.
- Radicella, J.P. *et al.* (1991) Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding B-Peru, a regulatory protein of the anthocyanin pathway in maize. *Plant Mol Biol* 17:127-130.
- Rieping, M. & Schoffl, F. (1992) Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced expression of chimaeric heat shock genes in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet.* 231:226-232.
- Rimari, A. & Strommer, J. (1998) Anthocyanin regulatory mutations in pea: effects on gene expression and complementation by R-like genes of maize. *Mol Gen Genet* 257:198-204.
- Rius, S.P. *et al.* (2006) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant lacking a cytosolic non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Mol Biol* 61:945-957.
- Rius, S.P. *et al.* (2008) Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiology* 148:1655-1667.
- Romero, I. *et al.* (1998) More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14:273-284.
- Rosinsky, J.A. & Atchley, W.R. (1998) Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J Mol Evol* 46:74-83.
- Ross, J.A. & Kasum, C.M. (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 22:19-34.
- Russell, D.A. & Sachs, M.M. (1989) Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family. *Plant Cell* 1:793-803.
- Russell, D.A. & Sachs, M.M. (1991) The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis. *Mol Gen Genet* 229:219-228.
- Ryals, J. *et al.* (1997) The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IKB. *Plant Cell* 9:425-439.
- Sainz, M.B. *et al.* (1997) Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. *Plant Cell* 9:611-625.
- Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1659p.

- Santamaria, M. *et al.* (2001) The promoter of a basic *PR1-like* gene, *AtPRB1*, from *Arabidopsis* establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and ethyl jasmonate. *Plant Mol Biol* 47:641-652.
- Schuettpeiz, E. *et al.* (2008) The utility of nuclear gapCp in resolving polyploid fern origins. *Systematic Botany* 33:621-629.
- Schwinn, K. *et al.* (2006) A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell* 18:831-851.
- Seki, M. *et al.* (2002) Functional Annotation of a Full-Length *Arabidopsis* cDNA Collection. *Science* 296:141-145.
- Serrano, A. *et al.* (1993) ATP-driven transhydrogenation and ionization of water in a reconstituted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating and non-phosphorylating) model system. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1348-1356.
- Sessa, G. *et al.* (1993) The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J* 12:3507-3517.
- Shih, M.C. & Goodman, H.M. (1988) Differential light-regulated expression of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Nicotiana tabacum*. *EMBO Journal* 7:893-898.
- Shih, M.C. *et al.* (1986) Evidence in favor of the symbiotic origin of chloroplasts: primary structure and evolution of tobacco glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Cell* 47:73-80.
- Shih, M.C. *et al.* (1991) Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 104:133-138.
- Shirley, B.W. (1996). Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an old pathway. *Trends in Plant Science* 1:377-382.
- Skriver, K. & Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2:503-512.
- Smith, T.L. (1989) Disparate evolution of yeasts and filamentous fungi indicated by phylogenetic analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7063-7066.
- Sompornpailin, K. *et al.* (2002) A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant Mol. Biol.* 50:485-495.
- Sparla, F. *et al.* (2005). Regulation of photosynthetic GAPDH dissected by mutants. *Plant Physiol.* 138:2210-2219.
- Sparvoli, F. *et al.* (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* 24:743-755.
- Spelt, C. *et al.* (2000) Anthocyanin1 of petunia encodes a basic-helix loop helix protein that directly activates structural anthocyanin genes. *Plant Cell* 12:1619-1631.
- Spelt, C. *et al.* (2002) ANTHOCYANIN1 of petunia controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant Cell* 14:2121-2135.
- Stracke, R. *et al.* (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 4:447-456.
- Strompen, G. *et al.* (1998) An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol Biol* 37:871-883.
- Subramaniam, R. *et al.* (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* 19:769-772.
- Takishita, K. & Inagaki, Y. (2009) Eukaryotic origin of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum* genomes and putative fates of the exogenous gene in the subsequent genome evolution. *Gene* 441:22-27.
- Takishita, K. *et al.* (2004) Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted GAPDH gene supports separate origins for the peridinin- and the fucoxanthin derivative-containing plastids of dinoflagellates. *Protist* 155:447-458.
- Takishita, K. *et al.* (2008) Origins of plastids and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Gene* 410:26-36.

- Takishita, K. *et al.* (2009) A hypothesis for the evolution of nuclear-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in “chromalveolate” members. *PLoS ONE* 4:e4737.
- Tanikawa, J. *et al.* (1993) Recognition of specific DNA sequences by the c-myc protooncogene product: Role of three repeat units in the DNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9320-9324.
- Tatusova, T.A. & Madden, T.L. (1999) BLAST 2 SEQUENCES, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250.
- Terzaghi, W.B. & Cashmore, A.R. (1995) Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:445-474.
- Terzaghi, W.B. & Cashmore, A.R. (1995) Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:445-474.
- Tonelli, C. *et al.* (1991) Genetic and molecular analysis of Sn, a light-inducible, tissue-specific regulatory gene in maize. *Mol. Gen. Genet.* 225:401-410.
- Tör, M. *et al.* (1992) Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positives in transformation of *Dioscorea* species. *Plant Cell Rep.* 11:452-456.
- Tso, J.Y. *et al.* (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Research* 13:2485-2502.
- Tsuda, T. *et al.* (2004) Expression of anthocyanin biosynthesis genes in the skin of peach and nectarine fruit. *J Am Soc Hortic Sci* 129:857-862.
- Twell, D. *et al.* (1989) Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol. Gen. Genet.* 217:240-245.
- Urao, T. *et al.* (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5:1529-1539.
- Urao, T. *et al.* (1996) A transcriptional activation domain of AtMYB2, a drought-inducible *Arabidopsis* Myb-related protein. *Plant J* 10:1145-1148.
- Valverde, F. *et al.* (1999) Engineering a central metabolic pathway: glycolysis with no net phosphorylation in an *Escherichia coli* gap mutant complemented with a plant GapN gene. *FEBS Lett.* 449:153-158.
- Valverde, F. *et al.* (2005) Sugar-mediated transcriptional regulation of the Gap gene system and concerted photosystem II functional modulation in the microalga *Scenedesmus vacuolatus*. *Planta* 221:937-952.
- Van Der Sluis, A.A. *et al.* (2000) An improved, rapid in vitro method to measure antioxidant activity. Application on selected flavonoids and apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:4116-4122.
- Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:85-97.
- Van Loon, L.C. *et al.* (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135-162.
- Vancanneyt, G. *et al.* (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250.
- Velasco, R. *et al.* (1994) Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 26:541-546.
- Vieira, L.G.E. *et al.* (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:95-108.
- Villain, P. *et al.* (1996) The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *J. Biol. Chem.* 271:32593-32598.
- Viscogliosi, E. & Müller, M. (1998) Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, from parabasalid flagellates. *J. Mol. Evol* 47:190-199.
- Walker, A.R. *et al.* (1999) The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11:1337-1350.

- Wang, X. *et al.* (2007) Involvement of a cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GapC-2 in low-phosphate-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Chin Sci Bull* 52:1764-1770.
- Washida, H. *et al.* (1999) Identification of *cis*-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1. *Plant Mol Biol* 40:1-12.
- Weeden, N.F. & Gottlieb, L.D. (1980) The genetics of chloroplast enzymes. *J. Hered.* 71:392-396.
- Weiss, D. *et al.* (1992) Gibberellic acid regulates chalcone synthase gene transcription in the corolla of *Petunia hybrida*. *Plant Physiol* 98:191-197.
- Wenkel, S. *et al.* (2006) CONSTANS and the CCAAT Box Binding Complex Share a Functionally Important Domain and Interact to Regulate Flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 18:2971-2984.
- Wiering, H. & De Vlaming, P. (1984) Inheritance and biochemistry of pigments. In: Sink, K.C. (Ed.). *Monographs on theoretical and applied genetics 9: Petunia*. Berlin: Springer-Verlag. p.49-76.
- Wiering, H. (1974) Genetics of flower colour in *Petunia hybrida* hort. *Genen Phaenen* 17:117-134.
- Wilkins, O. *et al.* (2009) Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiol* 149:981-993.
- Williams, G.T. & Morimoto, R.I. (1990) Maximal stress-induced transcription from the human HSP70 promoter requires interactions with the basal promoter elements independent of rotational alignment. *Molecular & Cellular Biology* 10:3125-3136.
- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol*. 126:485-493.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5:218-223.
- Wolosiuk, R.A. & Buchanan, B.B. (1978) Activation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Plant Physiol* 61:669-671.
- Wrolstad, R.E. (2000) Anthocyanins. In: Francis, F.J. & Lauro, G.J. (Ed.). *Natural Food Colorants*. Marcel Dekker, Inc., NY. p.237-252.
- Wu, C. *et al.* (2000) Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal *cis*-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J* 23:415-421.
- Xie, Y. & Wu, R. (1989) Rice alcohol dehydrogenase genes: Anaerobic induction, organ specific expression and characterization of cDNA clones. *Plant Mol. Biol.* 13:53-68.
- Yamada, T. (2004) Resistência de plantas as pragas e doenças: pode ser afetada pelo manejo da cultura? Piracicaba: POTAFOS – Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo. (Informações agrônomicas n.108).
- Yamaguchi, S. & Kamiya, Y. (2002) Gibberellins and light-stimulated seed germination. *Journal of Plant Growth Regulation* 20:369-376.
- Yamamoto, Y.Y. & Obokata, J. (2008) ppdb, a plant promoter database. *Nucleic Acids Res* 36:D977-D981.
- Yanagisawa, S. & Schmidt, R.J. (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J* 17:209-214.
- Yanagisawa, S. (2000) Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J* 21:281-288.
- Yang, Y. *et al.* (1993) Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 101:209-216.
- Yanhui, C. *et al.* (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* 60:107-124.
- Yu, L.M. *et al.* (1993) Purification and biochemical characterization of proteins which bind to the H-box *cis*-element implicated in transcriptional activation of plant defense genes. *Plant J* 3:805-816.
- Zhang, B. *et al.* (1993) Isolation and characterization of two related *Arabidopsis* *ocs*-element bZIP binding proteins. *Plant J* 4:711-716.

- Zhang, B. *et al.* (1995) Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. *Plant Cell* 7:2241-2252.
- Zhang, F. *et al.* (2003) A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development* 130:4859-4869.
- Zhang, Y. *et al.* (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96:6523-6528.
- Zhou, D.X. (1999) Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends Plant Sci.* 4:210-214.
- Zhou, J.M. *et al.* (2000) *NPR1* differentially interacts with members of the *TGA/OBF* family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:191-202.
- Zimmermann, I.M. *et al.* (2004) Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J* 40:22-34.
- Zuanazzi, J.A.S. & Montanha, J.A. (2004) Flavonóides In: Simões, C.M.O. *et al.* (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5a. edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC. Cap. 23. p.577-614.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, diversos genes do cafeeiro foram identificados, clonados, e tiveram seus promotores caracterizados.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que análises *in silico* (*Northern* eletrônico) de transcritos (ESTs) com o intuito de identificar genes com padrão de expressão específico é um método pouco sensível, gerando grande quantidade de falsos positivos.

Os experimentos de RT-PCR foram importantes para a triagem dos genes candidatos. Entretanto, a técnica de PCR em tempo real foi imprescindível para a quantificação precisa dos níveis de expressão gênica nos diferentes órgãos/tecidos amostrados.

Demonstrou-se que o gene *CaGAPDH* é expresso de maneira constitutiva em diferentes órgãos/tecidos do cafeeiro, podendo ser utilizado como um normalizador para estudos de expressão gênica nesta espécie. *CaGAPDH* apresenta similaridade de seqüência com genes de plantas que codificam a enzima *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Esta é uma das proteínas-chave do metabolismo do carbono.

CaAN2, um gene que é expresso exclusivamente nos frutos, foi identificado a partir de análises *in silico*, e sua expressão foi verificada em amostras de diferentes órgãos/tecidos do cafeeiro arábica. *CaAN2* apresenta similaridade com o fator de transcrição *anthocyanin 2* do tipo MYB, que regula a síntese de antocianinas em *Petunia*. Esta família de fatores de transcrição envolve diversos membros, com atuação demonstrada em diferentes processos (principalmente em desenvolvimento e defesa).

Dois genes envolvidos com a resposta de resistência à patógenos foram caracterizados. *CaNPR1* apresenta similaridade de seqüência com o gene *NPR1* de *Arabidopsis*, um elemento-chave na ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas, eficaz contra vários patógenos biotróficos. A proteína NPR1 regula a transcrição de genes de defesa, notadamente a do *PR1*, que codifica uma proteína PR (*Pathogenesis-Related*) do tipo 1. De acordo com a literatura, estes dois genes são indutíveis por patógenos e por ácido salicílico (AS). O AS possui um importante papel como molécula sinalizadora da SAR. Os resultados deste estudo demonstram um aumento significativo da expressão do gene *CaPR1b* em resposta à inoculação pelo fungo *H. vastatrix* na interação compatível. No entanto, não foram observadas mudanças significativas nos níveis de transcritos de *CaNPR1*.

Foram isoladas cinco regiões promotoras empregando-se a técnica de *genome walking*. Os fragmentos isolados correspondem a três diferentes tipos de regiões promotoras: um relativo ao gene com padrão de expressão constitutivo (*pCaGAPDH*, ~1,5 kb), um proveniente de um gene com expressão específica em fruto (*pCaAN2*, ~1,2 kb) e três correspondentes a genes induzidos mediante a presença de agentes patogênicos (*pCaPR1b.1*, 0,8 kb; *pCaPR1b.2*, 0,8 kb; e *pCaNPR1*, ~1,4 kb).

Com relação à atividade destes promotores, foi mostrado que os promotores relacionados com genes de defesa de plantas contra patógenos são funcionais, ou seja, regulam a transcrição do gene *uidA*, que codifica a β -glucuronidase (GUS) como repórter. Demonstrou-se que o AS é necessário para a ativação de *pCaNPR1*. Por outro lado, a aplicação de AS não alterou a expressão do gene *uidA*, controlado pelos promotores *pCaPR1b.1* e *pCaPR1b.2*. Os dados obtidos sobre o funcionamento dos promotores *pCaPR1b.1* e *pCaPR1b.2*, no contexto do aloploplóide *C. arábica*, certamente proporcionarão conhecimentos para compreensão da evolução dos alelos homeólogos e do controle de sua expressão.

Entretanto, os dados da atividade funcional dos promotores *pCaGAPDH* e *pCaAN2*, em experimentos de transformação transitória em folhas de tabaco ou em frutos de tomate, são ainda preliminares e necessitam de experimentação adicional.

A próxima etapa do estudo de promotores de cafeeiro, tanto de expressão constitutiva, quanto de expressão específica ou induzida, será a realização de uma série de deleções na região 5' destes promotores. O efeito das deleções sobre a ativação ou repressão da atividade dos promotores, sob diferentes tratamentos ao qual as plantas podem ser submetidas, permitirá identificar os diferentes elementos *cis*-reguladores essenciais. Estes ensaios poderão ser conduzidos em tabaco, como foi feito neste trabalho, por expressão transitória. Por outro lado, a transformação de frutos de tomate deverá ser otimizada para que se possa verificar a expressão específica de *pCaAN2*. Alternativamente, é possível obter raízes de cafeeiro transformadas por *A. rhizogenes*, o que permitiria verificar a funcionalidade dos promotores em sistema homólogo. Tais ensaios já estão sendo realizados para *pCaNPR1* (Petitot A-S. - comunicação pessoal).

O conhecimento adquirido sobre os elementos regulatórios da expressão de genes poderão, subsequentemente, permitir sua utilização em biotecnologia. Plantas de *C. arabica* transformadas com o gene *uidA* foram descritas recentemente, demonstrando que tal abordagem é realizável, apesar do período moroso de regeneração, obtenção das plantas e posteriormente a floração e frutificação. Desta forma é possível obter-se plantas de cafeeiro geneticamente modificadas em até cinco anos. O desenvolvimento de plantas transgênicas, com características agrônomicas específicas, nas quais é possível controlar precisamente a atividade do transgene, é de grande interesse, e os estudos deverão prosseguir com este objetivo. O conhecimento sobre promotores de genes específicos de frutos apresenta grande aplicação em estratégias de manipulação do metabolismo dos frutos, podendo permitir a produção de proteínas interessantes como anticorpos, nutraceuticos e vacinas comestíveis, graças à engenharia

genética. Assim, também será possível melhorar os aspectos relacionados à estocagem e manutenção das características organolépticas dos grãos.

Além da importância da caracterização de promotores, este estudo também apresenta informações fundamentais para a compreensão dos mecanismos de regulação da expressão gênica no cafeeiro, e em plantas perenes de maneira geral.

Com relação à compreensão de mecanismos de defesa de plantas contra agentes patogênicos, será interessante verificar a função dos genes que foram caracterizados. Abordagens de genética reversa poderão ser utilizadas para melhor caracterizá-los. Recentemente, a complementação do mutante *ndr1-1*, implicado na sinalização da resistência em *A. thaliana*, pelo gene do cafeeiro *CaNDR1* foi realizada com sucesso no IRD. Do mesmo modo, a função do gene *CcETR1* de *C. canephora*, gene relacionado à percepção de etileno, foi demonstrada em *A. thaliana*. Por exemplo, a complementação do mutante de *A. thaliana npr1-1* poderia ser realizada com o gene *CaNPR1*. A linhagem de *Atnpr1-1* foi obtida através de plantas modificadas com o gene repórter *uidA* sob controle do promotor do gene β -1,3-glucanase (classe de PR-2). Assim, o restabelecimento da função de *NPR1* poderá ser visualizado simplesmente pela ativação do gene repórter, com uma coloração azul nos órgãos-alvo. No entanto, não existem mutantes *pr1* em *A. thaliana* para permitir a análise funcional de *CaPR1*.

Experimentos de *trans*-ativação serão realizados através da análise da proteína CaWRKY1, fator de transcrição isolado previamente pelo grupo da Dra. Diana Fernandez, sobre a expressão de genes repórteres direcionados pelos promotores *pCaPR1b.1*, *pCaPR1b.2* e *pCaNPR1*.

Como conclusão, cabe ressaltar que as informações obtidas neste trabalho representam uma grande contribuição ao estudo da biologia e da fisiologia do cafeeiro. A longo prazo, o isolamento e caracterização de genes de importância agrônômica poderão contribuir para o melhoramento genético de *C. arabica*.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Severino, F.E.; Maluf, M.P.; Maia, I.G. (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. BMC Molecular Biology 10:1.
2. Nobile, P.M.; Lopes, C.R.; **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Quecini, V.; Coutinho, L.L.; Hoshino, A.A.; Gimenes, M.A. (2008) Peanut genes identified during initial phase of *Cercosporidium personatum* infection. Plant Science 174:78-87.
3. Rocha, F.R.; Papini-Terzi, F.S.; Nishiyama Jr., M.Y.; Vencio, R.; Vicentini, R.; Duarte, R.D.; Rosa Jr., V.E.; Vinagre, F.; **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Medeiros, A.H.; Rodrigues, F.A.; Ulian, E.C.; Mauro, S.M.Z.Di; Galbiatti, J.A.; Almeida, R.S.; Figueira, A.V.; Hemerly, A.S.; Silva-Filho, M.C.; Menossi, M.; Souza, G.M. (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. BMC Genomics 8:71.
4. **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Rosa Jr., V.E.; Nogueira, F.T.; Ferro, J.A.; Mauro, S.M.Z.Di; Menossi, M.; Ulian, E.C.; Silva-Filho, M.C. (2006) A novel system for large-scale gene expression analysis: bacterial colonies array. Applied Microbiology and Biotechnology 71:963-969.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Petitot, A.S.; Maia, I.G.; Fernandez, D. Molecular characterization of pathogen defense-related genes in coffee. In: XXXVIII Reunião Anual da SBBq, 2009, Águas de Lindóia.
2. **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Petitot, A.S.; Maia, I.G.; Fernandez, D. Caractérisation de promoteurs de gènes de défense du caféier. In: 7e Rencontres de Phytopathologie/Mycologie de la Société Française de Phytopathologie (Journées Jean Chevaugéon), 2008, Aussois.
3. **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Petitot, A.S.; Maia, I.G.; Fernandez, D. Caractérisation de promoteurs de gènes de défense du caféier. In: 4ième journée de la Biologie Végétale à Montpellier, 2007, Montpellier.
4. Rocha, F.R.; Papini-Terzi, F.S.; Nishiyama Jr., M.Y.; Vencio, R.; Vicentini, R.; Rosa Jr., V.E.; Ulian, E.C.; **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Vinagre, F.; Hemerly, A.S.; Silva-Filho, M.C.; Menossi, M.; Souza, G.M. Expression profile of signal transduction-related genes in sugarcane plants submitted to phytohormones and biotic and abiotic stresses. In: Plant & Animal Genomes XIV Conference, 2006, San Diego, CA.
5. Nobile, P.M.; Barata, T.; **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Guimaraes, P.; Leal-Bertioli, S.; Bertioli, D.; Lopes, C.R.; Gimenes, M.A. Identification and characterization of peanut (*Arachis hypogaea* L.) ESTs regulated during interaction with *Cercosporidium personatum* (Berk. & Curt.) Deighton. In: Plant & Animal Genomes XIV Conference, 2006, San Diego, CA.
6. **Barsalobres-Cavallari, C.F.** Induced Gene Responses to Herbivory in Sugarcane. In: Gordon Research Conference on Plant Molecular Biology, 2006, Plymouth, NH.
7. **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Maluf, M.P.; Maia, I.G. Validating internal controls for gene expression studies in *Coffea arabica*. In: Botany Conference, 2006, Chico, CA.

8. **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Maluf, M.P.; Maia, I.G. Real-time PCR analysis of fruit-specific genes from *Coffea arabica*. In: Botany Conference, 2006, Chico, CA.
9. Medeiros, A.H.; **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Moura, D.S.; Silva-Filho, M.C. Estudo das bases genéticas para a tolerância da cana-de-açúcar a *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE). In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006, Recife.
10. **Barsalobres-Cavallari, C.F.**; Medeiros, A.H.; Pompermayer, P.; Mauro, S.M.Z.Di; Ulian, E.C.; Moura, D.S.; Silva Filho, M.C. Induced gene responses to herbivory in sugarcane. In: XXXIV Reunião Anual da SBBq, 2005, Águas de Lindóia.