

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CAMPUS DE BOTUCATU**

FÁBIO EDUARDO SEVERINO

**ESTUDO DE DOIS GENES DE CAFÉ (*Coffea arabica*)
INDUZIDOS POR ESTRESSE BIÓTICO E ANÁLISE DE
SUAS REGIÕES PROMOTORAS.**

**BOTUCATU – SP
2013**

FÁBIO EDUARDO SEVERINO

**ESTUDO DE DOIS GENES DE CAFÉ (*Coffea arabica*)
INDUZIDOS POR ESTRESSE BIÓTICO E ANÁLISE DE
SUAS REGIÕES PROMOTORAS.**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista - Botucatu
(SP), para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Biológicas, Área de Concentração:
Genética.

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

**BOTUCATU – SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Severino, Fábio Eduardo.

Estudo de dois genes de café (*Coffea arabica*) induzidos por estresse biótico e análise de suas regiões promotoras / Fábio Eduardo Severino. - Botucatu, 2013

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

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20202008

1. Café – Cultivo. 2. Planta – Melhoramento genético. 3. Expressão gênica. 4. Peroxidase.

Palavras-chave: Café; Fator de transcrição WRKY; Isoflavona redutase; Nematóide; Peroxidase; Promotor tecido/orgão-específico; RT-qPCR.

Dedicatória

A todos, que tornaram
possível a realização desse projeto.

Agradecimientos

Especialmente aos meus pais, Sílvia e Sônia Severino pelo apoio e compreensão durante todos esses anos.

Ao meu ilustríssimo orientador Dr. Ivan de Godoy Maia pela confiança, ensinamentos prestimosos e toda ajuda cedida durante seis anos de pacífica convivência.

A Dra. Mirian Perez Maluf, ao Dr. Marcos Brandalise e a todos do Centro de Café “Alcides Carvalho” no IAC pela colaboração essencial na execução deste trabalho.

Ao Dr. Celso Eduardo Benedetti do Laboratório Nacional de Biociências - CNPEM pelo auxílio inefável ao longo de todo o projeto.

Aos pós-graduandos: Alessandra T., Marcela, Rodrigo, Márcio, Bruno, Júlio, Vanusa, Karine e a pós-doc Juliana, pela amizade e pelos conselhos dentro do laboratório.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Genética e do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, a EMBRAPA – Café, a FAPESP, a CAPES e o CNPq pelo auxílio financeiro as pesquisas e pela bolsa de estudo.

Sumário

Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Tabelas.....	X
Resumo.....	XII
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Taxonomia e Genética do Cafeeiro.....	2
1.2. Importância.....	3
1.3. A ferrugem Alaranjada do Cafeeiro.....	4
1.4. Nematóides.....	7
1.5. A Biotecnologia e o Café.....	8
1.6. Promotores.....	11
2. O Gene <i>CaPrx</i>	16
2.1. As Peroxidases.....	17
2.2. <i>CaPrx</i> , a <i>Coffea arabica</i> gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection.....	20
3. O Gene <i>CaIRL</i>	28
3.1. Os Fenilpropanóides.....	29
3.2. Fatores de Transcrição do Tipo WRKY.....	34
4. Material e Métodos.....	37
4.1. Material Vegetal.....	38
4.2. Extração de DNA Genômico de Café.....	38
4.3. Obtenção das Versões Truncadas do Promotor <i>CaIRL</i>	39

4.4. Inserção das Versões Truncadas do Promotor <i>CaIRL</i> em pCAMBIA-1381z.....	41
4.5. Inserção da Região Codificadora de <i>CaWRKY1a</i> em pBI121.....	41
4.6. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Eletrocompetente.....	42
4.7. Ensaio de Agroinfiltração e Transativação.....	42
4.8. Extração de RNA Total de Tabaco.....	44
4.9. Quantificação do RNA e Síntese de cDNA.....	45
4.10. Quantificação da Expressão Relativa por PCR em Tempo Real.....	46
4.11. Obtenção dos Extratos Nucleares Totais de Folhas de Café.....	48
4.12. Obtenção e Marcação da Sonda de DNA.....	48
4.13. Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida....	49
4.14. Busca <i>in silico</i> por genes e sequências promotoras ortólogas a <i>CaIRL</i>	49
5. Resultados.....	51
5.1. Análises de Deleção do Promotor do Gene <i>CaIRL</i>	52
5.2. Regulação do Gene <i>CaIRL</i> por Fatores de Transcrição do Tipo WRKY1.....	56
5.3. Interação Proteína-DNA (WRKY/W-box).....	58
5.4. Análise <i>in silico</i> de sítios W-box em regiões promotoras putativas de genes ortólogos de <i>CaIRL</i>	61
6. Discussão.....	62
7. Conclusão.....	66
8. Referências Bibliográficas.....	68

Lista de Figuras

Figura 1 - Visão geral das funções específicas das peroxidases de classe III de plantas nas reações de defesa.....	18
Figura 2 – Via biossintética dos mais importantes flavonóides derivados em leguminosas.....	30
Figura 3 – A reação enzimática catalizada pela IFR de <i>M. sativa</i>	32
Figura 4 – Sequência de nucleotídeos do promotor <i>CaIRL</i> (900 pb) como descrito por Brandalise <i>et al.</i> (2009).....	53
Figura 5 – Representação esquemática das versões truncadas do promotor do gene <i>CaIRL</i>	54
Figura 6 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação correspondente às versões truncadas do promotor <i>CaIRL</i>	54
Figura 7 – Expressão relativa do gene repórter GUS em folhas de tabaco agroinfiltradas com os cassetes de expressão contendo as diferentes versões do promotor <i>CaIRL</i>	56
Figura 8 – Acúmulo de transcritos do gene GUS em folhas de tabaco transgênicas agroinfiltradas com a construção pBI121:35S: <i>CaWRK1a</i>	57
Figura 9 – Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética empregando extrato protéico nuclear de café.....	59
Figura 10 – Ensaio de retardo de mobilidade em gel com sondas mutadas.....	60
Figura 11 – Representação esquemática das regiões promotoras putativas de genes ortólogos a <i>CaIRL</i> mostrando o número de W-boxes (TGAC) em cada sequência encontrada.....	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Descrição dos oligonucleotídeos empregados na amplificação dos diferentes fragmentos do promotor <i>CaIRL</i>	40
Tabela 2 - Oligonucleotídeos empregados nas reações de RT-qPCR.....	46

Resumo

A disponibilidade de promotores órgão/tecido-específicos responsáveis pela regulação de genes responsivos a estresses bióticos e abióticos constitui uma ferramenta fundamental para os programas de melhoramento genético do café (*Coffea arabica*) visando o incremento de resistência e tolerância. Relatamos aqui a caracterização de um promotor do gene que codifica uma provável peroxidase III em *C. arabica* (*CaPrx*), peroxidases da classe III (Prxs) são enzimas envolvidas numa variedade de processos fisiológicos relacionados com o estresse em plantas. A *CaPrx* é expressa em estágios iniciais da interação com o nematóide de galha (RKN). *CaPrx* mostrou expressão aumentada nas raízes de café inoculadas com RKN (*Meloidogyne paranaensis*) (12 h após a inoculação), mas nenhuma diferença significativa foi observada na expressão entre as plantas suscetíveis e resistentes. Ensaio com plantas de tabaco transgênicas portadoras do promotor *CaPrx* fusionado com o gene que codifica a β -glucuronidase (*GUS*), revelou que este promotor foi exclusivamente ativo nas galhas induzidas por RKN (*Meloidogyne javanica*). Em seções transversais de galhas, o repórter *GUS* foi detectado predominantemente em células gigantes. Um aumento na expressão do gene *GUS* em raízes de tabaco transgênicos foi detectado 16 horas pós-inoculação por RKN. Por outro lado, nenhuma alteração na expressão de *GUS* após tratamento com ácido jasmônico foi detectada. Um segundo estudo foi realizado a fim de desvendar o papel de um fator WRKY de café (*CaWRKY1*) na regulação do promotor do gene que codifica uma isoflavona redutase em café (*CaIRL*). Fatores de transcrição do tipo WRKY estão envolvidos na regulação da expressão de diversos genes de defesa em plantas. A região promotora do gene *CaIRL* possui diversos sítios W-boxes ao longo de sua sequência. Através de análises de deleção e ensaios de transativação verificou-se que o fator *CaWRKY1* foi capaz de transativar o promotor do gene *CaIRL* sendo que a modulação da resposta parece estar relacionada com a presença dos W-boxes na região promotora.

Introdução Geral

1.1. Taxonomia e Genética do Cafeeiro

O cafeeiro (família Rubiaceae) é uma planta perene, dicotiledônea, de porte arbustivo ou arbóreo. O gênero *Coffea* L. compreende mais de 100 táxons já identificados, incluindo as duas espécies de importância econômica: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Charrier & Berthaud, 1985). Todas as espécies de *Coffea* são nativas das florestas intertropicais da África, Madagascar, e Ilhas do Oceano Índico. Estudos filogenéticos indicam que a espécie *C. arabica* é originária dos platôs centrais da Etiópia, endêmica dessa região e provavelmente descendente de uma hibridização recente, aproximadamente a um milhão de anos atrás, entre *Coffea eugenoides* e *C. canephora* (Cros *et al.*, 1998; Lashermes *et al.*, 1999, Vidal *et al.*, 2010).

A alta qualidade na bebida está associada com a espécie *C. arabica*, que representa 65% da produção mundial de café. *C. arabica* é a única espécie tetraplóide ($2n = 4x = 44$) no gênero enquanto as outras espécies são diplóides ($2n = 2x = 22$). Apesar do pouco tempo de divergência entre seus dois genomas constituintes, *C. arabica* apresenta comportamento meiótico como de um diplóide normal (Carvalho *et al.*, 1984; Lashermes *et al.*, 2000 a, b).

Adicionalmente, *C. arabica* caracteriza-se por sua baixa diversidade genética e a transferência de características desejadas de espécies diplóides aparentadas tem sido uma prioridade contínua nos cruzamentos do café (Carvalho, 1988; Van der Vossen, 2001). Hibridizações interespecíficas em plantas são um meio comum de aumentar a gama de variação buscando fenótipos favoráveis que apresentem resistência a doenças e pragas, tolerância à seca e outras alterações ambientais, presentes nas espécies parentais.

Aspectos associados à dissimilaridade poliploidica, e à ploidia entre as espécies, podem resultar em barreiras intransponíveis ao fluxo gênico (Rieseberg *et al.*, 2000). Em um programa de melhoramento clássico do cafeeiro são necessários ciclos sucessivos de cruzamento e seleção até que se consigam genótipos superiores. Para assegurar a fidelidade através de propagação por sementes, seis ciclos de autofecundação são requeridos. Considerando um ciclo por hibridização e seleção, e seis ciclos para homozigose das sementes, um programa clássico de melhoramento delongaria 28 anos (Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006). O melhoramento utilizando cultivares clonais, através de embriogênese somática e/ou micropropagação, consumiria menos tempo, algo em torno de 10 anos (Carvalho, *et al.*, 2011).

Por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, o melhoramento genético do cafeeiro é lento, sendo necessária a implementação de técnicas que facilitem e acelerem a obtenção, seleção e avaliação de materiais superiores.

1.2. Importância

Sendo o café um dos mais importantes produtos agrícolas do mundo, o segmento cafeeiro é de grande relevância para o Brasil, que é o seu maior produtor mundial, sendo responsável por mais de um terço de sua produção e exportação. A produção brasileira, estimada de 50,48 milhões de sacas beneficiadas para a safra de 2012 (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2012), é a maior do mundo. Desse total, 75,08% (37,9 milhões de sacas) são de arábica e 24,92% (12,5 milhões de sacas) são de robusta (*C. canephora*). O parque cafeeiro em produção, em nosso país, ocupa uma área de 2.339.600 hectares (Companhia Nacional de Abastecimento -

CONAB, 2012). O café representou 9,2% das exportações brasileiras no agronegócio em 2011, com uma receita cambial de 8,7 bilhões de dólares (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2012).

Apesar da importante receita gerada para nosso país, doenças e pragas são altamente limitantes à produção cafeeira. Segundo Hein & Gatzweiler (2005), o nematóide de raiz do gênero *Meloidogyne* ataca uma grande variedade de culturas ao redor do mundo, incluindo o café, onde causa uma perda de 12% de produtividade na colheita apenas na América do Sul. A ferrugem do café, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é a mais importante doença que acomete o cafeeiro no mundo, levando a perdas de aproximadamente 13% na colheita (dados para a América do Sul). Devido ao grande número de raças diferentes de *H. vastatrix*, o controle da doença torna-se ainda mais difícil, mesmo com cruzamento entre variedades resistentes nos programas de melhoramento.

1.3. A Ferrugem Alaranjada do Cafeeiro

A ferrugem alaranjada do cafeeiro tem como agente etiológico o fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., espécie descrita originalmente por Berkeley, para um tipo de ferrugem encontrada nos cafeeiros do Sri Lanka em 1869. Ela ocorre em todas as regiões produtoras de café no Brasil, desde 1970, e na América Central.

Existem mais de 40 raças fisiológicas do fungo que atacam os cafeeiros, sendo que no Brasil foram descritas 17 raças (Costa *et al.*, 2007). Entre estas, a raça II predomina nos cafeeiros brasileiros. O fungo ataca todas as variedades de café, porém, dentro da espécie *C. canephora* são encontrados alguns cultivares com resistência,

enquanto que a maioria dos cultivares comerciais dentro da espécie *C. arabica* é susceptível à doença. Também não podemos deixar de citar o Híbrido do Timor, um híbrido natural tetraplóide entre arábica e robusta, que apresenta resistência a todas as raças de ferrugem encontradas no Brasil, sendo utilizado em programas de melhoramento genético desde 1970 (Rodrigues Junior *et al.*, 2004).

Os primeiros sintomas da enfermidade correspondem a pequenas manchas circulares de cor amarelo-laranja, com diâmetro de 0,5 cm, que aparecem na face inferior da folha. Sobre a mancha forma-se uma massa pulverulenta de uredósporos. Nos estágios mais avançados, algumas partes do tecido foliar são destruídas e necrosadas, conduzindo a desfolha. A queda precoce das folhas resulta em menor vingamento da florada, menor vingamento dos frutos verdes (chumbinhos) e também seca dos ramos plagiotrópicos, comprometendo, em alguns casos, mais de 50% da produção do cafeeiro (Garçon *et al.*, 2004).

As duas abordagens mais utilizadas para o controle da doença mundialmente consistem no uso de fungicidas e na introgressão de material genético resistente, ambas oferecendo vantagens limitadas (Cacas *et al.*, 2011). Em primeiro lugar, a aplicação de fungicida, embora de custo acessível, nem sempre resulta no controle adequado da doença e, por outro lado, tem um impacto negativo no ambiente (intoxicação do solo, frutos e trabalhadores rurais). Em segundo lugar, apesar de muitas variedades de café resistentes a *H. vastatrix* terem sido usadas para fins de introgressão (Lashermes *et al.*, 2010), tais alternativas são demoradas e não oferecem resistência duradoura, especialmente devido à rápida co-evolução das raças do fungo que portam novos genes de virulência (Silva *et al.*, 2006; Sera *et al.*, 2010).

Uma maneira interessante de combate a tais patógenos envolve a ativação do sistema de defesa natural das plantas. O sistema de defesa contra patógenos é formado

por uma combinação de respostas constitutivas e induzidas. Quando sob infecção, vias de transdução de sinais específicos são ativadas, resultando na expressão de uma gama de respostas, as quais incluem a morte celular programada (resposta hipersensitiva, HR). A HR geralmente dispara um sistema secundário para defender as partes sadias da planta, e que confere resistência contra patógenos virulentos. Este fenômeno é conhecido como resistência sistêmica adquirida (SAR), o qual se caracteriza pela dispersão de substâncias químicas que atuam contra fungos, bactérias e vírus (Ryals *et al.*, 1996; De Nardi *et al.*, 2006).

Essas substâncias são codificadas por genes cuja expressão é induzida por patógenos, apresentando tanto uma hierarquia temporal como espacial na sua ativação. Alguns desses têm uma rápida ativação localizada no sítio da infecção, enquanto outros são mais lentamente ativados localmente e/ou sistematicamente. As diferenças encontradas nos padrões de expressão dos genes ativados por patógenos resultam, entre outros fatores, da arquitetura dos seus promotores. Cabe ressaltar que esses promotores não possuem um padrão regular no número, ordem ou tipo de sítios regulatórios. Apesar da diferença na arquitetura, análises funcionais das regiões promotoras de alguns desses genes têm conduzido a algumas descobertas elucidativas no que diz respeito à interação do DNA com as proteínas transcricionais (Babu *et al.*, 2006).

1.4. Nematóides

Os nematóides formadores de galhas do gênero *Meloidogyne spp.* são as principais pragas agrícolas de uma grande variedade de culturas. Esses nematóides são capazes de parasitar mais de 3000 espécies de plantas, sendo endoparasitas sedentários obrigatórios. O gênero compreende mais de 90 espécies descritas, as quais estão distribuídas em todo o mundo. Embora dezessete espécies tenham sido detectadas em café (*Coffea arabica* L.), *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne paranaensis* são consideradas as principais espécies formadoras de galhas em plantações de café no Brasil (Muniz *et al.*, 2008). Além dessas, as espécies *Meloidogyne coffeicola*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne hapla* são encontradas com menor frequência parasitando plantações de café em nosso país.

Entre as espécies mais prejudiciais ao cafeeiro está *M. exigua* que causa sérias perdas agronômicas devido a sua ampla distribuição na América Latina, sendo a espécie dominante no Brasil (Campos & Villain, 2005). Sua presença provoca enfraquecimento geral dos cafeeiros associados a uma perda de rendimento estimada em 45% (Barbosa *et al.*, 2004). Por outro lado, as espécies *M. paranaensis* e *M. incognita* são importantes devido à intensidade dos danos que causam no campo (Gonçalves *et al.*, 2004).

M. exigua provoca galhas arredondadas no sistema radicular, principalmente nas raízes recém-formadas, que são visíveis a olho nu. Na fase infecciosa juvenil (J2) de desenvolvimento, o nematóide entra na zona de alongamento da raiz, escava através do apoplasto até a ponta da raiz onde penetra no cilindro vascular, movendo-se para a zona de diferenciação da raiz. Em seguida, insere seu estilete no citoplasma da célula, induzindo a divisão nuclear sem citocinese, criando células gigantes multinucleadas que

alimentam o verme em desenvolvimento (Bellafiore *et al.*, 2008). Nas plantas infectadas observa-se uma redução do sistema radicular, principalmente porque os nematóides se alimentam mais próximos do xilema e floema, bloqueando parcialmente o transporte de água e nutrientes dentro da planta. Sintomas acima do solo incluem desfolha e clorose foliar que podem levar a planta à morte, resultando em um declínio significativo da produção (Abad *et al.*, 2003; Zambolim & Vale, 2003).

Em função disso, esse parasita é considerado o mais importante e problemático da cafeicultura, principalmente pela sua ampla distribuição na parte sul do continente americano.

1.5. A Biotecnologia e o Café

A obtenção de plantas geneticamente modificadas com genes de interesse agrônômico, tais como aqueles envolvidos na resistência a pragas ou doenças, vem ganhando cada vez mais espaço entre os cultivares convencionais. Mediante técnicas de engenharia genética, material genético advindo de outras espécies pode ser incorporado numa planta alvo de interesse. A principal implicação da transgenia é a quebra da barreira sexual entre diferentes espécies, permitindo a implantação de material genético exótico no hospedeiro. Atualmente é possível realizar transferências de DNA exógeno em plantas, de modo que o DNA inserido venha a ser expresso em um tecido particular e em uma fase específica do desenvolvimento.

As plantas geneticamente modificadas (PGMs), ou plantas transgênicas, vêm proporcionando uma revolução na agricultura, permitindo aos agricultores o cultivo de plantas com menor uso de inseticidas e herbicidas. Os dados mais recentes mostram que

em 2011 foram cultivados 160 milhões de hectares de lavouras transgênicas em 29 países, sendo os cinco maiores produtores mundiais os EUA, Brasil, Argentina, Índia e Canadá. As culturas com maior emprego de PGMs no mundo foram a soja, o milho, o algodão e a canola, No Brasil, em 2011, foram plantados 30,3 milhões hectares com sementes de soja, milho e algodão transgênicos. Com esse total, o Brasil foi capaz de consolidar a segunda posição mundial no ranking em área plantada com transgênicos, posição que ocupa desde 2009, ficando atrás somente dos Estados Unidos (CIB, 2013).

Ao longo dos anos, grupos de pesquisas nacionais e internacionais desenvolveram trabalhos visando à transformação genética de café. No Japão, por exemplo, um grupo pioneiro foi capaz de produzir um café modificado geneticamente que apresenta uma redução de até 70% no teor de cafeína nas folhas, sendo esse índice obtido graças ao silenciamento gênico de uma enzima da classe das *N*-methyltransferases (Ashihara *et al.*, 2006). Plantas de café transgênicas das espécies *C. canephora* e *C. arabica* capazes de expressar uma versão sintética do gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*, cujo produto tem ação inseticida, foram obtidas a fim de incrementar a resistência a uma importante praga do cafezal, o bicho-mineiro (Leroy *et al.*, 2000). No Brasil, plantas de *C. canephora* contendo o gene bacteriano *bar* apresentaram resistência ao herbicida glufosinato de amônio (Ribas *et al.*, 2006). Por outro lado, Barbosa e colaboradores (2010) introduziram em plantas de *C. arabica* um gene que codifica um inibidor de α -amilase sob controle de um promotor específico de sementes (derivado de uma fito-hemaglutinina), ambos advindos do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Essa transformação foi capaz de conferir resistência contra o inseto da broca do café (*Hypothenemus hampei*).

Para que os efeitos de tais processos biotecnológicos venham a ter um maior impacto sobre a cafeicultura e a agricultura em geral, diversas ferramentas moleculares

precisam ser disponibilizadas. Dentre as mais importantes podemos listar os promotores, e seqüências regulatórias relacionadas, que são imprescindíveis para que a expressão adequada do produto gênico aconteça. Os projetos de sequenciamento de genomas inteiros, como o do arroz, ou de cDNA, como no caso do banco de dados de seqüências expressas (EST) do café, constituem uma fonte importante de informações para a clonagem de regiões promotoras.

No caso do café, o Projeto Genoma Café Brasileiro, por iniciativa do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), com auxílio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Café) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), disponibilizou, a partir de 2003, aproximadamente 215.000 seqüências advindas de 37 bibliotecas de cDNA de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. Essas bibliotecas representam diferentes estádios do desenvolvimento de células e tecidos, sob diversas condições de estresse. Após análises de bioinformática foi possível obter um total de 130.792 seqüências para *C. arabica*, 12.381 para *C. canephora* e 10.566 para *C. racemosa*. O resultado final para o agrupamento dos ESTs foi de 17.982 contigs e 32.155 singletons, o que corresponde a 33.000 genes diferentes (Viera *et al.*, 2006). Destas seqüências, 22% não apresentam similaridade significativa com as seqüências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sendo correspondentes, portanto, a novos genes (Viera *et al.*, 2006).

Essa base de dados possibilita incrementar diversos projetos de cunho biotecnológico do cafeeiro já que viabiliza a identificação de genes com padrões de expressão específicos visando a posterior clonagem de suas seqüências regulatórias. Cabe ressaltar que sistemas de expressão eficientes baseados em promotores específicos, que possam aperfeiçoar a expressão dos transgenes nas células vegetais,

constituem o ponto chave para maximizar todas as aplicações biotecnológicas em plantas.

1.6. Promotores

Em organismos eucarióticos, uma região promotora central típica está localizada na região 5' da seqüência transcrita e consiste de elementos regulatórios necessários para o reconhecimento pela RNA polimerase dependente de DNA. Dentre os elementos regulatórios comumente encontrados nos promotores de genes eucariontes reconhecidos pela RNA polimerase de tipo II destaca-se a seqüência conservada (T/A)A(A/T), a qual é denominada TATA Box, localizada a aproximadamente 30 pares de bases (pb) do ponto de início da transcrição, e alguns outros elementos promotores proximais localizados a aproximadamente 100 (CCAAT Box) e 200 pb (GC Box) acima do ponto de início da transcrição (Griffiths *et al.*, 2000). Além das seqüências consensuais típicas citadas, os promotores apresentam diversas características físicas que estão diretamente relacionadas com o seu modo de ação.

A implementação da transgenia em plantas depende não só de sistemas eficientes de transformação, mas também da expressão dos transgenes nos níveis desejados, assim como em locais preestabelecidos no vegetal. Para a eficiência da expressão gênica visando alcançar um determinado fenótipo, a escolha do promotor é um ponto crucial, que afeta não só o nível, mas também o estágio, o tecido e a célula em que se dará essa expressão. Essa afirmação é válida não apenas para a transgenia como aplicação biotecnológica, mas também como uma abordagem eficaz para estudar a regulação da transcrição pelo monitoramento da atividade dos genes repórteres dirigida

por promotores específicos. A expressão de genes repórteres, tais como a luciferase (LUC), proteína verde fluorescente (GFP), e glucuronidase (GUS), tem sido utilizada com sucesso para compreender regulação transcricional em plantas (Karthikeyan *et al.*, 2002)

Alguns promotores conferem expressão constitutiva, enquanto outros permitem a expressão órgão/tecido-específica, ou tem sua expressão induzida pelo meio (Peremarti *et al.*, 2010). Os mecanismos que regulam a atividade de promotores capazes de conferir padrões de expressão específicos de um dado tecido ou controlados ao longo do desenvolvimento da planta 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.

Como exemplos de promotores de origem viral ou procariótica que têm sido empregados com relativo sucesso em plantas pode-se citar os promotores do gene da opina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens*, e o promotor de 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). O promotor 35S é freqüentemente empregado devido ao seu alto nível de expressão na maioria dos órgãos/tecidos, entretanto, com diferentes níveis de eficiência dependendo da espécie. Outros, como o promotor de Ubiquitina I do milho e a seqüência promotor/intron do arroz (Cornejo *et al.*, 1993), são exemplos de promotores derivados de eucariotos (Walden & Wingender, 1995).

Para o gênero *Coffea*, Marraccini e colaboradores (1999) isolaram a região promotora do gene *csp1* que codifica uma proteína de armazenamento de semente (globulina 11-S) de *C. arabica*. Análises da atividade GUS mostraram a expressão dirigida do gene repórter nas sementes de tabaco, mas não em outros órgãos/tecidos examinados. A atividade GUS também revelou que as construções contendo o promotor *csp1* apresentaram nível de expressão comparável a do promotor 35S do CaMV. Por

outro lado, a seqüência promotora do gene que codifica uma N-metiltransferase, enzima essencial na síntese de cafeína, foi isolado de *C. canephora*. Essa seqüência de 2,7 kb foi capaz de dirigir a expressão de um gene repórter em plantas transformadas de tabaco (Satyanarayana *et al.*, 2005). Posteriormente, demonstrou-se que essa seqüência promotora era capaz de dirigir a atividade do gene repórter sobre a superfície exterior do vacúolo em células de endosperma de café (Kumar *et al.*, 2007). Ainda em *C. canephora*, um potente promotor fruto-específico, de aproximadamente 1 kb, associado ao gene *CcDH2* foi isolado e caracterizado (Hinniger *et al.*, 2006).

Apesar do avanço considerável possibilitado pela transgenia nos últimos anos, um dos principais obstáculos ao seu emprego refere-se à aprovação e aceitação pelo consumidor do produto geneticamente modificado. Uma alternativa para minorar esse problema seria restringir a expressão dos transgenes em órgãos/tecidos apropriados, mas para tal, promotores específicos de determinados órgãos/tecidos teriam que ser empregados (Mishra & Slater, 2012).

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 de cereais ou em tubérculos de batata, 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.

Para minimizar os potenciais efeitos adversos dos transgenes bem como dos agentes de seleção empregados nas plantas geneticamente modificadas, é importante alcançar um nível apropriado de expressão gênica nas partes da planta onde os mecanismos de resistência e seleção são realmente necessários. Para aumentar a precisão do sistema de expressão, o número de promotores órgão/tecido-específicos precisa ser diversificado, e em especial para o cafeeiro.

Com o objetivo de se identificar promotores capazes de dirigir a expressão de genes em determinados órgãos/tecidos de café, o grupo de pesquisa coordenado pelo Professor Ivan de Godoy Maia iniciou um projeto para identificar e validar ESTs com expressão tecido-específica em *C. arabica*. Para tal, análises *in silico* foram realizadas junto ao banco de dados do Projeto Genoma Café Brasileiro, e dentre os ESTs selecionados, dois foram alvos de estudos mais aprofundados no presente trabalho:

A) O primeiro EST foi selecionado como apresentando expressão específica em folhas de café (Brandalise, 2007). A sequência desse EST quando submetida ao banco de dados do GenBank apresentou similaridade com proteínas pertencentes à classe das Isoflavonas Redutase-Like (IRL). As isoflavonas representam um importante fenilpropanóide envolvido em mecanismos de defesa em plantas leguminosas. O gene de café correspondente (denominado *CaIRL*) teve seu promotor clonado e analisado por Brandalise (2007). Em ensaios de expressão transiente em café, esse promotor, com cerca de 900 nucleotídeos (a partir do ponto inicial de transcrição), mostrou-se funcional e capaz de dirigir a expressão de um gene repórter apenas em folhas. Esta mesma versão, quando inserida em plantas de tabaco transgênico, mostrou-se responsiva ao estresse abiótico (dano mecânico). Adicionalmente, uma versão deletada do promotor *CaIRL* também foi obtida (~400 nucleotídeos) e posteriormente caracterizada (Severino, 2008). Em suma, verificou-se que o promotor do gene *CaIRL* é

induzido por estresses biótico e abiótico, e apresenta cinco repetições *in tandem* de uma sequência conservada (TAATTTCTGACCTTA) contendo o núcleo do elemento *cis*-regulatório W-box (TGAC) (Brandalise *et al.*, 2009). A funcionalidade deste elemento e sua importância na regulação do gene *CaIRL* foram investigadas no presente trabalho.

B) O segundo EST, codificando parcialmente uma peroxidase com expressão específica em raiz de café, foi selecionado a partir de uma biblioteca de raiz tratada com benzothiadiazole (acibenzolar-S-methyl) (BHT), um análogo do ácido salicílico (Brandalise, 2007). O produto codificado por este EST apresentou alta similaridade com peroxidases da classe III, sendo o gene correspondente denominado *CaPrx*. Além disso, sua expressão mostrou-se altamente induzida em tecido radicular infectado com nematóides, sugerindo que o mesmo esteja envolvido na resposta de defesa do café ao referido patógeno.

2. O gene *CaPrx*

2.1. As Peroxidases

Peroxidases de classe III (EC 1.11.1.7; Prx) são enzimas encontradas somente em plantas que catalisam reações de oxidorredução entre H_2O_2 e vários redutores (Henriksen *et al.*, 1998). A variabilidade existente entre as diferentes Prx, com sequências de aminoácidos e perfis de expressão tão diversos, sugere seu envolvimento em vários processos fisiológicos. Estudos demonstraram que as Prxs participam da lignificação (Ralph *et al.*, 2004), suberização (Bernards *et al.*, 2004) catabolismo de auxinas (Lagrimini *et al.*, 1997b), defesa contra patógenos (Chittoor *et al.*, 1997; Egea *et al.*, 2001), entre outras funções. As Prxs foram descritas como sendo induzidas pelo ataque de fungos (Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005), bactérias (Delannoy *et al.*, 2003; Saikia *et al.*, 2006), nematóides (Simonetti *et al.*, 2009) e vírus (Hiraga *et al.*, 2000).

As Prx especificamente induzidas por patógenos foram alocadas dentro de uma família de proteínas relacionadas à patogenicidade chamadas PR-9 (van Loon *et al.*, 1994). Genes *Prxs* são induzidos por patógenos tanto em plantas dicotiledôneas como o tabaco (Hiraga *et al.* 2000), como em monocotiledôneas como o arroz (Chittoor *et al.*, 1997; Rauyaree *et al.*, 2001).

Dentre os principais papéis desempenhados pelas Prxs na resposta de defesa da planta (Figura 1) pode-se destacar: 1) reforçar fisicamente a parede celular com lignina, suberina e outros polissacarídeos; 2) aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), servindo como mediadores e agentes antimicrobianos; e 3) aumentar a produção de fitoalexinas.

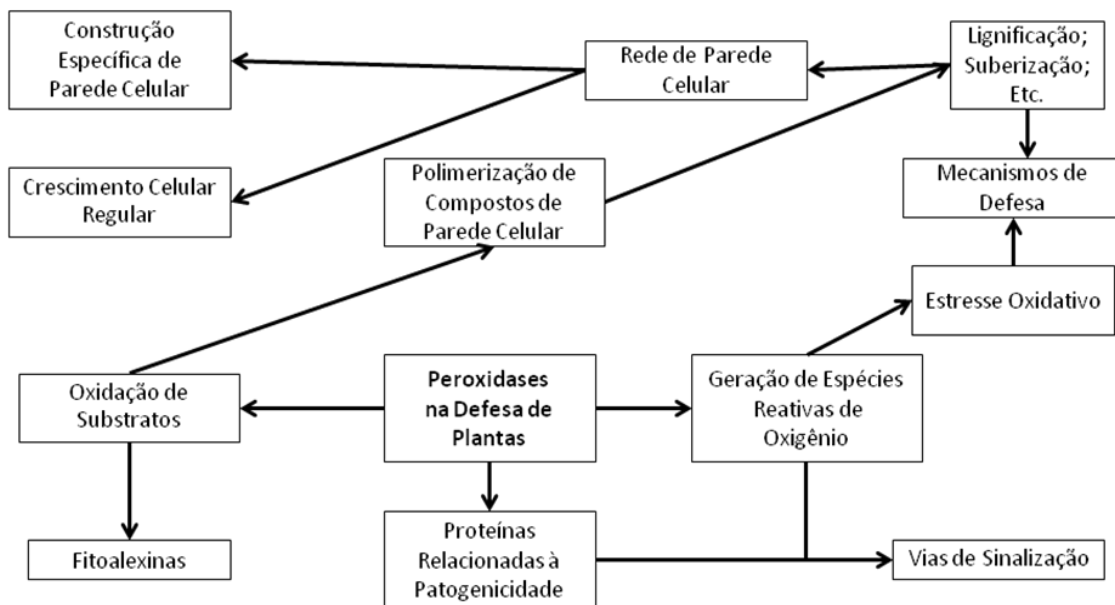


Figura 1 - Visão geral das funções específicas das peroxidases de classe III de plantas nas reações de defesa. Adaptado de Almagro e colaboradores, 2009.

Geralmente, múltiplas Prxs são induzidas por infecções por patógenos (Chittoor *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2005), sugerindo que cada Prx deva estar envolvida em um processo específico de defesa do hospedeiro. Neste contexto, como o gene *CaPrx*, alvo do presente trabalho, parece estar associado com a resposta do cafeeiro aos nematóides (Brandalise, 2007), nós buscamos entender como se processa a regulação de sua expressão em plantas de café infectadas.

A associação das Prxs com a resposta de defesa das plantas aos nematóides já foi evidenciada em outras espécies. Simonetti e colaboradores (2009), por exemplo, caracterizam e investigaram a expressão de 20 genes codificadores de peroxidases em duas espécies de trigo, uma resistente (*Aegilops ventricosa*) e outra susceptível (*Triticum aestivum*) ao nematóide *Heterodera avenae*. Estas foram classificadas em sete grupos diferentes de peroxidases secretadas através do apoplasto, sendo induzidas pelo ataque do nematóide em diferentes tempos e magnitudes.

Numa outra interação planta-nematóide (*Arabidopsis-Heterodera schachtii*) verificou-se que uma peroxidase de classe III desempenha um papel fundamental. A superexpressão da peroxidase 53 de *Arabidopsis* (AtPRX53) foi capaz de aumentar a resistência da planta ao nematóide, mas provocou alterações morfológicas importantes na planta, como encurtamento dos hipocótilos e desenvolvimento anormal das flores (Jin *et al.*, 2011). A sua região promotora respondeu de forma diferenciada às condições não-infectada e infectada: no primeiro caso, a expressão do gene repórter ocorreu principalmente nas raízes, hipocótilo e base do pistilo; no segundo caso, ficou concentrada nos locais de penetração e migração do parasita (Jin *et al.*, 2011).

Peroxidases da classe III já foram identificadas em análises proteômicas de culturas de células de uva (*Vitis vinifera*) tratadas com metil-jasmonato ou etileno em combinação com ácido salicílico e ciclodextrinas, indicando uma provável função nos mecanismos de defesa nesta espécie (Belchí-Navarro *et al.*, 2013).

Em café, até o momento, somente uma ascorbato peroxidase de classe I (APX) induzida por estresse de seca foi descrita por Pinheiro e colaboradores (2004). A APX faz parte do sistema antioxidante e a ativação da mesma em um clone de *C. canephora* resistente à seca estaria relacionada ao papel de defesa contra o dano oxidativo sob condições de falta de água.

Considerando o potencial do promotor do gene *CaPrx* em dirigir uma expressão raiz-específica e induzida em café e vislumbrando uma possível aplicação biotecnológica do mesmo, no artigo apresentado a seguir nós descrevemos a caracterização funcional deste gene e de sua região promotora. O gene *CaPrx* codifica uma peroxidase de classe III específica de raiz sendo induzido pela infecção por nematóides, perfil reproduzido pelo seu promotor em plantas transgênicas de tabaco.

2.2. *CaPrx*, a *Coffea arabica* gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection.



CaPrx, a *Coffea arabica* gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection[☆]

Fábio E. Severino^a, Marcos Brandalise^{a,b}, Carolina S. Costa^a, Sílvia R.S. Wilcken^c,
Mirian P. Maluf^{b,d}, Wallace Gonçalves^d, Ivan G. Maia^{a,*}

^a UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Botucatu, SP, Brazil

^b EMBRAPA Café, Brasília, DF, Brazil

^c UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, Departamento de Defesa Fitossanitária, Botucatu, SP, Brazil

^d Instituto Agronômico de Campinas, Centro de Café Alcides Carvalho, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2012

Received in revised form 18 April 2012

Accepted 21 April 2012

Available online 28 April 2012

Keywords:

Coffee

Promoter

Peroxidases

Nematode

Tissue-specificity

Gene expression

ABSTRACT

Class III peroxidases (Prxs) are enzymes involved in a multitude of physiological and stress-related processes in plants. Here, we report on the characterization of a putative peroxidase-encoding gene from *Coffea arabica* (*CaPrx*) that is expressed in early stages of root-knot nematode (RKN) infection. *CaPrx* showed enhanced expression in coffee roots inoculated with RKN (at 12 h post-inoculation), but no significant difference in expression was observed between susceptible and resistant plants. Assays using transgenic tobacco plants harboring a promoter- β -glucuronidase (GUS) fusion revealed that the *CaPrx* promoter was exclusively active in the galls induced by RKN. In cross sections of galls, GUS staining was predominantly localized in giant cells. Up-regulation of GUS expression in roots of transgenic plants following RKN inoculation was observed within 16 h. Moreover, no increase in GUS expression after treatment with jasmonic acid was detected. Altogether, these results point to a putative role of this peroxidase in the general coffee response to RKN infection.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Class III peroxidases (Prxs) are enzymes involved in a variety of physiological processes during plant growth and development, including cell-wall modifications, auxin catabolism, metabolism of reactive oxygen species (ROS) and defense against pathogens [1,2]. Due to two possible catalytic cycles, these enzymes are able to oxidize various substrates in the presence of hydrogen peroxide, thus reducing ROS levels, and to act as H₂O₂ producers [1]. Peroxidases are usually physically associated with the cell wall, the apoplastic space and the vacuole. Genes encoding Prx belong to a large multigenic family that comprises 73 and 138 described members in the model plant *Arabidopsis thaliana* and in rice (*Oryza sativa*), respectively [3,4]. However, most of these genes have no assigned physiological function *in vivo* [2].

Plant Prxs have been proposed to play important roles in many host–pathogen interactions [5], including those involving plant-parasitic nematodes. Peroxidase coding genes figure amongst the defense genes that are up-regulated during root-knot nematode (RKN) feeding site initiation [6]. In *A. thaliana*, a peroxidase gene was shown to be up-regulated in the early compatible interaction between the host and *Meloidogyne incognita*, and was suggested to be part of the general defense response against nematode infection [7]. In contrast, another Prx gene from *Arabidopsis* (*AtPrx27*) was reported to be repressed in galls at 14 and 21 days post-inoculation (dpi) [8], indicating that at least in *Arabidopsis*, Prx gene family members are differentially regulated by nematode infection.

In wheat, an increase in the transcript levels of three apoplastic Prx genes upon infection by the cyst nematode *Heterodera avenae* was demonstrated in both resistant (H-93-8 line) and susceptible (H-10-15 line) wheat genotypes [9]. Two of these genes showed enhanced expression in the resistant genotype, suggesting that they might act as constitutive components of wheat resistance against nematodes. The involvement of Prx genes in host basal defense against nematodes was also investigated in cotton [10]. In this case, one of the investigated genes (named *POD4*) was shown to be up-regulated in nematode-infected roots of susceptible and resistant plants, thus suggesting that *POD4* is not directly involved in the cotton resistance response.

[☆] The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank database and have been assigned the accession numbers JN705803 (*CaPrx* ORF) and JN705804 (*CaPrx* promoter).

* Corresponding author at: Instituto de Biociências, Departamento de Genética, UNESP, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil. Tel.: +55 14 38116229; fax: +55 14 38153744.

E-mail address: igmaia@ibb.unesp.br (I.G. Maia).

Among the Prx-dependent catalytic reactions that could account for plant defense, those implicated in ROS-mediated signal transduction leading to the activation of specific protective mechanisms such as hypersensitive reactions and cell death, and to the control of cell-wall plasticity are the most relevant [11]. In fact, the spatio-temporal differences in ROS accumulation have been considered mandatory to block nematode development during compatible and incompatible tomato–RKN interactions [12].

RKNs (*Meloidogyne* spp.) are important pathogens that infect a wild range of cultivated species, including coffee. These nematodes are sedentary endoparasites. Once in the soil, mobile second-stage juveniles (J2) penetrate host roots establishing a specialized feeding site comprised of giant-cells. In these feeding cells, juveniles develop and molt to form the adult females, which normally produce protruding egg masses on the root surface. Most cultivars of the main commercially cultivated coffee species, *Coffea arabica*, are susceptible to *Meloidogyne* spp. infestations, and control is extremely difficult. This highlights the importance of providing molecular tools for the acceleration of coffee biotechnology programs, especially those aiming at the production of nematode-resistant transgenic plants. In the present study, we describe the characterization of a gene encoding a putative class III peroxidase from *C. arabica* (named CaPrx) that is specifically expressed in roots and responsive to RKN infection. We also report the cloning of its 5'-flanking region and the effects of nematode infection and hormone treatment on promoter activity in transgenic tobacco plants. We anticipate that the isolated promoter can be used to direct root-specific and inducible transgene expression in plants.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Freshly harvested coffee organs/tissues for biological validation were obtained from *C. arabica* cv. Mundo Novo exactly as described [13,14], except for leaf-miner infested leaves that were collected at field conditions at Botucatu, Sao Paulo, Brazil. For nematode infection assays, susceptible (*C. arabica* Catuaí IAC62) and resistant (*Coffea canephora* cv. Robusta) coffee seedlings grown at greenhouse conditions were used. The resistant genotype is part of a breeding population segregating for nematode resistance. Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* SR1) grown in a growth chamber at 22–24 °C under a 16h/8h light/dark cycle were used for *Agrobacterium*-mediated stable transformation. All harvested fresh tissue samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at –80 °C until used.

2.2. RNA extraction and reverse transcription (RT)

Samples of total RNA from different organs/tissues of *C. arabica*, with or without stress, and from transgenic tobacco seedlings and roots were extracted using TRIzol™ (Invitrogen) reagent according to the manufacturer's recommendations. Contaminating DNA was removed by treatment with RNase-free DNase I (Fermentas). RNA was examined for integrity by denaturing gel electrophoresis and its concentration determined in a UV spectrophotometer. The samples were stored at –80 °C until used.

Equal quantities of total RNA (1 µg) were reverse transcribed at 50 °C using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and 2.5 µM Oligo-dT17VN, according to the manufacturer's recommendations. A similar reaction without reverse transcriptase was also performed as control to confirm the absence of genomic DNA in subsequent steps. All cDNA samples were analyzed on a NanoDrop™ ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) for quantification.

2.3. Biological validation, cloning and sequencing of the entire CaPrx cDNA

The starting expressed sequence tag (EST) used to clone the full-length CaPrx cDNA was retrieved during a screening of the Brazilian coffee EST database (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) for genes showing organ/tissue-specific expression [13]. The root-specific expression of CaPrx was validated by PCR using a panel of cDNA samples representing different coffee organs/tissues [fruits at different stages of ripening, healthy and leaf-miner (*Leucoptera coffeella*) infested leaves, healthy and *Meloidogyne paranaensis*-infested roots, pool of flowers and flower buds, and stems] and a primer pair designed based on the selected EST sequence (VaPrxF 5'-CTCTCGAATGGAAAAGGCTTA-3' and VaPrxR 5'-AATCGTGTGCCCTCTGATA-3'). A primer pair designed for the amplification of a coffee *actin* gene (AcF 5'-GACCTCACAGATCACCTCAT-3' and AcR 5'-GTAGTCTCGTGATACACG-3') was used as internal amplification control. PCR amplification was performed with initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 52 °C for 40 s, and extension at 72 °C for 1 min.

To obtain the full-length cDNA of CaPrx, a 3'-RACE technology was performed using the 3'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). The gene-specific primers (GSPs) for 3'-RACE were designed based on the validated EST clone, and were as follows: 3GSP1 (5'-CAGTTCTATCAGGAGGGCACACG-3') and 3GSP2 (5'-GGATATCTCATTGCATTGGCG-3'). Amplified fragments were cloned into pGEM-Teasy vector (Promega) and sequenced using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in automatic sequencer ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) and subsequently analyzed using the ChromasPro™ software version 1.5.

2.4. Promoter cloning, construction of the expression cassette, and tobacco transformation

The CaPrx promoter was isolated using the GenomeWalker Universal Kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. For this, two gene-specific primers [PeroGSP1 (5'-TAGGACCGAACCATCACATCCCCGAAC-3') and PeroGSP2 (5'-GCCATTGTTTTGCTACGAACCAATC-3')] were designed based on the 5'-sequence of the validated EST clone. The resulting genome walking (GW) amplification product (2097 bp), which included the upstream region of CaPrx extended from its start codon, was cloned into the pGEM-Teasy and sequenced. The presence of putative *cis*-elements within the amplified fragment was analyzed using the PLACE [15] and PlantCARE [16] databases.

To generate the expression cassette containing the *uidA* reporter gene, which codes for β-glucuronidase (GUS), under the control of the putative promoter region of CaPrx, the cloned GW product was amplified in a *Pfu* DNA polymerase-based PCR using forward and reverse primers containing overhanging *Hind*III (5'-CTTAAGCTTGCTGGTCTAGAAAGTAAAC-3') and *Nco*I (5'-CTAGCCATGGCAGTTGAAGAAAGATAAGAG-3') recognition sites (underlined), respectively. The PCR product was then digested using *Hind*III and *Nco*I and subcloned into an equally digested promoter-less pCAMBIA-1381z (CAMBIA). The recombinant plasmid was sequenced and introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 to transform tobacco leaf discs essentially as described [17]. Putative transformants (a total of 20) were selected in MS medium supplemented with hygromycin (50 µg/ml). The integration of the expression cassette into the plant genome was confirmed by PCR using the two primers directed against the CaPrx promoter described above. Only selfed T1 progenies were used in subsequent assays.

2.5. Biotic stress assays and hormone treatment

For nematode inoculation, equally aged coffee seedlings with 3 leaf pairs, of susceptible *C. arabica* cv. Catuaí (IAC62) and resistant *C. canephora* cv. Robusta, were inoculated with the coffee root-knot nematode *M. paranaensis*, a widely distributed species in Brazil and extremely harmful to coffee. For this, 1200 freshly hatched second-stage juveniles of *M. paranaensis* in 1 ml of water were added to the pots containing the individual seedlings. The experiment was set in triplicates, and 3 seedlings were sampled for each infection time (12, 168, 336 and 504 hpi), with a total of 36 inoculated seedlings of each genotype. These time-points represent the very early (*i.e.* root penetration; 12 hpi) and late stages of nematode parasitism (168, 336 and 504 hpi), which include migration and feeding-site establishment (168 hpi; 7 days), reproduction (336 hpi; 14 days) and re-infection and formation of galls (504 hpi; 21 days). Since there is no histological analysis of the *M. paranaensis* – coffee root interaction, these time-points were determined based on the information available for other root-knot nematode species, namely *Meloidogyne exigua* and *M. incognita* [18,19]. Moreover, previous unpublished observations of the life-cycle of *M. paranaensis* in coffee infected roots helped us to establish those time-points. To reduce plant-to-plant variation, the roots from the 3 sampled seedlings per time point were pooled before RNA extraction. Non-inoculated roots were used as controls (time zero). Additional inoculated plants were maintained in the greenhouse at controlled conditions to confirm nematode infection.

The same procedure was used to inoculate transgenic tobacco plants harboring the *CaPrx* promoter, but in this case a *Meloidogyne javanica* inoculum was used. Twenty individual tobacco plants (two months old), each one representing different biological replicates, were employed. Root samples from 4 individually inoculated plants were collected at each time point (8, 16, and 24 hpi) and, to reduce plant-to-plant variation, pooled before RNA extraction. Non-inoculated roots were used as controls (time zero). For the hormone assays, transgenic tobacco seeds were germinated in Petri dishes containing MS medium supplemented with hygromycin (50 µg/ml). After 15 days, the seedlings were transferred to MS plates containing 100 µM jasmonic acid (Sigma) [20]. Approximately 20 seedlings were sampled at each time point (0, 8, 16, and 24 h). In both assays, three independent transgenic lines were used but only a representative result is shown.

2.6. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Relative transcript levels were assessed by real-time PCR using an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, USA) essentially as described [13]. In all reactions using coffee samples, *CaGAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) [14] was used as housekeeping gene to normalize levels of *CaPrx* transcripts. The primers used for *CaPrx* and *CaGAPDH* amplification were as follows: *CaPrx*-F (5'-GGCATTAGTTGCCGTGATG-3'); *CaPrx*-R (5'-TGCCATGATGGTCCCTAATC-3'); *CaGAPDH*-F (5'-TTGAAGGGCGGTGCAA-3') and *CaGAPDH*-R (5'-AACATGGGTGCATCCTTGTCT-3').

To determine the level of GUS expression in seedlings and roots of transgenic tobacco lines harboring the *CaPrx* promoter, the following primer pair was used: GUS-F (5'-TTGCCAACGAACCGATAC-3') and GUS-R (5'-GCCAGTGGCGGAAATATT-3'). In this case, however, the tobacco 18S rRNA gene was used for normalization (primers 18S-F 5'-AGGAATTGACGGAAGGGCA-3' and 18S-R 5'-GTGGCGCCAGAACATCTAAG-3'). A tobacco gene encoding a trypsin proteinase inhibitor (TPI), known to be responsive to jasmonate [21], was used as positive control in the hormonal assays (primers TPI-F 5'-TCAGGAGATAGTAAATATGGCTGTTC-3' and TPI-R 5'-ATCTGCATGTCCACATGCTTA-3').

2.7. Data analysis

Cycle threshold (*Ct*) values were determined for both *CaPrx* and *CaGAPDH* for each sample, and relative quantification of *CaPrx* transcript was determined using the comparative CT method ($\Delta\Delta Ct$) as described [22]. Amplification efficiencies were derived from the amplification plots using the program LinRegPCR [23]. A value of two was used in calculations. The same procedure was applied for relative quantification of GUS and TPI expression in transgenic tobacco roots and seedlings.

2.8. Histochemical analysis

Histochemical localization of GUS activity was performed at 7, 14 and 21 days after RKN-inoculation by incubating inoculated roots of transgenic tobacco plants with X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) as described [24]. Healthy roots were used as controls. Sections (20 µm) of root gall samples assayed histochemically for GUS activity were cut with a microtome. For this, tissues were fixed in 50% ethanol, 100% glacial acetic acid and 37% formaldehyde for 24 h. The samples were dehydrated according to the following steps: 70% ethanol for 2 h, 90% ethanol for 2 h and 100% ethanol for 2 h, liquid resin (1:1) for 2 h and activated resin for 24 h. For inclusion, 1.6 ml of resin and 100 µl of hardener were used.

2.9. Molecular phylogenetic and protein analyses

Phylogenetic analyses were performed with the Phylogeny.fr platform (<http://www.phylogeny.fr/>) [25] using the default parameters. The aa sequences of Prx used for tree construction were retrieved from the PeroxiBase database (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>) [26] and were as follows (name and entry ID are according to PeroxiBase): AtPrx27 (ID120) from *A. thaliana*; EgraPrx39 (8043) from *Eucalyptus grandis*; LePrx46 (644) and LePrx04 (599) from *Lycopersicon esculentum*; LsePrx45 (3902) from *Lactuca serriola*; LvPrx45 (3903) from *Lactuca virosa*; NtPrx62b (8294) from *N. tabacum*; PgPrx01 (2143) from *Picea glauca*; PtaPrx09 (2043) from *Pinus taeda*; PtPrx77 (3172) from *Populus trichocarpa*; StPrx08 (1911) from *Solanum tuberosum*; VvPrx30 (5113), VvPrx31 (5114) and VvPrx61 (6630) from *Vitis vinifera*. Further analyses of the *CaPrx* sequence were carried out using Prosite (<http://prosite.expasy.org/>).

3. Results

3.1. Identification of the starting EST and validation of its expression in coffee

The expressed sequence tag (EST) coding for *CaPrx* was retrieved during a screening of the Brazilian coffee EST database for genes showing organ/tissue-specific expression [13]. According to our digital expression profiling, the corresponding EST singleton was exclusively found in a library (NS1) made from RNA extracted from roots of Mundo Novo and Catuaí cultivars infected with *M. paranaensis* [27]. The predicted root-specific expression of *CaPrx* was validated in a set of different coffee organs/tissues using qualitative RT-PCR. As shown in Fig. 1, *CaPrx* was specifically expressed in coffee roots, especially those infected with *M. paranaensis* at different time-points post-inoculation (pi), as compared to the ubiquitous expression of a reference housekeeping gene (actin; bottom gels). Compared to healthy control roots (lane 8), *CaPrx* expression was positively affected by nematode inoculation (lanes 9, 10 and 11). These results corroborate the root-specific expression predicted during the *in silico* analysis, and suggest that *CaPrx* expression is induced by nematode inoculation.

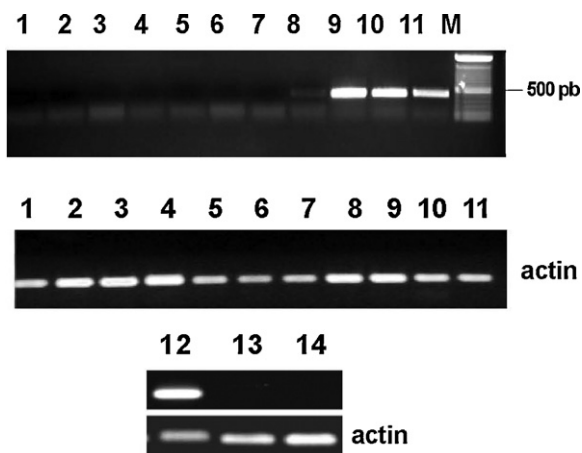


Fig. 1. Expression analysis of *CaPrx* in different coffee organs/tissues using qualitative RT-PCR. Upper gels – products generated using *CaPrx* specific primers. Bottom gels – products generated using primers directed against the coffee *actin* gene, employed as endogenous control. Lanes 1–3 – immature coffee fruits (early green, green and green-yellow); 4 and 5 – ripening coffee fruits (yellow and red); 6 – healthy leaves; 7 – leaves infested with coffee leaf miner; 8 – healthy roots; 9–11 – roots inoculated with *M. paranaensis* and sampled at 24, 72 and 240 hpi; M – DNA marker; 12 – same as in lane 9; 13 – floral organs; 14 – stems. Amplified products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide and visualized by UV transillumination.

To define more precisely the expression profile of *CaPrx* in response to *M. paranaensis* inoculation, a time-course analysis of the infection process in resistant and susceptible coffee plants was performed using RT-qPCR. In susceptible plants (*C. arabica* Catuaí), *CaPrx* expression peaked at 12 hpi (approximately 2.8-fold increase), when early root penetration occurs, and the J2 migrate through the apical meristem. Thereafter, *CaPrx* expression decreased to remain almost constant at 7, 14 and 21 dpi (Fig. 2), when parasitism is already established *i.e.* the feeding-site was initiated with the formation of giant-cells, followed by a significant increase in the metabolic activity of these cells. A similar pattern of expression was observed in resistant plants (*C. arabica* Robusta), but

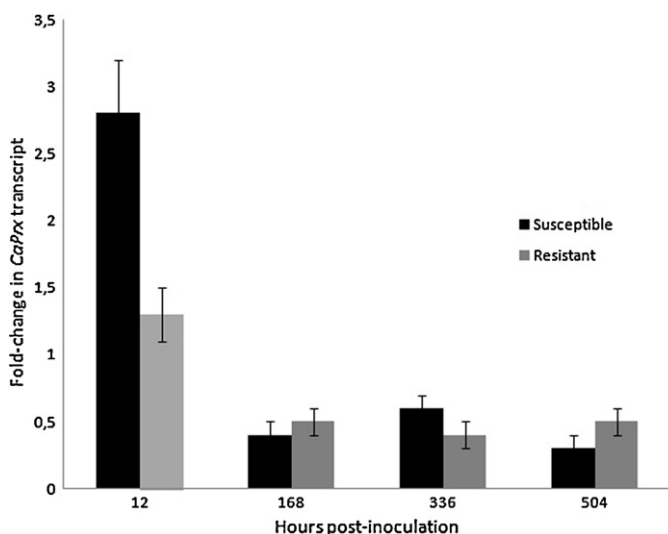


Fig. 2. Expression analysis of *CaPrx* in roots of resistant (*C. arabica* Robusta) and susceptible (*C. arabica* Catuaí) coffee seedlings inoculated with *M. paranaensis*. The fold-change in *CaPrx* transcript accumulation at different time points was determined by RT-qPCR. Transcript levels were normalized to the expression of a coffee *GAPDH* gene and changes in expression were computed based on *CaPrx* expression at time zero (uninoculated root). Each time point represents average data with standard errors from three biological replicates.

with a ~1.3-fold increase at 12 hpi (Fig. 2). Thus, at this specific time point, *CaPrx* transcripts were more abundant in the susceptible than in the resistant plants, indicating that *CaPrx* is probably part of the general plant response to nematode infection. The results obtained also indicate that *CaPrx* transcripts accumulate rapidly after RKN inoculation (12 hpi), and decline thereafter toward almost basal levels.

3.2. Isolation of the full-length cDNA and phylogenetic analysis

The starting EST clone was found to contain a ~0.8 kb insert that covered the 5'-untranslated region (UTR) and a great part of the *CaPrx* open reading frame, with the exception of its 3' end. To obtain the full-length cDNA of *CaPrx*, the missing 3' part of the coding region (including the 3'UTR) was recovered by 3'-RACE PCR using two gene-specific primers designed based on the sequence of the starting EST clone. Three different clones of the amplified 3'-RACE product were sequenced and found to be identical to each other. The nucleotide sequence of the RACE product overlapped that of the original EST clone and both were assembled into a complete cDNA. The resulting full-length sequence contained a single open reading frame of 915 nt encoding a predicted polypeptide of 304 amino acid (aa) residues with an estimated size of 33.5 kDa and a theoretical isoelectric point of 9.31. Closer inspection of the deduced aa sequence of *CaPrx* using Prosite revealed the presence of several conserved residues typically found in class III peroxidases, including the peroxidase-proximal heme-ligand signature (DLAVLSGGHTI) and the peroxidase-active site signature (APLL-RMHFDC) (not shown). The presence of a signal peptide at the protein N-terminus was also predicted.

BLASTp analysis of the *CaPrx* sequence in the PeroxiBase database revealed, as expected, significant overall similarity to different members of the class III superfamily of plant peroxidases. The closest homologues were VvPrx30 and VvPrx31 from *V. vinifera* (69% and 68% aa identity, respectively) followed by EgraPrx39 from *E. grandis* (66% aa identity). To further investigate the phylogenetic relationships between *CaPrx* and other closely related plant peroxidases, a phylogenetic analysis was performed using Phylogeny.fr. In the resulting unrooted tree (Fig. 3), *CaPrx* was placed in an intermediate position between two observed clusters, the first one including peroxidases from different Solanaceae species, and the second including peroxidases from two *Lactuca* species. Interestingly, among the genes with higher similarity to *CaPrx* retrieved in PeroxiBase, three of them (*LePrx46*, *LePrx04* and *StPrx08*) are predicted to be expressed in roots [26].

A non-exhaustive BLAST search on the Brazilian coffee EST database using the *CaPrx* deduced amino acid sequence as query yielded 21 contigs and 14 singletons. From those, 19 contigs and 10 singletons were classified as being putative class III peroxidases using the PeroxiBase database. The remaining sequences (2 contigs and 4 singletons) could not be included in class III and probably belong to other classes of plant peroxidases. Corroborating this result, in the study of Mondego et al. [28] the peroxidase family figured among the twenty most prevalent *Coffea* spp. gene families, with 41 associated EST-contigs.

3.3. The *CaPrx* promoter drives a root-specific and RKN-inducible GUS expression in transgenic tobacco

To gain further insights into the spatio-temporal expression of *CaPrx*, transgenic tobacco plants harboring a *CaPrx* promoter:GUS expression cassette were generated. For that, the 5'-flanking region of the *CaPrx* gene was cloned using a PCR-based GW technique and two gene-specific oligonucleotides designed based on the 5'-end of the validated EST clone. The amplified fragment (~2.0 kb) was cloned into the pGEMT-easy vector and its complete nucleotide

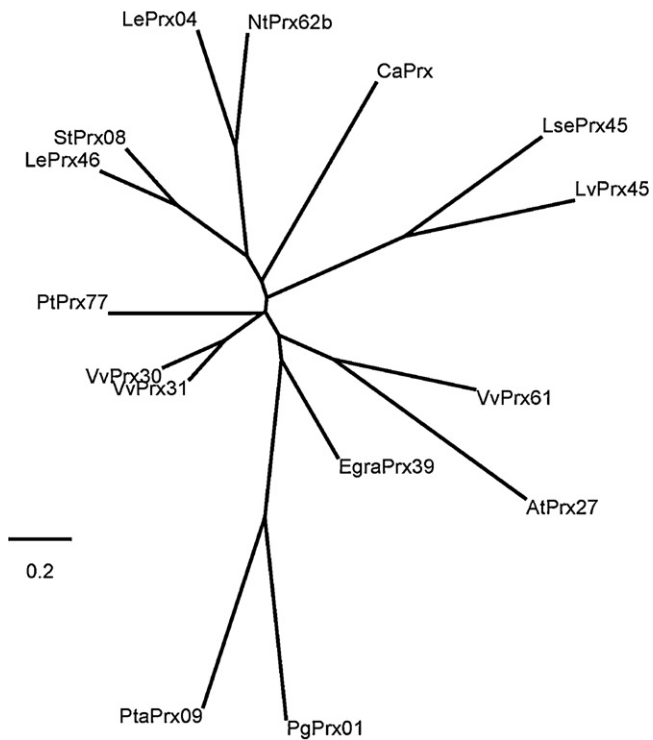


Fig. 3. Unrooted phylogenetic tree showing the relationship between *CaPrx* and other plant *Prxs*. The tree was constructed using the Phylogeny.fr platform and graphically illustrated using Drawtree. All aa sequences were retrieved in PeroxiBase. The scale bar indicates 0.2 substitutions per site.

sequence determined. Three different clones of the amplified GW product were sequenced and found to be identical to each other. This result is not surprising once *C. arabica* has reduced genetic variability, and although being an allotetraploid species exhibits a double-diploid behavior [29]. Moreover, no obvious homology to any other known sequence was observed when this putative promoter sequence was blasted against the Brazilian coffee EST and GenBank databases, thus confirming that the amplified genomic region corresponds to an as yet unidentified portion of the coffee genome. The relationship between the starting coffee EST and the fragment amplified by GW was further confirmed by PCR using genomic DNA and primers targeting both sequences (not shown).

The generated transgenic tobacco plants were first used to investigate whether the expression pattern of the GUS reporter gene driven by the *CaPrx* promoter would parallel the expression pattern of the endogenous gene under nematode infection. Considering the early expression profile of *CaPrx* in coffee roots (Fig. 2), the time course of GUS expression in transgenic roots upon nematode inoculation was monitored from 8 to 24 hpi. This analysis was carried out using 3 independent transgenic lines. In all lines, GUS expression gradually increased 8 h after inoculation, peaked at 16 h (~7.5-fold increase), and dropped at 24 h (Fig. 4A). Although peaking at almost the same time post inoculation, the induction detected in tobacco roots (at 16 hpi) was higher than the one detected in inoculated coffee roots (at 12 hpi). It is noteworthy that the observed pattern of promoter activity was consistent with the early expression timing of *CaPrx* in inoculated coffee roots.

Histochemical localization of GUS activity in the inoculated roots of the aforementioned assay revealed restricted staining in nematode-induced root galls. GUS staining started to be clearly detected at 7 dpi and was more pronounced at 14 dpi in all tested lines (Fig. 4; panels B.I and B.II). The observed divergence between the early detection of GUS transcripts by RT-qPCR (Fig. 4A) and relatively late *in situ* detection of GUS activity most likely reflects the

sensitivity of the assays used. Close inspection using cross-sections of these galls revealed predominant GUS expression within the giant-cells (Fig. 4; panels B.III and B.IV). On the other hand, no staining was observed in non-infected transgenic roots (not shown).

3.4. The *CaPrx* promoter is not responsive to jasmonic acid

To learn more about the possible regulation of *CaPrx*, searches for putative regulatory elements within the amplified 5'-upstream region were performed. These analyses allowed the identification of different stress-related elements, such as two TC-rich repeats and a salicylic acid responsive element (TCA-element), as well as other plant hormone-responsive elements such as an auxin responsive element (TGA-element) and a G-box-like motif reported to be present in the promoter region of genes regulated by methyl jasmonate (MeJA) [30] (listed in Table 1). The existence of the putative nodulin consensus motifs, CTCTT and AAAGAT, originally identified as part of an organ-specific element activated in infected cells of root nodules [31] was also detected, but with a non-canonical arrangement. In addition, eight ATATT elements previously defined as been able to confer root-specific expression [32] were found (Table 1).

Considering that jasmonate is reported to play a major role during the activation of defense-related genes, and that the promoter of a *Prx* gene from rice has been previously shown to be activated by MeJA [33], we decided to investigate whether the *CaPrx* promoter was responsive to jasmonate. For this, seedlings of transgenic tobacco plants harboring the *CaPrx* promoter-GUS fusion were submitted to jasmonic acid (JA) treatment and GUS transcript levels were measured by RT-qPCR at different time points. As shown in Fig. 5, no clear increment in GUS expression was observed following treatment with JA as compared to the untreated control. In contrast, the expression of a gene encoding a TPI, known to be responsive to MeJA [21], was highly up-regulated at 24 h. These results indicate that *CaPrx* expression is not elicited by JA.

4. Discussion

Prxs have been implicated in several physiological processes, including those mediating important biotic and abiotic stress responses [5]. It is proposed that these enzymes take part in the general defense response that is triggered during biotic stress stimuli. Although probably acting through different mechanisms [5], current evidence suggest that apoplastic peroxidases, in conjunction with NADPH oxidases, might play an essential role in the oxidative burst generated in response to pathogen attack [34]. Peroxidases might also be involved in the reinforcement of the cell-wall, thus contributing to the fortification of the plant root upon nematode infection [7].

In this study we report the identification of a putative basic peroxidase-encoding gene (*CaPrx*) that is specifically expressed in *C. arabica* roots and is responsive to RKN infection. *CaPrx* showed enhanced transcript accumulation upon nematode inoculation in susceptible coffee plants. Promoter analyses in transgenic tobacco plants confirmed the observed inducibility of *CaPrx* expression upon RKN inoculation. Moreover, the cloned 5'-flanking fragment (~2.0 kb) of *CaPrx* was found to be sufficient to confer root-specific expression that was exclusively active in the galls induced by *M. javanica*. Taken together, our results show that *CaPrx* expression is rapidly activated upon nematode infection and are consistent with a putative role of this peroxidase in the general coffee response to RKN infection.

CaPrx is rapidly induced after inoculation, showing an expression timing that is consistent with the one determined for a nematode responsive *Prx* gene from tomato (12 hpi) [6], but is in

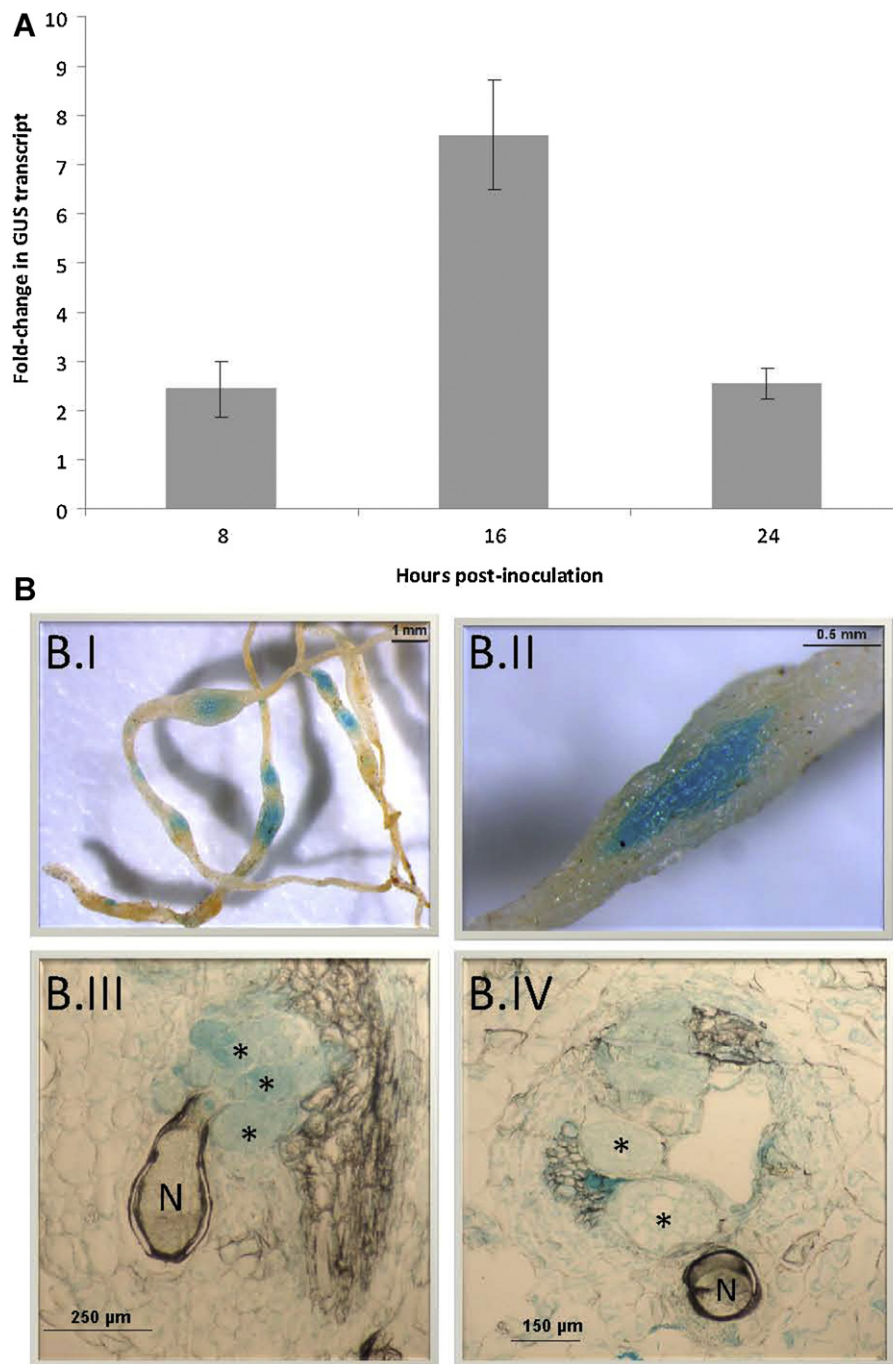


Fig. 4. Expression of GUS reporter gene in transgenic tobacco roots upon infection with *Meloidogyne javanica*. (A) Fold-change in GUS transcript accumulation in RKN-inoculated roots as determined by RT-qPCR. Transcript levels were normalized to the expression of an *18S rRNA* gene, and changes in expression were computed based on the expression of GUS at time zero (uninoculated root). Each time point represents average data with standard errors from three technical replicates. (B.I) and (B.II) Histochemical assay for GUS activity in inoculated roots of a representative transgenic line at 14 dpi. The roots of at least 4 individual plants were examined and typical results are presented. Longitudinal (B.III) and transverse (B.IV) sections of infected roots showing predominant GUS staining in giant cells. N indicates the nematode and asterisk indicates the giant cells.

contrast to findings in *Arabidopsis*, where an RKN-elicited induction of a *Prx* gene starts to be detected 72 hpi [7]. According to Schaff et al. [35], significant changes in gene expression in RKN-infected tomato roots occur by 12 hpi, at a time prior to the appearance of recognizable giant cells; in this study, the vast majority of the genes (a total of 217) modulated by RKN-infection in a susceptible interaction were significantly differentially expressed (compared to uninfected controls) between 12 and 36 hpi. Interestingly, one such RKN-modulated gene encoded a peroxidase that was induced at 12 hpi and down-regulated thereafter. It is also

noteworthy that the time-dependent increases in *Prx* transcript levels described coincide with the peak of enzymatic generation of ROS (at 12 hpi) observed in a compatible tomato–nematode interaction [12]. These results are in agreement with our findings and together point to a primary role of peroxidases during early events of nematode infestation, probably acting in ROS generation.

Several *cis*-acting elements were identified along the cloned promoter region of *CaPrx*. Among them, the presence of two elements (AAAGAT and CTCTT) known to be involved in the

Table 1
Putative *cis*-regulatory elements found in the *CaPrx* promoter sequence.

Name	Sequence	Position (Strand) ^a	Description
TC-rich like repeat	ATTTTTTCA	–287 (+) –862 (+)	Defense and stress-response
TCA-like element	CCATCTCTTT	–827 (–)	Salicylic acid-responsiveness
TGA-element	AACGAC	–432 (–)	Auxin-responsive element
G-BOX	CACGTA	–1392 (–)	MeJA-responsiveness
CTCTT-motif	CTCTT	–22 (+) –28 (+) –826 (–) –942 (–) –1184 (+) –1249 (–)	Nodulin consensus motif; part of an organ-specific element (OSE)
AAAGAT-motif	AAAGAT	–34 (–) –1700 (+) –1020 (+) –1034 (+) –1061 (+) –1568 (+) –1681 (+) –1760 (+) –1916 (+) –1976 (+)	Nodulin consensus motif; part of an OSE
Root-motif	ATATT		Root-specific element

^a Numbers represent the locations of the regulatory elements relative to the ATG start codon (A + 1).

activation of gene expression in infected cells of root nodules merits a comment. These motifs were described as taking part in an organ-specific element identified in the promoter of a soybean leghaemoglobin gene (*lbc3*) [31], and were shown to be responsible for controlling root nodule-specific gene expression [36]. An interplay of common regulatory pathways during nodule development and gall formation has been suggested based on the activation of an

early nodule-specific gene (*ENOD40*) and a cell cycle gene (*CCS52a*) in response to RKN [37,38]. Furthermore, the CTCTT element was shown to be functionally associated with the root-specific expression of a sunflower gene [39]. Although these observations lend support to a possible involvement of both elements in the regulation of *CaPrx* expression in galls, their significance and functionality should be verified.

The activation of *Prx* promoters by stresses has been previously noted in rice [33]. In this case, however, the promoters investigated were shown to be responsive to both biotic and abiotic stresses (fungus-infection and wounding) and promoter-driven expression was not limited to an infected organ as observed for the *CaPrx* promoter. One of these promoters was also activated in response to MeJA, which is not the case for the *CaPrx* promoter, despite the presence of a reported MeJA-responsive G-box [30] in its sequence. The fact that the *CaPrx* promoter was active in a heterologous tobacco system suggests the existence of a general regulatory mechanism and opens the possibility for its application in plant biotechnology. Promoters capable of mediating root-specific and nematode-inducible expression of transgenes are of particular interest, especially for the control of soil borne pathogens.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP (Processo 09/54361-9) and CNPq. FES is a recipient of a PhD fellowship from CNPq. We especially thank Dr. Anne-Lise Haenni for her careful and critical reading of the manuscript.

References

- [1] F. Passardi, C. Cosio, C. Penel, C. Dunand, Peroxidases have more functions than a Swiss army knife, *Plant Cell Reports* 24 (2005) 255–265.
- [2] C. Cosio, C. Dunand, Specific functions of individual class III peroxidase genes, *Journal of Experimental Botany* 60 (2009) 391–408.
- [3] M. Tognolli, C. Penel, H. Greppin, P. Simon, Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Gene* 288 (2002) 129–138.
- [4] F. Passardi, D. Longet, C. Penel, C. Dunand, The class III peroxidase multi-genic family in rice and its evolution in land plants, *Phytochemistry* 65 (2004) 1879–1893.
- [5] L. Almagro, L.V. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barceló, M.A. Pedreño, Class III peroxidases in plant defence reactions, *Journal of Experimental Botany* 60 (2009) 377–390.

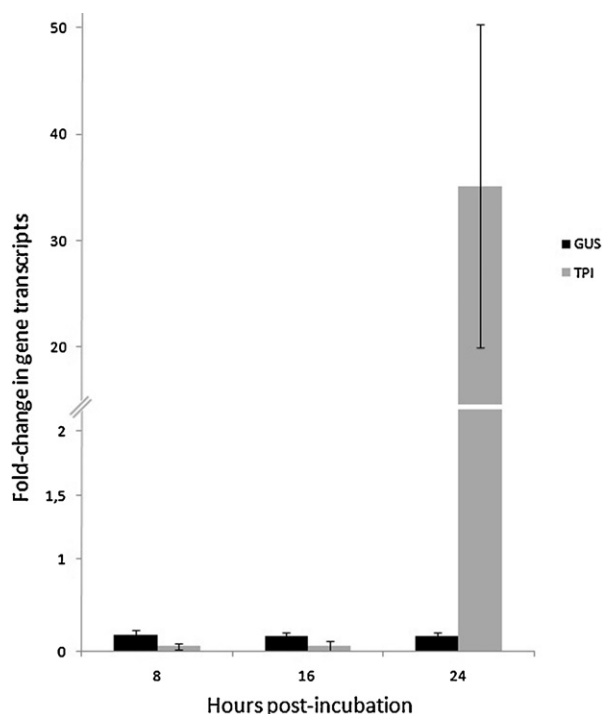


Fig. 5. GUS expression in transgenic tobacco roots treated with JA. Seedlings of a representative transgenic line were submitted to JA and GUS expression was measured at different time points (8, 16 and 24 h post-treatment) using RT-qPCR. Transcript levels were normalized to the expression of an *18S rRNA* gene, and changes in expression were computed based on the expression of GUS at time zero (untreated control). An endogenous gene (*TPI*) known to be responsive to MeJA was used as control. Each time point represents average data with standard errors from three technical replicates.

- [6] G. Gheysen, C. Fenoll, Gene expression in nematode feeding sites, *Annual Review of Phytopathology* 40 (2002) 191–219.
- [7] I. Vercauteren, E. Van Der Schueren, M. Van Montagu, G. Gheysen, *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes, *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14 (2001) 288–299.
- [8] F. Jammes, P. Lecomte, J. de Almeida-Engler, F. Bitton, M.L. Martin-Magniette, J.P. Renou, P. Abad, B. Favery, Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 44 (2005) 447–458.
- [9] E. Simonetti, P. Veronico, M.T. Melillo, A. Delibes, M.F. Andrés, I. López-Braña, Analysis of class III peroxidase genes expressed in roots of resistant and susceptible wheat lines infected by *Heterodera avenae*, *Molecular Plant–Microbe Interactions* 22 (2009) 1081–1092.
- [10] M.J. Wubben, F.E. Callahan, R.W. Hayes, J.N. Jenkins, Molecular characterization and temporal expression analyses indicate that the MIC (Meloidogyne Induced Cotton) gene family represents a novel group of root-specific defense-related genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Planta* 228 (2008) 111–123.
- [11] T. Kawano, Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction, *Plant Cell Reports* 21 (2003) 829–837.
- [12] M.T. Melillo, P. Leonetti, M. Bongiovanni, P. Castagnone-Sereno, T. Blevé-Zacheo, Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions, *New Phytologist* 170 (2006) 501–512.
- [13] M. Brandalise, F.E. Severino, M.P. Maluf, I.G. Maia, The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves, *Plant Cell Reports* 28 (2009) 1699–1708.
- [14] C.F. Barsalobres-Cavallari, F.E. Severino, M.P. Maluf, I.G. Maia, Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions, *BMC Molecular Biology* 10 (2009) 1.
- [15] K. Higo, Y. Ugawa, M. Iwamoto, T. Korenaga, Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999, *Nucleic Acids Research* 27 (1999) 297–300.
- [16] M. Lescot, P. Déhais, G. Thijs, K. Marchal, Y. Moreau, Y. Van de Peer, P. Rouzé, S. Rombauts, PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences, *Nucleic Acids Research* 30 (2002) 325–327.
- [17] R.B. Horsch, J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers, R.T. Fraley, A simple and general method for transferring genes into plants, *Science* 227 (1985) 1229–1231.
- [18] A.C.F. de O. Rodrigues, I.M. de O. Abrantes, M.T. Melillo, T. Blevé-Zacheo, Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*, *Nematropica* 30 (2000) 201–210.
- [19] E.V.S. Albuquerque, R.M.D.G. Carneiro, P.M. Costa, A.C.M.M. Gomes, M. Santos, A.A. Pereira, M. Nicole, D. Fernandez, M.F. Grossi-de-Sá, Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*, *European Journal of Plant Pathology* 127 (2010) 365–373.
- [20] X. Xu, S. Guo, K. Chen, H. Song, J. Liu, L. Guo, Q. Qian, H. Wang, A 796 bp *PsPR10* gene promoter fragment increased root-specific expression of the GUS reporter gene under the abiotic stresses and signal molecules in tobacco, *Biotechnology Letters* 32 (2010) 1533–1539.
- [21] P.V. Demkura, G. Abdala, I.T. Baldwin, C.L. Ballaré, Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense, *Plant Physiology* 152 (2010) 1084–1095.
- [22] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [23] C. Ramakers, J.M. Ruijter, R.H. Deprez, A.F. Moorman, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, *Neuroscience Letters* 339 (2003) 62–66.
- [24] R.A. Jefferson, T.A. Kavanagh, M.W. Bevan, GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO Journal* 6 (1987) 3901–3907.
- [25] A. Dereeper, V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J.F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J.M. Claverie, O. Gascuel, Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist, *Nucleic Acids Research* 36 (2008) W465–W469.
- [26] F. Passardi, G. Theiler, M. Zamocky, C. Cosio, N. Rouhier, F. Teixeira, M. Margis-Pinheiro, V. Ioannidis, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand, PeroxiBase: the peroxidase database, *Phytochemistry* 68 (2007) 1605–1611.
- [27] L.G.E. Vieira, et al., Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18 (2006) 95–108.
- [28] J.M. Mondego, R.O. Vidal, M.F. Carazzolle, E.K. Tokuda, L.P. Parizzi, G.G. Costa, L.F. Pereira, A.C. Andrade, C.A. Colombo, L.G. Vieira, G.A. Pereira, An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, *BMC Plant Biology* 11 (2011) 30.
- [29] R.O. Vidal, J.M. Mondego, D. Pot, A.B. Ambrósio, A.C. Andrade, L.F. Pereira, C.A. Colombo, L.G. Vieira, M.F. Carazzolle, G.A. Pereira, A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*, *Plant Physiology* 154 (2010) 1053–1066.
- [30] D. Vom Endt, M. Soares e Silva, J.W. Kijne, G. Pasquali, J. Memelink, Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-Hook DNA-binding proteins, *Plant Physiology* 144 (2007) 1680–1689.
- [31] J. Stougaard, J.E. Jørgensen, T. Christensen, A. Kühle, K.A. Marcker, Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc3 and N23 gene promoters, *Molecular and General Genetics* 220 (1990) 353–360.
- [32] T. Elmaman, M. Tepfer, Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rol D promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter, *Transgenic Research* 4 (1995) 388–396.
- [33] K. Sasaki, O. Yuichi, S. Hiraga, Y. Gotoh, S. Seo, I. Mitsuhara, H. Ito, H. Matsui, Y. Ohashi, Characterization of two rice peroxidase promoters that respond to blast fungus-infection, *Molecular Genetics and Genomics* 278 (2007) 709–722.
- [34] L.V. Bindschedler, J. Dewdney, K.A. Blee, J.M. Stone, T. Asai, J. Plotnikov, C. Denoux, T. Hayes, C. Gerrish, D.R. Davies, F.M. Ausubel, G.P. Bolwell, Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance, *Plant Journal* 47 (2006) 851–863.
- [35] J.E. Schaff, D.M. Nielsen, C.P. Smith, E.H. Scholl, D.M. Bird, Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance, *Plant Physiology* 144 (2007) 1079–1092.
- [36] M.F. Vieweg, M. Frühling, H.J. Quandt, U. Heim, H. Bäumlein, A. Pühler, H. Küster, M.P. Andreas, The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene Vflb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants, *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17 (2004) 62–69.
- [37] H. Koltai, M. Dhandaydham, C. Opperman, J. Thomas, D. Bird, Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont, *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14 (2001) 1168–1177.
- [38] B. Favery, A. Complainville, J.M. Vinardell, P. Lecomte, D. Vaubert, P. Mergaert, A. Kondorosi, E. Kondorosi, M. Crespi, P. Abad, The endosymbiosis-induced genes ENOD40 and CCS52a are involved in endoparasitic-nematode interactions in *Medicago truncatula*, *Molecular Plant–Microbe Interactions* 15 (2002) 1008–1013.
- [39] P.A. Manavella, C.A. Dezar, F.D. Ariel, R.L. Chan, Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter, *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (2008) 860–867.

3. O Gene *CaIRL*

3.1. Os Fenilpropanóides

Uma das vias mais importantes de síntese de compostos secundários em plantas é a via dos fenilpropanóides, mais conhecida como a via dos flavonóides derivados (Figura 2). Os fenilpropanóides são um grupo diverso de metabólitos secundários acumulados nos tecidos vegetais, no qual se incluem as antocianinas, flavonóis, proantocianidinas (taninos condensados), ligninas, flavonas, isoflavonas, entre outros.

O mais conhecido desses compostos é a lignina, sendo o principal componente estrutural da parede celular das plantas superiores terrestres, e, após a celulose, é o polímero vegetal mais abundante, podendo adquirir a função de barreira física induzida por ataque microbiano (Ferrer *et al.*, 2008).

Esses compostos são amplamente distribuídos no reino vegetal e suas rotas biossintéticas podem gerar substâncias que atuam tanto na pigmentação, como no caso das antocianinas que servem de atrativo para diversos polinizadores, como antioxidantes em frutas, folhas e sementes (Gould *et al.*, 2002). Podem ainda atuar como moléculas protetoras na formação de radicais livres por ação da luz ultravioleta (Merzlyak *et al.*, 2008), onde se verifica o aumento de flavonóides em determinados órgãos em decorrência de exposição à luz (Winkel-Shirley, 2002). Esse papel sugere um possível mecanismo adaptativo geral durante a transição de plantas aquáticas para o meio terrestre em uma atmosfera desprotegida (Ferrer *et al.*, 2008).

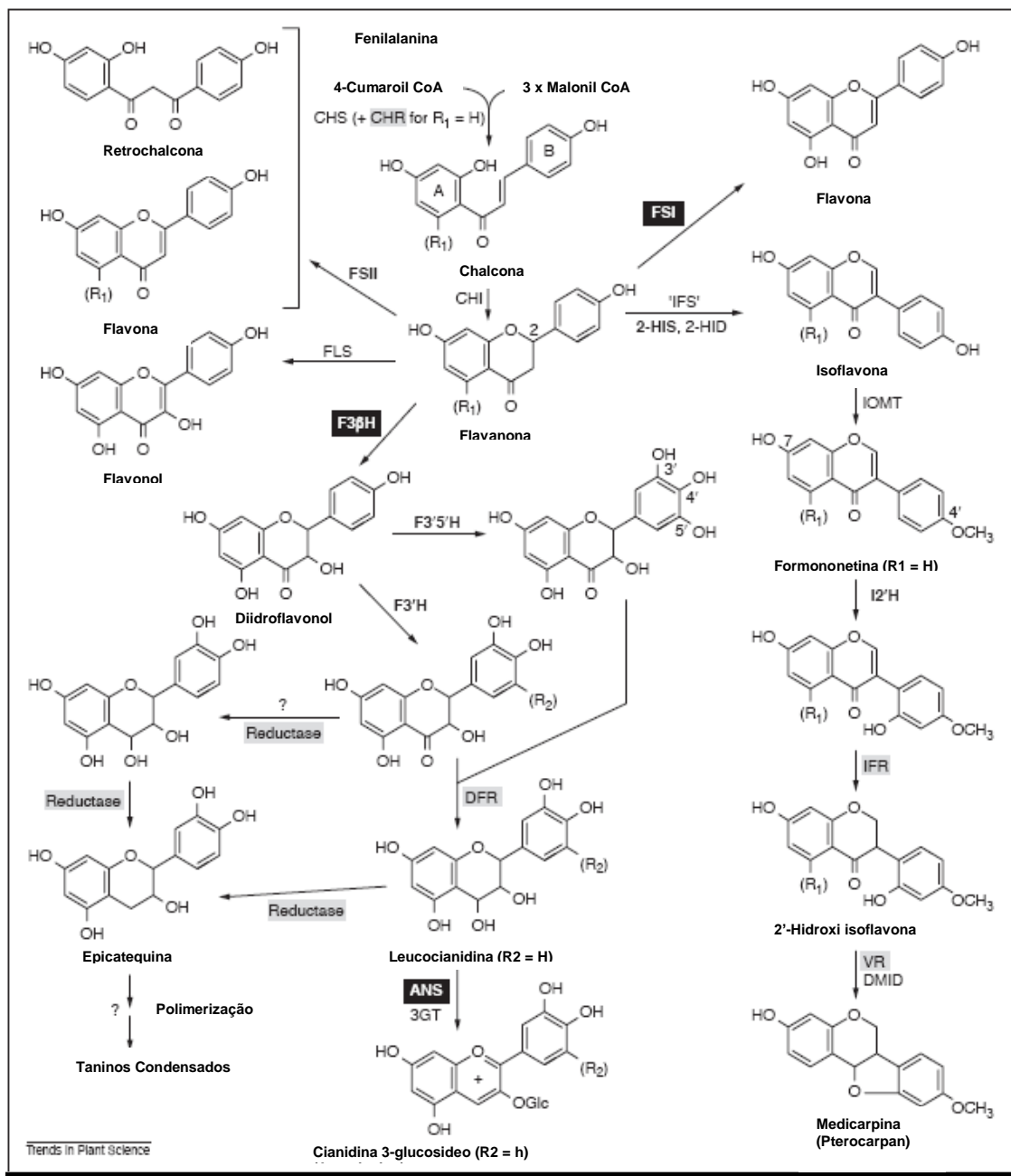


Figura 2 - Via biossintética dos mais importantes flavonóides derivados em leguminosas. CHS, chalcona sintetase; CHR, chalcona redutase; CHI, chalcona isomerase; FSI, flavona sintetase I; FSII, flavona sintetase II; FLS, flavonol sintetase; IFS, isoflavona sintetase; F3βH, flavanona 3β hidroxilase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilase; DFR, diidroflavonol redutase; ANS, antocianidina sintetase; 3GT, antocianidina 3-glicosiltransferase; IOMT, isoflavona O-metiltransferase, IFR, isoflavona redutase; VR, vestitona redutase, DMID, 7,2'-diidroxi, 4'-metoxisoflavanol desidratase. Adaptado de Dixon & Steele, 1999.

Evidências da literatura demonstram que os flavonóides têm papel importante na proteção vegetal contra insetos e mamíferos de hábitos herbívoros. Os principais estudos foram focados em flavanas poliméricas, proantocianidinas, flavonas, flavonóis e

isoflavonas de baixo peso molecular. Como exemplo do seu emprego é possível citar os trabalhos realizados com taninos condensados no combate a pragas e animais, já que estas moléculas são bem pouco palatáveis, e causam repugnância em lagartas e outros animais, inclusive mamíferos como macacos (Harbone & Williams, 2000).

Porém, dentre as funções conhecidas, a que mais nos interessa no presente trabalho é a ação desses compostos na proteção contra microorganismos, inibindo o crescimento principalmente de fungos (Dixon *et al.*, 2002; 2005). González de Colmenares e colaboradores (1998) demonstraram que variedades de *C. arabica* suscetíveis ao fungo *H. vastatrix* contêm baixos níveis de proantocianidinas nas suas folhas quando comparadas com a espécie resistente *C. canephora*, e que as proantocianidinas extraídas dessas folhas inibem a germinação *in vitro* de uredósporos da raça tipo II de *H. vastatrix*. Em um trabalho de 2002, Silva e colaboradores detectaram dois picos de atividade da enzima fenilalanina amonia-liase (PAL), a 2 e 5 dias após a inoculação do isolado II de *H. vastatrix* em folhas de *C. arabica* L. e *C. congensis* Froehner, ambas resistentes ao fungo. O primeiro pico coincidiu com o início da acumulação de compostos fenólicos e com o início da morte celular, enquanto o segundo parece estar relacionado com a acumulação posterior de fenóis e a lignificação das paredes das células hospedeiras, inibindo o desenvolvimento do microorganismo. Ainda com o mesmo fungo, Diniz e colaboradores e colaboradores (2012) reportaram o acúmulo de fenóis em células foliares do genótipo HDT832/2 (Híbrido do Timor), 12 horas após a infecção, a partir dos estágios de penetração das hifas ou formação dos apressórios. O fungo cessou seu crescimento após a penetração dos estômatos, formando poucos haustórios, induzindo uma resposta do tipo hipersensitiva, com a acumulação de fenóis e o encapsulamento dos haustórios por calose.

Incluída nesta categoria está a classe dos isoflavonóides descritos originalmente nas plantas leguminosas. Tais compostos são considerados benéficos para a saúde humana, pois existem indícios de que auxiliam na redução do risco de osteoporose e câncer, podendo, com efeito semelhante ao estradiol, ser utilizados na reposição hormonal, reduzindo os sintomas da menopausa e baixando os níveis de colesterol (Dixon & Ferreira, 2002). Alguns estudos vêm demonstrando há algum tempo a importância dos isoflavonóides nas relações simbióticas de leguminosas com bactérias do solo, atuando na formação de nódulos radiculares para fixação de nitrogênio. Nos estádios iniciais da nodulação há o reconhecimento de isoflavonóides por proteínas NodD específicas de *Rhizobium* que levam à ativação de outros genes *nod* (Peters *et al.*, 1986; Redmond *et al.*, 1986). A planta hospedeira, por sua vez, responde a este contato, aumentando a exudação de isoflavonóides nas raízes (Dakora & Phillips, 1996).

A isoflavona redutase (IFR) é a penúltima enzima da cadeia de biossíntese da medicarpina, inicialmente descrita em alfafa (*Medicago sativa* L.), com uma ou duas cópias no genoma de leguminosas (Paiva *et al.*, 1991). É uma enzima monomérica, citosólica (López-Meyer & Paiva, 2002), e NADPH-dependente. Na alfafa converte 2'-hidroxiformoneteína estereoespecificamente para (3R)-vestitona (Figura 3) com a adição de um centro quiral na posição C3 (Wang *et al.*, 2006).

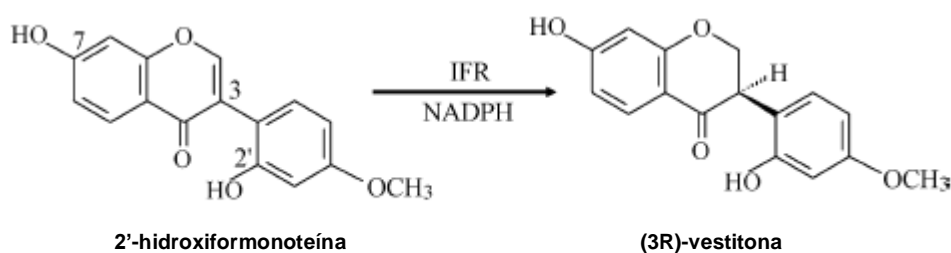


Figura 3 - A reação enzimática catalizada pela IFR de *M. sativa*. Adaptado de Wang *et al.* (2006).

Isoflavonas redutase foram encontradas em outras leguminosas como a ervilha (*Pisum sativum*) e a soja (*Glycine max*), onde participam especificamente da via biossintética dos isoflavonóides. Apesar dos isoflavonóides serem compostos presentes exclusivamente nas leguminosas, as IFRs pertencem a uma grande família protéica que inclui proteínas semelhantes à IFR (IR-Like; IRL), as quais têm significativa identidade de seqüência com as IFRs de leguminosas, tendo sido identificadas em várias espécies de plantas não relacionadas.

As IRLs têm sido relatadas como responsivas a estresses ambientais diversos. Em milho, uma IRL é induzida pela ausência de enxofre (Petruco *et al.*, 1996), em *Arabidopsis thaliana* pelo estresse oxidativo (Babiychuk *et al.*, 1995), em batata é expressa durante o crescimento do tubo polínico e induzida por contato mecânico (van Eldik *et al.*, 1997), nos frutos de toranja (*Citrus paradisi*) é estimulada pela irradiação ultravioleta ao mesmo tempo em que induz resistência ao *Penicillium digitatum* (Lers *et al.*, 1998). Recentemente, um gene codificando uma IRL induzida por compostos oxidantes em arroz (*Oryza sativa*) foi capaz de conferir resistência ao estresse oxidativo quando superexpresso em plantas transgênicas (Kim *et al.*, 2010). Outras enzimas IRL catalisam distintas reações de redução, como a enzima pinoresinol-lariciresinol redutase que atua na via de biosíntese da lignina em *Forsythia intermedia* (Dinkova-Kostova *et al.*, 1996), e a fenilcumarana benzílica éter redutase de *Pinus taeda* (Gang *et al.*, 1999). Uma IRL envolvida no metabolismo de nicotina e de outros alcalóides também foi identificada em tabaco (Shoji *et al.*, 2002).

Em café, Guzzo (2004) empregando a técnica de hibridização subtrativa por supressão de cDNAs em plantas do Híbrido do Timor inoculadas com o fungo da ferrugem (*H. vastatrix*, raça II), detectou a indução de uma IRL resultante da interação planta-patógeno.

Em trabalho do nosso grupo, Brandalise e colaboradores (2009) identificaram através de análises *in silico* junto ao banco de dados do projeto EST de café, um EST codificando uma Isoflavonas Redutase-Like com expressão específica em folhas de *C. arabica*. Esse gene (denominado *CaIRL*) mostrou-se altamente responsivo a infecção fúngica e ao estresse mecânico, sendo induzido em ambas as condições.

3.2. Fatores de Transcrição do Tipo WRKY

A ativação do sistema de defesa em plantas, mediante a infecção por patógenos, é associada com a indução de um grande número de genes (Rushton & Somssich, 1998). Alguns dos genes induzidos por patógenos codificam proteínas com atividade antimicrobiana (por ex.: glucanases hidrolíticas e quitinases que degradam a parede celular de microorganismos), enquanto outros codificam proteínas que regulam vias sinalizadoras desse sistema. Muitos genes de defesa são possivelmente induzidos através do reconhecimento específico entre sítios *cis* e *trans*-atuantes e a ligação com fatores de transcrição. Dentre as muitas classes de fatores de transcrição associados com as respostas de defesa vegetal, incluem-se as proteínas ligantes de DNA contendo domínios do tipo WRKY (Eulgem *et al.*, 1999). Esses domínios contêm uma sequência conservada de aminoácidos (WRKYGQK), a qual é seguida por motivos de ligação ao DNA do tipo dedo-de-zinco (Cys2His2 ou Cys2HisCys; Ulker & Somssich, 2004). As proteínas WRKY são exclusivas de plantas e pertencem a uma superfamília de fatores de transcrição com mais de 100 representantes identificados em *A. thaliana* (Eulgem *et al.*, 2000).

Os elementos W-box, com uma seqüência central TGAC, estão presentes em promotores de muitos genes relacionados à defesa e reconhecidos pelos fatores de transcrição do tipo WRKY. Por exemplo, a proteína WRKY1 de salsa (*Petroselinum crispum*) se liga a promotores contendo sítios W-box [(T)TGAC(C)] associados aos genes *PR-10* (*pathogenesis related*) e ao próprio *WRKY1* (Eulgem *et al.*, 1999). Em muitos promotores associados a genes de defesa, a presença de W-boxes é essencial para que ele permaneça responsivo a estresses diversos, seja ele físico (Hong *et al.*, 2005) ou biológico (Rushton & Somssich, 1998).

Como mencionado, fatores de transcrição do tipo WRKY estão envolvidos na regulação da expressão de diversos genes de defesa em plantas. Fernandez *et al.* (2004), por exemplo, identificaram um gene que codifica uma proteína WRKY em café (denominado *Cawrky1*), o qual teve sua expressão aumentada nos estágios iniciais da infecção por *H. vastatrix*, ferimento ou tratamento com ácido salicílico (AS) (Ganesh *et al.*, 2006).

A proteína CaWRKY1 apresenta alta similaridade de seqüência com membros do grupo IIB dos fatores de transcrição de tipo WRKY de *A. thaliana*, sobretudo com AtWRKY6 (Petitot *et al.*, 2008). Proteínas AtWRKY6 foram identificadas como um importante componente do mecanismo de sinalização de defesa da planta contra patógenos e senescência (Robatzek & Somssich, 2002), sendo a sua expressão aumentada em folhas senescentes e após inoculação com a bactéria *Pseudomonas syringae* (Robatzek & Somssich 2001). Adicionalmente, proteínas AtWRKY6 agem como reguladores positivos da expressão de genes *PR*, já que a superexpressão do gene *Atwrky6* em arabis aumentou os níveis de transcritos dos genes *npr1* e *pr1*. Corroborando tal observação, vários W-boxes são encontrados na região promotora do gene *pr1* (Robatzek & Somssich 2002). Segundo Petitot *et al.* (2008), o gene *Cawrky1*,

além de ser ativado por *H. vastarix* e por *M. exígua*, também apresentou expressão aumentada em plantas tratadas com AS, submetidas a ferimento ou em folhas senescentes, o mesmo perfil observado para AtWRKY6 de acordo com Robatzek & Somssich (2001).

Curiosamente, o promotor do gene *CaIRL* apresenta cinco repetições *in tandem* de uma sequência conservada (TAATTTCTTGACCTTA) contendo o núcleo de um elemento W-box (TGAC; sublinhado) (Brandalise *et al.*, 2009). O gene *CaIRL* é induzido por estresses bióticos a abióticos, e a presença de um núcleo W-box nas referidas sequências conservadas sugere a participação de fatores do tipo WRKY na sua regulação. Com base em tal hipótese, investigou-se no presente trabalho a funcionalidade destes elementos e importância dos mesmos na regulação do gene *CaIRL*.

4. Material e Métodos

4.1. Material Vegetal

Foram utilizadas plantas de café da espécie *Coffea arabica* L. cultivar Mundo Novo, susceptível a ferrugem alaranjada. Tais plantas foram gentilmente cedidas pela Dra. Mirian Perez Maluf do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café “Alcides Carvalho”, situado no Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Adicionalmente, plantas de tabaco selvagem (*Nicotiana tabacum* SR1) e transformadas estavelmente com a versão completa e reduzida do promotor do gene *CaIRL* (Brandalise *et al.*, 2009) respectivamente, e cultivadas em sala climatizada, foram usadas nos ensaios de agroinfiltração.

4.2. Extração de DNA Genômico de Café

O DNA genômico das plantas de cafeeiro foi extraído utilizando 100 mg de tecido foliar. A esse material foi adicionado 500 µL do tampão de extração (100 mM de Tris-HCl pH 8.0; 50 mM de EDTA pH 8.0; 500 mM de NaCl; 10 mM de β-Mercaptoetanol e água ultrapura autoclavada). A este volume de tampão foi acrescido 70 µL de SDS 10%, sendo a amostra agitada em vortex e incubada por 10 minutos a 65°C. Em seguida foram adicionados 216 µL de acetato de potássio 3 M (pH 5.5), misturando-se por inversão e incubando-se por 5 minutos no gelo. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 15.000 rcf por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novos microtubos, aos quais foram adicionados 640 µL de álcool isopropílico e 60 µL de acetato de sódio 3 M. Uma incubação de 10 minutos a -20 °C foi realizada, seguida de centrifugação por 15 minutos a 15.000 rcf. O sobrenadante foi então descartado.

O DNA genômico foi resuspenso em 200 µL de TE pH 8.0 (Tris + EDTA), centrifugado por mais 5 minutos a 15.000 rcf, e o sobrenadante transferido para novos microtubos acrescidos de 20 µL de acetato de sódio 3 M e 440 µL de etanol 100%. Incubou-se por 10 minutos a -20°C, e centrifugou-se por 5 minutos a 15.000 rcf. O sobrenadante foi então descartado e ao precipitado foram acrescentados 500 µL de etanol 70%. Após nova centrifugação por 5 minutos a 15.000 rcf, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado seco por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37°C. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água livre de nucleases e quantificado em espectrofotômetro (NANODROP) usando absorvância a 260 nm.

4.3. Obtenção das Versões Truncadas do Promotor *CaIRL*

Diferentes porções da região promotora do gene *CaIRL* foram amplificadas por PCR convencional empregando diferentes pares de oligonucleotídeos específicos contendo sítios para as enzimas de restrição *HindIII* (Fowards) e *NcoI* (Reverse), respectivamente (Tabela 1). Nesta Tabela, o amplicon de 730 pares de bases (pb) corresponde à versão integral do promotor e os demais ao tamanho em pb das versões truncadas.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos empregados na amplificação dos diferentes fragmentos do promotor *CaIRL*.

Sequência 5'-3'	Nome	Amplicon (pb)
F – CCCAAGCTTTGTCCAGCTAATTTC	PF730HIND	730
F – CCCAAGCTTCAAGATAATACTAAT	PF707HIND	707
F – CCCAAGCTTCAATATATTATCTTA	PF681HIND	681
F – CCCAAGCTTCCTTAGAAGATATTA	PF646HIND	646
F – CCCAAGCTTATTCTAATTTCTAAC	PF606HIND	606
F – CCCAAGCTTTCTCGACCATACAT	PF427HIND	427
R – CCCCCATGGTTCCAACCTCTAGGATGG	PRNCO	

As reações foram preparadas em um volume de 25 μ L contendo: 12,5 μ L do reagente *GoTaq Colorless Master Mix 2x* (Promega), 1 μ L de DNA genômico (aproximadamente 200 ng/ μ L), 10,5 μ L de água livre de nuclease, e 0,5 μ L dos oligonucleotídeos acima (concentração 10 mM). Como controle negativo utilizou-se água livre de nucleases em lugar de DNA.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf) utilizando 35 ciclos. Os parâmetros utilizados foram: desnaturação inicial (5 min/95°C) seguida pelos ciclos de desnaturação 30 segundos/94°C, uma etapa de anelamento de 53°C por 30 segundos, etapa de extensão de 40 segundos a 72°C, seguida de uma polimerização final de 10 minutos a 72°C. Os produtos amplificados na PCR foram verificados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, em seguida observados em transiluminador ultravioleta e fotografados.

4.4. Inserção das Versões Truncadas do Promotor *CaIRL* em pCAMBIA-1381z

Para montagem do cassete de expressão contendo as versões truncadas do promotor do gene *CaIRL* em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* (β -glucuronidase) foi utilizado o vetor pCAMBIA-1381z (Cambia, Austrália). Esse vetor contém o gene *uidA* interrompido por um íntron e carrega um gene de resistência à higromicina. O vetor e os produtos de amplificação foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *NcoI*, purificados em gel de agarose, e ligados empregando T4 DNA ligase. Os produtos da ligação foram inicialmente transformados em *Escherichia coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989). Os clones positivos foram então verificados por seqüenciamento e em seguida transformados em *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 (como descrito no item 4.6) para posterior emprego nos ensaios de agroinfiltração.

4.5. Inserção da Região Codificadora de *CaWRKY1a* em pBI121

Um fator de transcrição do tipo WRKY de café (*CaWRKY1a*) foi utilizado nos ensaios de transativação do promotor *CaIRL* empregando agroinoculação. Para tal, um vetor pGEM-T Easy (Promega) contendo a região codificadora do gene *CaWRKY1a* (Petitot *et al.*, 2008), gentilmente cedido pela Dra. Diana Fernandes, IRD – França, foi empregado. A referida região codificadora foi reamplificada por PCR (Primers 5'-GGGGGATCCATGGACAAAGGATGGG-3' e 5'-GGGGAGCTCGAAATTAATTCCCAGG-3') e clonada sob controle do promotor

CaMV 35S no vetor pBI121 (Clontech). A construção pBI121:35S:CaWRK1a resultante foi transformada em *A. tumefaciens* como descrito abaixo.

4.6. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Eletrocompetente

Para a transformação, dois μL da reação de ligação contendo vetor mais inserto foram misturados a células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* GV 3101. Em seguida, as células foram transferidas para uma cuveta (0,1 cm) de eletroporação, mantida no gelo, e então submetida a um choque elétrico com capacitância de 25 μF , 1,8 kV de carga e 400 Ω de resistência. Após a eletroporação, as células foram ressuspendidas em 450 μL de meio LB (Tryptona 10g/L, Extrato de Levedura 5g/L e Cloreto de Sódio 10g/L) e incubadas sob agitação a 28°C por 2 horas. Em seguida, a suspensão celular foi plaqueada em meio LB contendo canamicina (100 mg/mL), sendo as placas incubadas à 28°C durante 48 horas. A confirmação da transformação foi realizada por PCR convencional utilizando os oligonucleotídeos empregados nas ampliações das versões truncadas do promotor (Tabela 1).

4.7. Ensaio de Agroinfiltração e Transativação

Para os ensaios de agroinfiltração foram usadas plantas de tabaco selvagem com dois meses de idade aclimatadas em sala climatizada (23 °C, 70 % de umidade e 16 horas de luz). As agrobactérias contendo os cassetes de expressão contendo as

diferentes versões do promotor CaIRL foram cultivadas em meio LB líquido (aprox. 20 ml), contendo antibióticos seletivos, e mantidas sob agitação (150 rpm) por 48 horas a 28°C, até alcançarem uma A_{600nm} entre 0,6 e 0,8. A seguir, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 3.000g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. As bactérias foram então ressuspensas em 20 ml de tampão (MES 10 mM, pH 5,6 contendo $MgCl_2$ 10 mM e Acetoseríngona 200 μ M) e incubadas a temperatura ambiente por três horas. A solução foi injetada com seringa de plástico de 1 ml na face abaxial das folhas (as quais permaneceram presas à planta), entre as nervuras secundárias, usando-se de quatro a seis pontos de inoculação por folha. Quatro plantas, três folhas por planta, para cada construção, foram utilizadas para a infiltração. As plantas infiltradas foram mantidas em câmara climatizada nas condições descritas acima por 4 dias até a coleta do material.

Para a realização dos ensaios de transativação, a região codificadora de *CaWRK1a* foi clonada no vetor pBI121 sob controle do promotor CaMV 35S (pBI121:35S:*CaWRK1a*), e ensaios de expressão transiente foram conduzidos via agroinfiltração como descrito acima. A construção pBI121:35S:*CaWRK1a* foi agroinfiltrada em plantas de tabaco transformadas estavelmente com uma versão completa (900 pb) e outra reduzida (400 pb) do promotor do gene *CaIRL*, respectivamente, ambas fusionadas ao gene repórter GUS (Brandalise *et al.*, 2009).

Para a realização dos ensaios de agroinfiltração foram utilizadas duas linhagens de tabaco contendo a versão reduzida e uma linhagem contendo a versão completa do promotor. Quatro plantas de dois meses de idade foram infiltradas, e após 96 h procedeu-se a coleta de quatro folhas por planta, as quais foram processadas em forma de *pool* para extração de RNA total e síntese de cDNA visando a determinar a expressão de GUS por PCR em Tempo-Real. Plantas agroinfiltradas, nas mesmas condições, com *A. tumefaciens* (GV3101) vazia foram usadas como controle, sendo que os resultados

não diferiam significativamente da expressão basal das plantas não infiltradas, estas usadas nos cálculos de expressão relativa.

4.8. Extração de RNA Total de Tabaco

A extração de RNA das folhas agroinfiltradas foi realizada conforme o protocolo descrito por Korimbocus *et al.* (2002), utilizando-se CTAB, com algumas modificações. Cem mg do macerado do pool de folhas coletadas para cada planta de tabaco agroinfiltrada foram usados para a extração. Adicionou-se 500 µl de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; 20 mM de EDTA; 100 mM de Tris-HCl pH 8.0; PVP 1%, completado com água ultrapura autoclavada para um volume final de 100 mL) previamente aquecido a 65°C. Em seguida, homogeneizaram-se as amostras em vórtex e estas foram incubadas por 30 minutos a 65°C. Após este período foram adicionados 500 µl de clorofórmio acrescido de álcool isoamílico (24:1). Centrifugou-se a amostra a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. Após a transferência, 1 volume de LiCl (5 M) foi adicionado e os tubos foram invertidos, seguindo um período de incubação de 16 horas a -20°C.

Os tubos foram então centrifugados a 4°C e 12.000 rpm por 30 minutos, retirou-se o sobrenadante e ao precipitado foi adicionado 200 µl de TE (Tris + EDTA) adicionado de SDS 1%, 100 µl de NaCl 5 M e 300 µl de isopropanol gelado, seguido por uma incubação de 2 horas a -20°C. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado (preparado com água DEPC) e centrifugou-se por mais 5 minutos a 10.000 rpm a uma temperatura de 4°C. O etanol foi eliminado, o precipitado seco por

aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, e ressuspendido em 30 µl de água DEPC, sendo posteriormente incubado a 65°C por 10 minutos.

4.9. Quantificação do RNA e Síntese de cDNA

A integridade do RNA total extraído foi confirmada por eletroforese em gel não desnaturante de agarose 1% (p/v). O gel foi corado com brometo de etídeo 0,1 µg/ml e fotodocumentado em um transiluminador com luz ultravioleta (Eagle-Eye II, 24 Stratagene EagleSight). A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies).

Posteriormente, as amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNaseI (Fermentas) para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. Para a obtenção de RNA livre de DNA foi utilizado 2 µg do RNA total, 2 µl de tampão de reação com MgCl₂ (10 X; fornecido no kit) e 2 unidade da enzima Deoxyribonuclease I (1 U/µl). O volume final desta reação foi de 10 µl, completados com água livre de RNase. As amostras foram incubadas em 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), e as amostras foram incubadas no termociclador a 65°C por 10 minutos.

Na síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit *High Capacity* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do cDNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop. Para a reação de PCR em Tempo Real, o cDNA das amostras de interesse foi diluído para uma concentração de aproximadamente 70 ng/µl, adicionando-se água livre de RNase e armazenado a -20°C.

4.10. Quantificação da Expressão Relativa por PCR em Tempo

Real

Os oligonucleotídeos utilizados para a quantificação da expressão relativa do gene repórter GUS nas plantas de tabaco submetidas à agroinfiltração, bem como dos genes normalizadores *18S RNA* (Levy *et al.*, 2004) e *Actina*, encontram-se descritos na Tabela 2. Esses oligonucleotídeos foram gerados automaticamente utilizando-se o software *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems). Para tal, os seguintes parâmetros foram especificados: tamanho entre 26 e 30 pb; T_m (Temperature of melting) entre 65 e 70°C; quantidade de GC: entre 40 e 60% e tamanho médio dos fragmentos amplificados entre 50 e 150 pb.

Tabela 2. Oligonucleotídeos empregados nas reações de RT-qPCR

Sequência 5'-3'	Nome	Amplicon (pb)
F – TTGCCAACGAACCGGATAC R – GCCAGTGGCGCGAAATATT	RTGUS	100
F – AGGAATTGACGGAAGGGCA R – GTGCGGCCCCAGAACATCTAAG	18S	100
F – TTTCTGGAATTGCTGATAGGATGA R – AGCCAAAATAGAACCTCCAATCCAA	ACTIN	100

Para as reações de PCR em tempo real utilizou-se o kit *GoTaq Master Mix* (2X) (Promega). A reação foi composta por 6 µl de *GoTaq Master Mix* (2X), 2,5 µl de cDNA diluído, 0,4 µl (10 mM) de cada oligonucleotídeo [GUS-específico ou normalizador (forward e reverse)] para um volume final de 10 µl, o qual foi obtido

adicionando-se água livre de RNase. Cada reação foi feita em duplicata 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 (Step One Plus Real-Time PCR System, Applied Biosystems), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos e pareamento a 60°C por 1 minuto. No final do processo, para a quantificação dos dados, foi realizado um ciclo suplementar de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 15 segundos a 95°C. Posteriormente os dados ópticos foram analisados no programa *Step One System Software v2.1* (Applied Biosystems).

Após o fim da reação foi obtida a representação gráfica (Amp Plot) e numérica (Ct, Threshold Cycle) do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação. O cálculo para a determinação da expressão gênica foi o do $\Delta\Delta Ct$ (Livak e Schmittgen, 2001), o qual se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a expressão $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde QR representa o nível de expressão gênica, Ct representa o ciclo no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene controle (ubíquo) e $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse (infecção em determinado tempo) e o ΔCt da amostra de referência. A eficiência dos oligonucleotídeos foi calculada através do programas SAS versão 8e, permanecendo entre 1,96 e 2,00. Para efeito de cálculo, foi considerada uma eficiência de 2,00.

4.11. Obtenção dos Extratos Nucleares Totais de Folhas de Café

Os extratos protéicos nucleares foram obtidos empregando o *Cellytic PN - Plant Nuclei Isolation/Extraction kit* (Sigma-Aldrich) conforme instruções do fabricante. Para tal foram utilizados 20 g de folhas de café (*Coffea arabica* Mundo Novo), as quais foram submetidas previamente à injúria mecânica. A concentração de proteína total no extrato (3,8 mg/ml) foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop. Em seguida, a amostra protéica foi alíquotada, e as alíquotas correspondentes conservadas a -80°C.

4.12. Obtenção e Marcação da Sonda de DNA

Dois oligonucleotídeos de fita simples contendo duas repetições da sequência TAATTTCTGACCTTA (o núcleo W-box está sublinhado) (Brandalise *et al.*, 2009) foram sintetizados. Esses oligos complementares foram anelados para a formação da sonda de DNA de fita dupla, a qual foi submetida a marcação radioativa empregando α - ^{32}P [CTP]. O volume final de reação foi de 20 μl , adotando-se um período de incubação de 15 min a 37°C. Após a marcação, a sonda (100 ng) foi purificada em coluna Sephadex G-50 para remoção dos nucleotídeos não incorporados, e em seguida, utilizada nos ensaios de mobilidade em gel. Adicionalmente, duas versões mutadas da referida sonda (MUT1 – 5'-TAATTTCCCTTCTTATAATTTCCCTTCTTA-3' e MUT2 – 5'-TCCCCTCTGACCTTATCCCCTCTGACCTTA-3'- nucleotídeos sublinhados representam as alterações) foram sintetizadas e testadas em ensaios de mobilidade.

4.13. Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida

Os ensaios de mobilidade em gel de poliacrilamida foram realizados empregando os extratos de proteínas nucleares obtidos a partir de folha de café. As reações de ligação proteína/DNA foram realizadas em tampão de ligação (12 mM Tris-HCl pH7.5, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 2.5% glicerol, 5 mM MgCl₂, 0.005% de NP40 e 0.2 mM de EDTA) na presença de quantidades crescentes de extrato nuclear (3.8, 7.6, 19 e 30.4 µg, respectivamente) utilizando 10 ng da sonda marcada. Um período de incubação de 30 minutos em gelo foi adotado. Em seguida, os complexos foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, em condições não desnaturantes, durante 1 hora e 30 minutos a 80 V. O gel foi seco e as bandas foram visualizadas por autoradiografia. Um fator de transcrição do tipo WRKY de *Citrus sinensis* expresso em *Escherichia coli* (Benedetti, comunicação pessoal) foi utilizado como controle (a 200 ng/µl) para verificar a funcionalidade da sequência W-box presente no referido elemento. Neste caso foram usados 200 ng, 400 ng e 1 µg de proteína recombinante na reação de ligação com a sonda.

4.14. Busca *in silico* por genes e sequências promotoras ortólogas a *CaIRL*

A sequência deduzida de aminoácidos da IRL de café (gb|FJ972200.1|:281-1225), disponível no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foi usada como isca (*query*) para a realização de buscas nos bancos TAIR (*The Arabidopsis*

Information Resource; <http://www.arabidopsis.org/>) e *Sol Genomics Network* (<http://sgn.cornell.edu>) empregando a ferramenta BLASTP (limite para *e-value* de $1e-10$; e *score* acima de 200 bits). Após a identificação dos ortólogos, apenas uma única sequência de cada espécie analisada (arabidopsis, tomate e batata) foi utilizada para a identificação e análise das regiões promotoras correspondentes. Para tal, dentro dos próprios servidores foram determinadas as matrizes de leitura e o provável ponto de início da transcrição, sendo analisada uma sequência de 2000 pb a montante deste ponto. A presença do núcleo W-box nestas sequências foi determinada utilizando a ferramenta PLACE (*A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements*) disponível em <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>.

5. Resultados

5.1. Análises de Deleção do Promotor do Gene *CaIRL*

A partir da versão integral promotor do gene *CaIRL* caracterizado por Brandalise e colaboradores (2009) (Figura 4), cinco versões truncadas foram obtidas empregando PCR e DNA genômico extraído de folhas de café. A Figura 5 esquematiza as diferentes versões geradas, as quais foram nomeadas de acordo com o número de pares de bases (pb) presentes nas mesmas: 707, 681, 646, 606 e 427. A versão completa contendo todos os 7 sítios W-box (5 deles inseridos na sequência conservada TAATTTCTGACCTTA) apresenta 730 pb. As demais versões apresentam deleções seriadas dos elementos W-Box: a versão 707 contém 6 sítios; a 681 contém 5 sítios; a 646 contém 4 sítios; a 606 apresenta 3 sítios; a versão 427, chamada de versão reduzida, não possui nenhum elemento. O padrão de amplificação das diferentes versões está representado na Figura 6.

TTCACAAACAATTATGAGAAATTG -841
 TTAAAAGGAGTAAATTGATTTGATATTATCATGATCGTTGATCCAAAGGTTTCATAGCATT -781
 TGGTAACTTCAGTTGATTTCTTTTTTGTTCATTGGGCAACCATGTCATGTCCAGCTA -721
 ATTTCTTGACCCTTACAAGATAATACTAATTTCTTGACCCTTACAATATATTATCTTACTAGAT -661
 AATTTCTTGACCCTTACCTTAGAAGATATTATCTTACTAGATAAATTTCTTGACCCTTAATTCTA -601
 ATTTCTAACCTTACAAGATATTATCTTACAAGATAATTTCTTGACCCTTACATTGACCCTTACA -541
 AGATATTGTGAGAACCAAGAATCGAAAGTTGAATGTGACTTTTTTTTGTTTTTCTTTCA -481
 AATATTTGATTGACATGTGCAATTGCGCATGCTTGCCATTATTTTTTTTAAGAAAAAGTT -421
 TGGGCGCTCAGTTTGATCTCGACCATACATATCTAGGATTGACCATACGTTGCTTACAAG -361
 GTTTCTATAGATCACCTACCAATACAGTTATTATATTGATAGCAAAAATTTGAACATGTAA -301
 CTCTTGGTAAGGAAGTGATCGTCTTTATCAACTGAACCAACTTATGTTGACATTTGCCGA -241
 TAAGAATCCATAGAGTACGAAGATTAATCCTTGGAGCATTTTAGAAATTTTAGAGGCCAA -181
 TAGAGCATCAAAAGGAAACGGCAGCGACAGGGCTATCATTTTCAATATTTTTCTCTAT -121
 AAATTAATCTTGCACGGAGCTGCAGCCTATGGTCACTAAGCACATTCTGCATCTCTTCAA -61
 CTCATCAAATTACAGATTGTATCCAATTTGCAACAGTAGTTTACCATCCTAGAGTTGGAA -1
 ↓
 ATGGCTGTGAAAAGCAAGATTTTGATCATTGGCGGCACCGGATACATTGGCAAATACGTA +60
 M A V K S K I L I I G G T G Y I G K Y V

Figura 4 – Sequência de nucleotídeos do promotor *CaIRL* (900 pb) como descrito por Brandalise *et al.* (2009). Os prováveis sítios W-box (região core) estão sublinhados e em negrito, e a posição +1 (códon de início) está assinalada com uma seta.

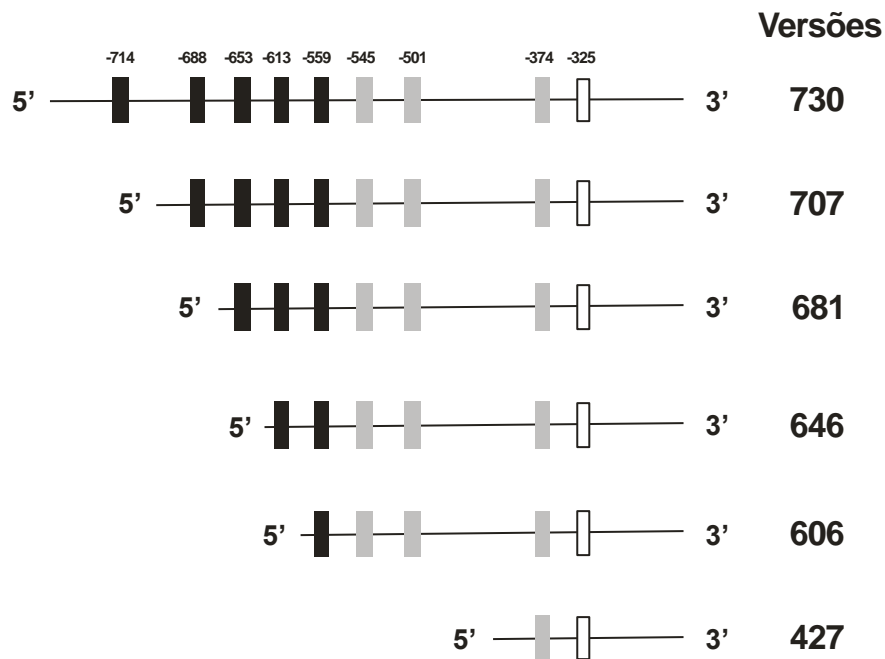


Figura 5 – Representação esquemática das versões truncadas do promotor do gene *CaIRL*. A localização dos elementos W-box que se encontram inseridos na sequência conservada TAATTTCTGACCTTA está representada (barras verticais pretas). Três outros elementos W-box estão demarcados (barras verticais cinzas). A barra vertical branca indica a posição do TATA-Box. A numeração foi realizada a partir do códon de início da tradução (ATG) com o A ocupando a posição +1.

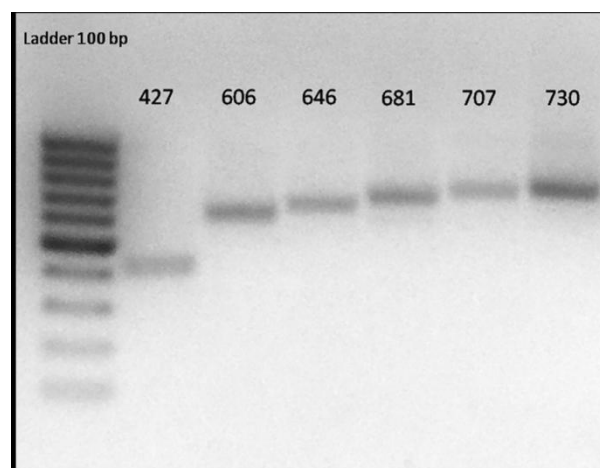


Figura 6 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos de amplificação correspondente às versões truncadas do promotor *CaIRL*. Um marcador (Ladder) de 100 pares de base foi usado.

As versões truncadas do promotor foram clonadas no vetor pCambia-1381z de maneira a fusioná-las com o gene repórter *uidA* (que codifica a β -glucuronidase; *GUS*) e inseridas em *A. tumefaciens* linhagem GV3101. Para testar a atividade transcricional de cada versão truncada, as agrobactérias contendo as diferentes construções foram infiltradas em folhas de tabaco selvagem (*Nicotiana tabacum* SR1) com dois meses de idade (três plantas/tratamento).

Os resultados dos ensaios de agroinfiltração demonstraram que a expressão relativa do gene repórter foi afetada de maneira positiva pelas deleções efetuadas no promotor *CaIRL* (Figura 7). Em comparação com a versão completa (730 pb), um aumento de 31 vezes na expressão relativa do gene repórter foi observado quando a menor versão (427 pb) foi analisada. Quando comparados com a expressão relativa determinada pela versão completa, incrementos de 0,8 (versão 707), 3 (versão 681), 13 (646) e 1 vez (versão 606) foram constatados para as demais versões.

As análises de deleção realizadas sugerem a existência de um (ou mais) elemento regulador negativo entre as posições -730 e -427 do promotor *CaIRL*. O resultado demonstrando que a deleção desta região na versão reduzida do promotor promove um aumento na expressão do gene repórter em condição normal corrobora essa possibilidade. Por outro lado, o referido efeito negativo sobre a expressão dirigida pelo promotor seria mitigado sob estresse, uma vez que Brandalise *et al.* (2009) demonstraram que a versão integral do promotor é ativada em resposta aos estresses bióticos e abióticos, o que não ocorre com a versão reduzida.

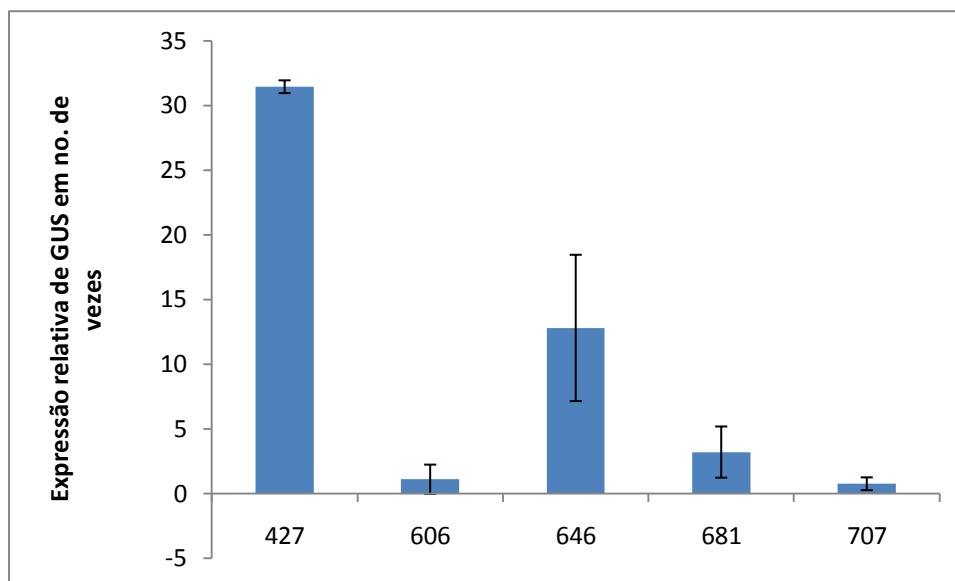


Figura 7 – Expressão relativa do gene repórter GUS em folhas de tabaco agroinfiltradas com os cassetes de expressão contendo as diferentes versões do promotor *CaIRL*. A expressão de GUS sob controle da versão completa do promotor (730 pb) foi usada como padrão de comparação. O gene que codifica uma actina foi usado como normalizador. As linhas verticais representam o desvio padrão.

5.2. Regulação do Gene *CaIRL* por Fatores de Transcrição do Tipo WRKY1

Como já mencionado, a presença de vários elementos do tipo W-Box ao longo da região promotora do gene *CaIRL* sugere uma possível regulação por fatores de transcrição do tipo WRKY. A fim de investigar essa hipótese, ensaios de transativação foram realizados empregando um WRKY de café (*CaWRK1a*) previamente relatado como sendo altamente induzido por estresse biótico (Petitot *et al.*, 2008; Ramiro *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos revelam que, para a versão completa do promotor (denominada FL-9), o acúmulo de transcritos do gene repórter GUS foi cerca de 17

vezes maior nas plantas transgênicas agroinfiltradas com o fator de transcrição CaWRKY1a em relação às plantas da condição controle que não foram agroinfiltradas. Por outro lado, um aumento de 8 vezes foi observado para a linhagem DL-7 e de 2 vezes para a linhagem DL-1, ambas contendo a menor versão do promotor (de 400 bp) (Figura 8). Esses dados indicam uma possível transativação do promotor *CaIRL* pelo fator de transcrição CaWRKY1, a qual é influenciada pela presença dos elementos W-Box. É importante salientar que a ativação parcial da versão reduzida pode estar relacionada à presença de um W-box na posição -374 (Figura 5). Cabe ressaltar que plantas agroinfiltradas, nas mesmas condições, com *A. tumefaciens* (GV3101) vazia foram usadas como controle, sendo que os resultados não diferiam significativamente da expressão basal das plantas não infiltradas, a qual foi usada nos cálculos de expressão relativa.

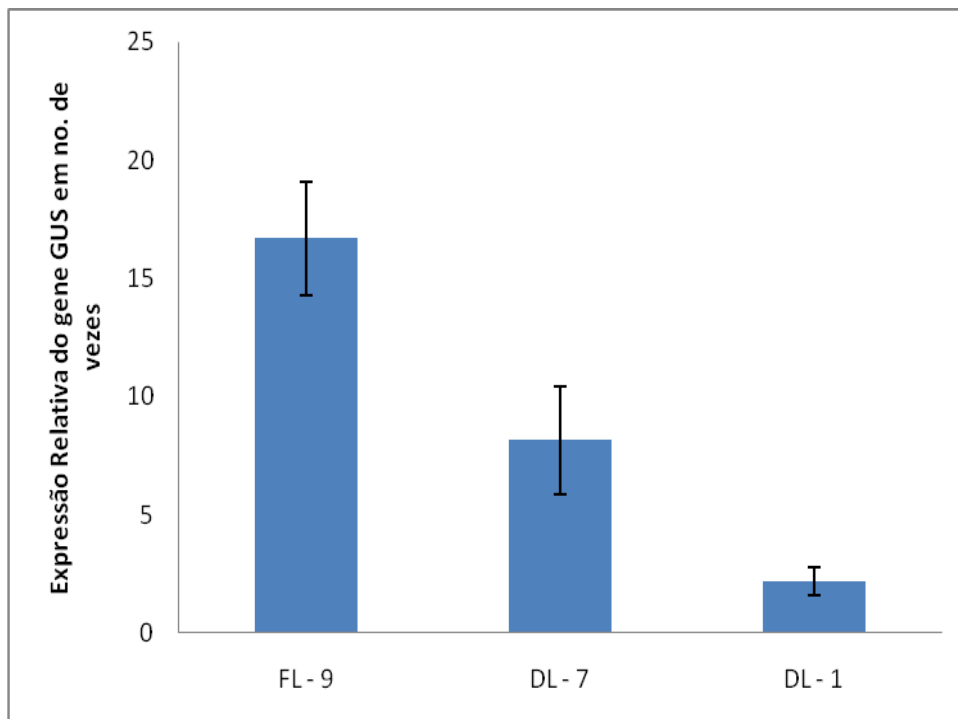


Figura 8 – Acúmulo de transcritos do gene GUS em folhas de tabaco transgênicas agroinfiltradas com a construção pBI121:35S:CaWRK1a. A expressão foi comparada com aquela obtida para a condição não-agroinfiltrada. O gene que codifica o RNA ribossomal 18S de tabaco foi utilizado como normalizador. As linhas verticais representam o desvio padrão.

5.3. Interação Proteína-DNA (WRKY/W-box)

A fim de investigar a funcionalidade do elemento conservado TAATTTCTGACCTTA (contendo um *core* do tipo W-box; sublinhado) presente em diversas repetições no promotor do gene *CaIRL*, ensaios de mobilidade em gel de poliacrilamida foram realizados empregando extratos de proteínas nucleares obtidos de folha de café. Para tal, uma sonda contendo duas repetições do referido elemento foi sintetizada e marcada com ^{32}P . Pela análise da autoradiografia do gel foi possível constatar a ligação de proteínas nucleares à sonda de DNA (Figura 9), o que gerou a formação de um complexo (indicado pela seta na Figura 9) com mobilidade mais lenta que a sonda livre. Neste caso, a intensidade da banda detectada foi mais pronunciada quando quantidades mais elevadas do extrato nuclear foram empregadas. O complexo formado em presença do extrato nuclear aparenta ser específico já que a mesma banda foi detectada quando a sonda foi incubada com um fator de transcrição do tipo WRKY de citrus expresso em bactéria (Figura 9; WRKY citrus). Nesse caso, entretanto, nota-se uma diminuição na intensidade da banda retardada com o aumento da quantidade de proteína na amostra, fato que pode ser atribuído à alta concentração de sal (300 mM NaCl) presente no tampão para garantir a solubilidade da proteína recombinante. Em conjunto, esses dados confirmam que o *cis*-elemento identificado é funcional e corroboram a hipótese de seu reconhecimento por um (ou mais) fator de transcrição do tipo WRKY.

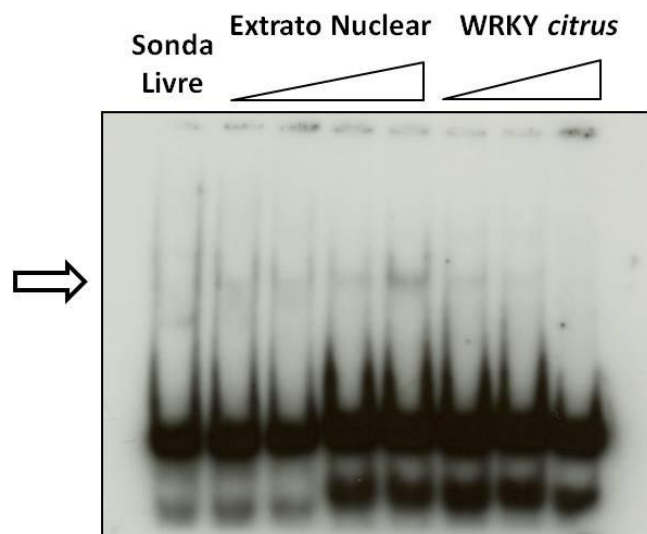


Figura 9 – Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética empregando extrato protéico nuclear de café. A seta indica o ponto no gel em que houve a interação das proteínas nucleares de café e do fator WRKY de *citrus* com a sonda de DNA marcada radioativamente. Os triângulos indicam quantidades crescentes do extrato ou da proteína recombinante.

A fim de verificar a especificidade da ligação observada e refinar os resultados iniciais obtidos empregando extrato nuclear de café, duas versões mutadas da sonda empregada originalmente (TAATTTCTTGACCTTATAATTTCTTGACCTTA) foram sintetizadas. Na primeira versão (denominada MUT1), o core W-box TGAC foi alterado para CCTT, e na segunda versão (denominada MUT2), a sequência AATT adjacente ao W-box foi modificada para CCCC.

A autoradiografia apresentada na Figura 10 mostra que, quando a sonda selvagem (WT) foi utilizada nos ensaios de mobilidade, a formação de um complexo não pode ser constatada, mesmo quando concentrações elevadas do extrato protéico foram empregadas. Cabe ressaltar que as concentrações de extrato usadas neste experimento foram semelhantes àsquelas que geraram bandas retardadas de maior intensidade no primeiro ensaio de mobilidade realizado (representado na Figura 9). Uma das razões aventadas para a baixa eficiência de formação de complexos no referido

ensaio está associada ao maior tempo de armazenamento do extrato nuclear de café utilizado. A presença de bandas retardadas no gel correspondente à sonda MUT2, mesmo nas concentrações mais altas do extrato nuclear, também não foi detectada, indicando que não houve a formação de complexos. Por outro lado, quando se utilizou a sonda MUT1, uma banda retardada pode ser observada na canaleta correspondente à concentração mais elevada do extrato nuclear, sugerindo a formação de um complexo inespecífico. Com base nos resultados obtidos, não foi possível comprovar se motivo TAATTTCTGACCTTA é ativo *in vivo*, sendo necessária a realização de outros experimentos para tal.

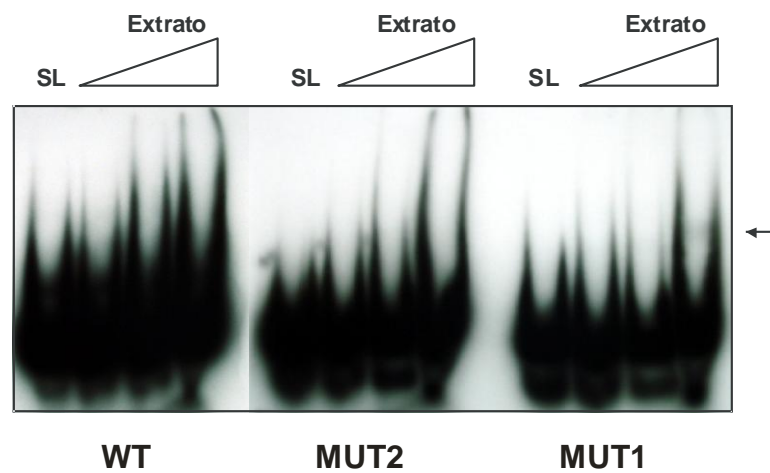


Figura 10 – Ensaio de retardo de mobilidade em gel empregando extrato protéico nuclear de café. A seta indica o ponto no gel onde houve a interação de proteínas nucleares de café com a sonda de DNA marcada radioativamente. Os triângulos indicam quantidades crescentes do extrato nuclear. SL – sonda livre. A sonda utilizada está discriminada na parte de baixo.

5.4. Análise *in silico* de sítios W-box em regiões promotoras putativas de genes ortólogos de *CaIRL*.

Com o intuito de identificar um possível padrão na organização dos sítios W-box nas regiões promotoras de genes ortólogos à IRL de café presentes em outras espécies de plantas, um levantamento em bancos de dados de genomas completos do TAIR e do Sol Genomics Network foi realizado. Com base nos melhores scores escolhemos um mínimo de três sequências representantes de cada espécie, as seguintes sequências foram identificadas nos genomas de arábidoopsis, tomate e batata: At4G39235.1, At4G34540.1, At1G19540.1, At1G75260.1, SGN-U242812, SGN-U217054, SGN-U215117, SGN-U274045, SGN-U273337, SGN-U271299, SGN-U274044, SGN-U271298. Usando as sequências 5' a montante do ponto +1 (início de transcrição), identificamos computacionalmente os possíveis W-box (região core) como representado na Figura 11.

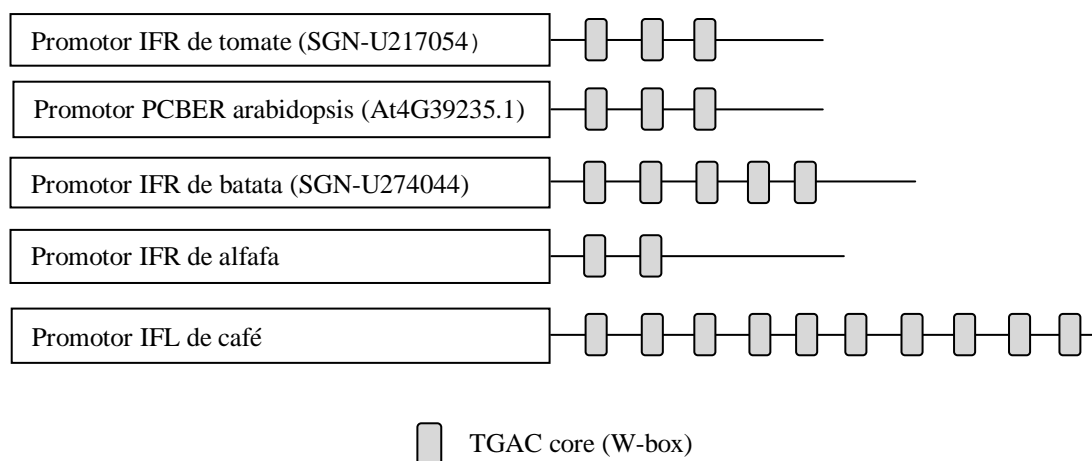


Figura 11 – Representação esquemática das regiões promotoras putativas de genes ortólogos a *CaIRL* mostrando o número de W-boxes (TGAC) em cada sequência encontrada. As sequências aqui apresentadas não guardam escala real de distância entre os sítios ou comprimento em pares de bases. A sequência do promotor de alfafa foi retirada de Oommen *et al.* (1994) e do promotor de café de Brandalise *et al.* (2009).

6. Discussão

Dentre os diversos genes relacionados com respostas de defesa e identificados como sendo regulados positivamente na interação entre plantas do gênero *Coffea spp.* e o fungo da ferrugem *H. vastatrix*, aqueles que codificam fatores de transcrição do tipo WRKY estão entre os mais representados (Fernandez *et al.*, 2004; Ramiro *et al.*, 2010).

Neste contexto, Ganesh e colaboradores (2006) investigaram o papel de um dos fatores de transcrição do tipo WRKY existentes em *C. arabica* na resistência a *H. vastatrix*. O gene *CaWRKY1* foi diferencialmente expresso em folhas de cafeeiros resistentes e suscetíveis inoculadas com o fungo, sendo sua expressão rapidamente aumentada nas plantas resistentes. Esta ativação ocorreu no período da entrada do fungo no estômato da planta, antes da ocorrência dos mecanismos fisiológicos que levam a resposta de hipersensibilidade.

Posteriormente, Petitot e colaboradores (2008), através de experimentos de *Southern blot* e análises filogenéticas, verificaram que o gene *CaWRKY1* estava representado no genoma de *C. arabica* por duas cópias homólogas, mas distintas, as quais denominaram *CaWRKY1a* e *CaWRKY1b*. Empregando PCR em Tempo-Real, os autores constataram que as cópias são expressas simultaneamente e com o mesmo nível de expressão durante a interação com o fungo *H. vastatrix* nas folhas do cafeeiro.

Em 2012, Diniz e colaboradores observam que após a infecção com *H. Vastatrix*, o gene *CaWRKY1* apresenta dois picos de ativação: o primeiro, que seria iniciado entre 6 a 12 h pós-infecção (hpi), e ocorre durante a penetração da hifa e a formação dos apressórios, com respostas em nível celular; e o segundo, que ocorre quando da diferenciação das células-mãe dos haustórios, em que as respostas foram registradas em mais de 50% das zonas de infecção (21 a 24 hpi).

Uma vez que *CaWRKY1* está relacionado com os membros do grupo de fatores WRKY do tipo IIb (WRKY6) de *Arabidopsis*, seria de se esperar que o mesmo

apresentasse funções correlatas ao seu homólogo na planta modelo. Os estudos de Robatzek & Somssich (2002) descrevem a participação de WRKY6 como regulador positivo e negativo da transcrição, atuando positivamente na expressão de um gene de defesa *PR-1* e do *Receptor do Tipo-Kinase (SIRK)* ligado a processos de sinalização de senescência foliar, e negativamente sobre seu próprio promotor. Analizando os promotores desses genes constatamos uma alta frequência de W-boxes, indicativo de uma provável funcionalidade dos mesmos nos processos regulatórios. No genoma de *Arabidopsis*, este mesmo box aparece 111 vezes nas duas fitas do DNA das regiões promotoras de 26 genes co-expressos com *PR-1*, numa média de 4,3 cópias por promotor (Maleck *et al.*, 2000). O promotor do gene *SIRK* contém nove W-boxes, e através de análises de deleções, mostrou-se que o WRKY6 ainda era capaz de ativar o gene repórter em uma construção contendo apenas dois dos nove boxes, enquanto mutações dentro destes boxes abolia completamente a sua capacidade de ativar o gene repórter (Robatzek & Somssich, 2002). Encontramos em nossas buscas *in silico* regiões promotoras de genes análogos a *IRL* de café portadoras de alguns sítios W-box em outras espécies de plantas não relacionadas, entretanto, nenhuma delas apresentou um número tão expressivo como a descrita por Brandalise e colaboradores (2009).

Genes candidatos que codificam fatores de transcrição envolvidos na regulação da biossíntese de isoflavonóides em *Lotus (Lotus japonicus)* foram examinados por análise de microarray a partir de tecido foliar induzido por glutatona. Trinta e nove famílias de fatores de transcrição foram identificadas, incluindo fatores WRKYs, sendo que 27 genes desta família em particular foram induzidos entre 3 e 6 horas. Estes dados sugerem um provável papel destes fatores na regulação geral da produção de fenilpropanóides quando em situações de estresse (Shelton *et al.*, 2012).

De acordo com as informações acima, o promotor do gene *CaIRL* demonstra características estruturais e genéticas bastante semelhantes aos promotores conhecidamente regulados por fatores de transcrição do tipo WRKY. Ao longo de sua região promotora é possível constatar a presença de inúmeros núcleos W-boxes, com configurações diversas. Mudanças pontuais de nucleotídeos também são observadas na sequência consensual de dois destes boxes (-545 e -501), as quais podem proporcionar um efeito aditivo na expressão dirigida pelo promotor (Ciolkowski *et al.*, 2008). A presença ou ausência destes elementos influi diretamente na expressão do gene repórter em plantas de tabaco transgênicas em situação de co-expressão com o fator CaWRKY1a. A deleção do fragmento contendo 7 sítios W-boxes na versão reduzida determinou uma redução drástica (ao menos 50%) na expressão relativa do repórter quando em presença de CaWRKY1a. No caso do promotor do gene *PcWRKY1* de salsa, por exemplo, os W-boxes múltiplos parecem ter um efeito sinérgico sobre a transcrição. Neste caso, um fragmento de 175 pb contendo 3 W-boxes seria responsável pela alta potência na resposta induzida pela interação fúngica (Eulgem *et al.*, 1999). Como já relatado, a deleção da região contendo os elementos W-box na versão reduzida do promotor *CaIRL* determina a perda de sua ativação em resposta a estresse mecânico (Brandalise *et al.*, 2009), mas a expressão por ele dirigida em condições normais é aumentada devido a eliminação de um possível elemento negativo de regulação.

7. Conclusão

O conjunto de resultados obtidos e apresentados nos permitem chegar as seguintes conclusões:

- a) o fator CaWRKY1 é capaz de transativar o promotor do gene *CaIRL* e;
- b) a presença dos W-boxes na região promotora em estudo é capaz de modular a intensidade da resposta.

8. Referências Bibliográficas

ABAD, P., FAVERY, B., ROSSO, M.N., SERENO, P.C. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.217-224, 2003.

ALMAGRO, L.; GÓMEZ ROS, L.V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELÓ, A.; PEDREÑO, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.377-390, 2009.

ASHIHARA, H.; ZHENG, X-Q; KATAHIRA, R. *et al.* Caffeine biosynthesis and adenine metabolism in transgenic *Coffea canephora* plants with reduced expression of *N*-methyltransferase genes. **Phytochemistry**, v.67, p.882-886, 2006.

BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; BELLES-BOIX, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamine. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.26224-26231, 1995.

BABU, M.M.; LAKSHMINARAYAN, M.L. BALAJI, S.; ARAVIND L. The natural history of the WRKY–GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.6505-6520, 2006.

BARBOSA, D.H.S.G.; VIEIRA, H.D.; SOUZA, R.M.; VIANA, A.P.; SILVA, C.P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v.28, p.49-54, 2004.

BARBOSA, A.E.A.D.; ALBUQUERQUE, E.V.S.; SILVA, M.C.M. *et al.* α -Amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits α -amylases from the coffee berry borer pest. **BMC Biotechnology**, v.10, p.1-8, 2010.

BELCHÍ-NAVARRO, S.; ALMAGRO, L.; SABATER-JARA, A.B. *et al.* Induction of trans-resveratrol and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited suspension cultured cells of *Vitis vinifera* cv Monastrell. **J. Plant Physiol.**, v.170, p.258-264, 2013.

BELLAFFIORE, S.; SHEN, Z.; ROSSO, M-N. *et al.* Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathogens**, v.4, p.1-12, 2008.

BERNARDS, M.A.; SUMMERHURST, D.K.; RAZEM, F.A. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. **Phytochemistry Reviews**, v.3, p.113-126, 2004.

BRANDALISE, M. Isolamento e caracterização de promotores tecido específico de raiz e folha de *Coffea arabica*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Genética), **Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, SP, 141 p., 2007.

BRANDALISE, M.; SEVERINO, F.E.; MALUF, M.P.; MAIA, I.G. 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.**, v.28, p.1699-1708, 2009.

CACAS, J-L.; PETITOT, A-S.; BERNIER, L. *et al.* Identification and characterization of the Nonrace specific Disease Resistance 1 (NDR1) orthologous protein in coffee. **Plant Biology**, v.11, p.1-17, 2011.

CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (eds). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford, UK, CABI Publishing, p. 529-579, 2005.

CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C. *et al.* Number of loci and gene action of short stature factors in *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v.43, p.425-442, 1984.

CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: CLARKE, J.R.; MACRAE, R. (eds) **Coffee: Agronom.** Elsevier Applied Science, v.04, p.129-166, 1988.

CARVALHO, C.H.S.; REZENDE, J.C.; ALMEIDA, G.R.R.; TEIXEIRA, J.B.; PADILHA, L. Características agronômicas e morfológicas de cafeeiro 'Catuaí Vermelho' propagado por embriogênese somática. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.46, p.378-383, 2011.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILSON, K.C. (eds) *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. **Croom Helm: London**, p.13-14, 1985.

CHITTOOR, J.M.; LEACH, J.E.; WHITE, F.F. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.10, p.861-871, 1997.

CIB – CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA (Artigo de autoria: ISAAA (Instituto de Serviços de Aquisição de Aplicações Biotecnológicas Agrícolas). Adoção e consumo de transgênicos no mundo. <http://cib.org.br/biotec-de-a-a-z/publicacoes/guia-o-que-voce-precisa-saber-sobre-transgenicos/adocao-e-consumo/>. Acesso em 15/01/2013.

CIOLKOWSKI, I.; WANKE, D.; BIRKENBIHL, R.P.; SOMSSICH, I.E. Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. **Plant Mol. Biol.**, v.68, p.81-92, 2008.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Responsáveis Técnicos: Silvio Isopo Porto; Aroldo A. de Oliveira Neto; Airton C. P. da Silva; Eledon P. de Oliveira - Gerência de Levantamento e Avaliação de Safra – GEASA). Terceira estimativa da safra brasileira de café setembro/2012. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_10_10_21_boletim_cafe_-_setembro_2012.pdf

CORNEJO, M-J.; LUTH, D.; BLANKENSHIP, K.M. *et al.* Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. **Plant Molecular Biology**, v.23, p. 567-581, 1993.

CRAMER, C.L.; BOOTHE, J.G.; OISHI, K.K. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.240, p.95-118, 1999.

CROS, J.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P. *et al.* Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. **Mol. Phylogen. and Evol.**, v.9, p.109-117, 1998.

COSTA, M.J.N.; ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E.T.; PEREIRA, A.A. Resistência de progênies de café Catimor à ferrugem. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.121-130, 2007.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.1-20, 1996.

DELANNOY, E.; JALLOUL, A.; ASSIGBETSÉ, K. *et al.* Activity of Class III Peroxidases in the Defense of Cotton to Bacterial Blight. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, p.1030-1038, 2003.

DE NARDI, B.; DREOS, R.; DEL TERRA, L. *et al.* Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, v.49, p.1594-605, 2006.

DINIZ, I.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.G. *et al.* Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. **Eur. J. Plant Pathol.**, v.133, p.141-157, 2012.

- DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; GANG, D.R.; DAVIN, L.B. *et al.* (+) pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.29473-29482, 1996.
- DIXON, R.A.; STEELE, C.L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. **Trends in plant science**, v.4, p.394-400,1999.
- DIXON, R.A.; ACHNINE, L.; KOTA, P. *et al.* The phenylpropanoid pathway and plant defense - a genomics perspective. **Mol. Plant Pathol.**, v.3, p.371-390, 2002.
- DIXON, R.A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v.60, p.205-211, 2002.
- DIXON, R.A.; XIE, D.Y.; SHARMA, S.B. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? **New Phytol.**, v.165, p.9-28, 2005.
- EGEA, C.; AHMED, A.S.; CANDELA, M. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. **J. Plant Physiol.**, v.158, p.151-158, 2001.
- EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; SCHMELZER, E. *et al.* Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **EMBO J.** v.18, p.4689-4699, 1999.
- EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; ROBATZEK, S. *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**, v.5, p.199-206, 2000.
- FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C. *et al.* Coffee (*Coffea arabica* L) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Mol. Plant Pathol.**, v.5, p.527-536, 2004.

FERRER, J-L.; AUSTIN, M.B.; STEWART JUNIOR. C.; NOEL, J.P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiol. Biochem.**, v.46, p.356-370, 2008.

GANESH, D.; PETITOT, A.-S.; SILVA, M.C. *et al.* 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**, v.170, p.1045-1051, 2006.

GANG, D.R.; KASAHARA, H.; XIA, Z.Q. *et al.* Evolution of plant defense mechanisms: relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.7516-7527, 1999.

GARÇON, C.L.P.; ZAMBOLIM, L.; MIZUBUTI, E.S.G. *et al.* Controle da ferrugem do cafeeiro com base no valor de severidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.486-491, 2004.

GONÇALVES, W.; RAMIRO, D. A.; GALLO, P. B.; GIOMO, G. S. Manejo de nematóides na cultura do cafeeiro. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO – CAFÉ, 10. **Anais da X Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**. Mococa: Instituto Biológico, p.48-66, 2004.

GONZÁLEZ DE COLMENARES, N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R.; ALDANA, J.O. *et al.* Isolation, characterization and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, p.368-372, 1998.

GOULD, K.S.; MCKELVIE, K.; MARKHAM, R. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.1261-1269, 2002.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H. *et al.* Regulation of gene transcription In: **Modern Genetic Analysis**. 3rd edition, W.H. Freeman and Company, New York, NY, 2000.

GUZZO, S.D. Aspectos Bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese (Doutorado em Ciências, Energia Nuclear na Agricultura), **Universidade de São Paulo**, Piracicaba, SP, 236 p., 2004.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.55, p.481-504, 2000.

HEIN, L.; GATZWEILER, F. The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. **Ecological Economics**, v.02423, p.1-10, 2005.

HENRIKSEN, A.; WELINDER, K.G.; GAJHEDE, M. Structure of Barley Grain Peroxidase Refined at 1.9-Å Resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.2241-2248, 1998.

HINNIGER, C.; CAILLET, V., MICHOUX, F. *et al.* Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. **Annals of Botany**, v.97, p.755-765, 2006.

HIRAGA, S.; ITO, H.; YAMAKAWA, H. *et al.* An HR-Induced Tobacco Peroxidase Gene is Responsive to Spermine, but Not to Salicylate, Methyl Jasmonate, and Ethephon. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.210-216, 2000.

HONG, J.K.; LEE, S.C., HWANG, B.K. Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. **Gene**, v.356, p.169-180, 2005.

JIN, J.; HEWEZI, T.; BAUM, T.J. Arabidopsis peroxidase AtPRX53 influences cell elongation and susceptibility to *Heterodera schachtii*. **Plant Signal. & Behav.**, v.6, p.1778-1786, 2011.

KARTHIKEYAN, A.S.; VARADARAJAN, D.K.; MUKATIRA, U.T. *et al.* Regulated Expression of Arabidopsis Phosphate Transporters. **Plant Physiology**, v.130, p.221-233, 2002.

KIM, T.K.; KIM, S.G.; HWANG, D.H. *et al.* Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Proteomics**, v.4, p.3569-3578, 2004.

KIM, S.G.; KIM, S.T.; WANG, Y. *et al.* Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (*OsIRL*) confers tolerance to reactive oxygen species. **Physiol. Plant.**, v.138, p.1-9, 2010.

KORIMBOCUS, J.; COATES, D.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **J. Virol. Meth.**, v.103, p.109-20, 2002.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, K.V.; RAMAKRISHNA, A.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G.A. Evidence for localization of *N*-methyltransferase (MMT) of caffeine biosynthetic pathway in vacuolar surface of *Coffea canephora* endosperm elucidated through localization of GUS reporter gene driven by NMT promoter. **Current Science**, v.93, p.383-385, 2007.

LAGRIMINI, L.M.; JOLY, R.J.; DUNLAP, J.R. *et al.* The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. **Plant Mol. Biol.**, v.33, p.887-895, 1997b.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J. *et al.* Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol. Gen. Genet.**, v.261, p.259-266, 1999.

LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B. *et al.* Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v.100, p.139-146, 2000b.

LASHERMES, P.; PACZEK, V.; TROUSLOT, P. *et al.* Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* × *C. canephora*. **J. Hered.**, v.91, p.81-85, 2000a.

LASHERMES, P.; COMBES, M-C.; RIBAS, A. *et al.* Genetic and physical mapping of the SH3 region that confers resistance to leaf rust in coffee tree (*Coffea arabica* L.). **Tree Genetics & Genomes**, v.6, p.973-980, 2010.

LEROY, T.; HENRY, A.M.; ROYER, M. *et al.* Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Rep.**, v.19, p.382-389, 2000.

LERS, A.; BURD, S.; LOMANIEC, E.; DROBY, S.; CHALUTZ, E. The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation. **Plant Mol. Biol.**, v.36, p.847-856, 1998.

LEVY, M.; EDELBAUM, O.; SELA, I. Tobacco mosaic virus regulates the expression of its own resistance gene N. **Plant Physiology**, v.135, p.2392-2397, 2004.

- LIU, G.; SHENG, X.; GREENSHIELDS, D.L. *et al.* Profiling of Wheat Class III Peroxidase Genes Derived from Powdery Mildew-Attacked Epidermis Reveals Distinct Sequence-Associated Expression Patterns. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p.730-741, 2005.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.
- LÓPEZ-MEYER, M. & PAIVA, N.L. Immunolocalization of vestitona reductas and isoflavone reductase, two enzymes involved in the biosynthesis of the phytoalexin medicarpin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, p.15-30, 2002.
- MA, J.K-C.; DRAKE, P.M.W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Genetics**, v.04, p.794-805, 2003.
- MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T. *et al.* The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics**, v.26, p.403-410, 2000.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Fundo de Defesa da Economia Cafeeira – FUNCAFÉ). Relatório de atividades 2011. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/10810_relatorio_de_atividades_do_funcaf_e_2011.pdf
- MARRACCINI, P.; DESHAYES, A.; PÉTIARD, V.; ROGERS, J.W. Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.37, p.273-282, 1999.
- MERZLYAK, M.N.; MELO, T.B.; NAQVI, R. 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**, v.60, p.1-11, 2008.

MIAO, Y.; DING, Y.; SUN, Q-Y.; XU, Z-F.; JIANG, L. Plant Bioreactors for Pharmaceuticals. **Biotech. and Gen. Eng. Rev.**, v.25, p.363-380, 2008.

MISHRA, M.K.; SLATER, A. Recent Advances in the Genetic Transformation of Coffee. **Biotechnology Research International**, v.2012, p.1-17, 2012.

MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P.; CASTAGNONE-SERENO, P. *et al.* Diversity of *Meloidogyne exigua* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations from coffee and rubber tree. **Nematology**, v.10, p.897-910, 2008.

NAOUMKINA, M.A.; HE, X.Z.; DIXON, R.A. Elicitor-induced transcription factors for metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. **BMC Plant Biology**, v.8, p.1-14, 2008.

OOMMEN, A.; DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. The elicitor-inducible alfalfa isoflavone reductase promoter confers different patterns of developmental expression in homologous and heterologous transgenic plants. **Plant Cell**, v.6, p.1789-1803, 1994.

PADIDAM, M. Chemically regulated gene expression in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.6, p.169-177, 2003.

PAIVA, N.L.; EDWARDS, R.; SUN, Y.; HRAZDINA, G.; DIXON, R.A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Molecular cloning and expression of alfalfa isoflavone reductase, a key enzyme of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. **Plant Mol. Biol.**, v.17, p.653-667, 1991.

PEREMARTI, A.; TWYMAN, R.M.; GÓMEZ-GALERA, S. *et al.* Promoter diversity in multigene transformation. **Plant Mol. Biol.**, v.73, p.363-378, 2010.

PETERS, N.K; FROST, J.W.; LONG, S.R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, v.233, p.977-980, 1986.

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**, v.4, p.379–390, 2008.

PETRUCCO, S.; BOLCHI, A., FORONI, C. *et al.* A maize gene encoding an NADPH binding enzyme highly homologous to isoflavone reductases is activated in response to sulfur starvation. **Plant Cell**, v.8, p.69-80, 1996.

PINHEIRO, H.A.; DA MATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; FONTES, E.P.B.; LOUREIRO, M.E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v.167, p.1307-1314, 2004.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G. *et al.* Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v.3, p.29-60, 2004.

RAMIRO, D. JALLOUL, A. PETITOT, A-S. *et al.* Identification of coffee WRKY transcription factor genes and expression profiling in resistance responses to pathogens. **Tree Genetics & Genomes**, v.6, p.767-781, 2010.

RANCÉ, I.; NORRE, F.; GRUBER, V. *et al.* Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. **Plant Science**, v.162, p.833-842, 2002.

RAUYAREE, P.; CHOI, W.; FANG, E. *et al.* Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant Pathology**, v.2, p.347-354, 2001.

REDMOND, J.W.; BATLEY, M.; DJORDJEIC, M.A. *et al.* Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, v.323, p.632-635, 1986.

- RIBAS, A.F.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Production of Herbicide-Resistant Coffee Plants (*Coffea canephora* P.) via *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.11-19, 2006.
- RIESEBERG, L.H.; BAIRD, S.J.E.; GARDNER, K.A. Hybridization, introgression, and linkage evolution. **Plant Mol. Biol.**, v.42, p.205-224, 2000.
- RODRIGUES JUNIOR, C.J.; GONÇALVES, M.M.; VÁRZEA, V.M.P. Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. **Revista de Ciências Agrárias**, v.27, p.203-216, 2004.
- ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. **Plant J.**, v.18, p.123-133, 2001.
- ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. **Genes Dev.**, v.16, p.1139-1149, 2002.
- RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Curr Opin Plant Biol**, v.1, p.311-315, 1998.
- RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.
- SAIKIA, R.; KUMAR, R.; ARORA, D.K. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* inducing rice resistance against *Rhizoctonia solani*: Production of salicylic acid and peroxidases. **Folia Microbiologica**, v.51, p.375-380, 2006.
- SANTOS-BRIONES, C.; HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S.M.T. Coffee biotechnology. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.18, p.217-227, 2006.

SATYANARAYANA, K.V.; KUMAR, V.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G.A. Isolation of promoter for N-methyltransferase gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. **Journal of Biotechnology**, v.119, p.20-25, 2005.

SERA, G.H.; SERA, T.; FONSECA, I.C.B.; ITO, D.S. Resistance to leaf rust in coffee cultivars. **Coffee Science**, v.5, p.59-66, 2010.

SEVERINO, F.E. Isolamento e caracterização de um gene que codifica uma isoflavona redutase like de café (*Coffea arabica* L.) e análise de sua região promotora. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Genética), **Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, SP, 119 p., 2008.

SHELTON, D.; STRANNE, M.; MIKKELSEN, L. *et al.* Transcription factors of Lotus: Regulation of isoflavonoid biosynthesis requires coordinated changes in transcription factor activity. **Plant Physiology**, v.159, p.531-547, 2012.

SHIMADA, N.; AKASHI, T.; AOKI, T.; AYABE, S. Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. **Plant Sci.**, v.160, p.37-47, 2000.

SHOJI, T.; WINZ, R.; IWASE, T. *et al.* Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. **Plant Mol. Biol.**, v.50, p.427-440, 2002.

SILVA, M.C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES JUNIOR, C.J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiol. and Mol. Plant Pathol.**, v.60, p.169-183, 2002.

- SILVA, M.C.; VÁRZEA, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L. *et al.* Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.18, p.119-147, 2006.
- SIMONETTI, E.; PASQUA, V.; MELILLO, M.T. *et al.* Analysis of Class III Peroxidase Genes Expressed in Roots of Resistant and Susceptible Wheat Lines Infected by *Heterodera avenae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, p.1081-1092, 2009.
- SIVAMANI, E.; QU, R. Expression enhancement of a rice polyubiquitin gene promoter. **Plant Mol. Biol.**, v.60, p.225-239, 2006.
- TIAN, L.; WUB, K.; HANNAMA, C. *et al.* Analysis and use of the tobacco eIF4A-10 promoter elements for transgene expression. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.1355-1366, 2005.
- ULKER, B.; SOMSSICH, I.E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. **Curr Opin Plant Biol**, v.7, p.491-498, 2004.
- VAN DER VOSSSEN, H.A.M. Agronomy I: Coffee Breeding Practices. In: CLARKE, R.J.; VITZTHUM, O.G. (eds) **Coffee Recent Developments**, Blackwell Science Ltd: London, p.184-201, 2001.
- VAN ELDIK, G.J.; RUITER, R.K.; COLLA, P.H.W.N. *et al.* Expression of an isoflavone reductase-like gene by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*. **Plant Mol. Biol.**, v.33, p.923-929, 1997.
- VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T. *et al.* Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Mol. Biol. Reporter**, v.12, p.245-264, 1994.

- VIDAL, R.O.; MONDEGO, J.M.C.; POT, D. *et al.* A High-Throughput Data Mining of Single Nucleotide Polymorphisms in *Coffea* Species Expressed Sequence Tags Suggests Differential Homeologous Gene Expression in the Allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiol.**, v.154, p.1053-1066, 2010.
- VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A. *et al.* Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.18, p.95-108, 2006.
- WALDEN, R.; WINGENDER, R. Gene-transfer and plant regeneration techniques. **Trends Biotechnology**, v.13, p.324-331, 1995.
- WANG, X.; HE, X.; LIN, J. *et al.* Crystal Structure of Isoflavone Reductase from Alfalfa (*Medicago sativa* L.). **J. Mol. Biol.**, v.358, p.1341-1352, 2006.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v.5, p.218-223, 2002.
- ZAMBOLIM, L.; DO VALE, F.X.R. Estratégias múltiplas no manejo integrado de doenças do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.137-153, 2003.
- ZÁMOCKÝ, M.; JANECEK, S.; KOLLER, F. Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. **Gene**, v.256, p.169-182, 2000.