

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO PROMOTOR FRUTO-ESPECÍFICO DO GENE *CALTP1* DE *COFFEA ARABICA*¹

Michelle Guitton Cotta²; Leila Maria Gomes Barros³; Juliana Dantas de Almeida³; Daiene Bittencourt Mendes Santos⁴; Mariana Soares Abreu⁴; Éder Alves Barbosa⁵; Felipe Vinecky⁵; Alan Carvalho Andrade³; Pierre Marraccini⁶

¹ Trabalho financiado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN.

² Mestranda, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, michellecotta@yahoo.com.br

³ Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF,

⁴ Bolsista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

⁵ Doutorando, M. Sc., Universidade Brasília – UnB, Brasília – DF.

⁶ Pesquisador, PhD, CIRAD AGAP, Montpellier – FR.

RESUMO: A disponibilidade de promotores endógenos, não patenteados, que regulem a expressão do transgenes de forma limitada espacial e temporalmente é uma valiosa ferramenta para programas de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar o promotor fruto específico do gene *CALTP1* (que codifica uma proteína de transferência de lipídeos - LTP) de *Coffea arabica*. Por meio de análises *in silico* baseadas nas seqüências do banco de dados do genoma café, foram encontrados 40 *Unigenes* preferencialmente expressos em fruto que poderiam ser utilizados como sonda na prospecção de seus respectivos promotores. Usando como critérios o nível de expressão e o ineditismo, o gene *CALTP1* foi escolhido para a validação experimental por meio das técnicas de Northern blot e RT-qPCR. Os resultados demonstram que esse gene tem expressão preferencial no endosperma dos frutos aos 120 e 180 dias após o florescimento (DAF). O isolamento do promotor desse gene foi feito por meio da estratégia 5' RACE. Um fragmento de 1.2 kb foi isolado do DNA genômico de *C. arabica* var. Catuaí amarelo e três fragmentos menores (1.0, 0.78 e 0.4 kb) oriundos de supressões 5' do fragmento genômico foram produzidos. Esses fragmentos foram clonados em vetores binários e transformados na planta modelo *Nicotiana tabacum* para análises de expressão envolvendo o gene repórter *uidA* codificando para a β -glucuronidase (GUS). Os resultados das análises histoquímicas de atividade GUS mostram que os fragmentos de 1.2, 1.0 e 0.78 kb direcionam a expressão para todos os órgãos testados da planta com diferenças no nível de atividade e, todos os três fragmentos promovem expressão baixa ou nula em raízes. Por outro lado, o fragmento menor de 0.4 kb levou a expressão do gene *uidA* somente nas sementes, tecidos florais e frutos.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *CALTP1*, promotor fruto-específico, GUS, *Nicotiana tabacum*.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FRUIT SPECIFIC PROMOTER FOR *CALTP1* GENE IN *COFFEA ARABICA*¹

ABSTRACT: The availability of endogenous promoters, unpatented, regulating the expression of transgenes in a limited space and time is a valuable tool for breeding programs. The aim of this work was to isolate and characterize the fruit specific promoter of the *CALTP1* gene (which encodes a putative lipid transfer protein) from *Coffea arabica*. *In silico* analysis based on sequences of the coffee genome database, 40 *Unigenes* found preferentially expressed in fruit that could be used as probe in the exploration of their respective promoters. Using as criteria the level of expression and originality, the *CALTP1* was chosen for experimental validation by using the techniques of Northern blot and RT-qPCR. The results demonstrate that this gene is expressed preferentially in the endosperm of fruits at 120 and 180 days after flowering (DAF). Isolation of the *CALTP1* promoter was made through the 5' RACE strategy. A fragment of 1.2 kb genomic DNA was isolated from *C. arabica* cv. 'Yellow Catuaí' and three smaller fragments (1.0, 0.78 and 0.4 kb) deletions from the 5' genomic fragment were produced. These fragments were cloned into binary vectors and transformed in the model plant *Nicotiana tabacum* for expression analysis involving the *uidA* reporter gene coding for the β -glucuronidase (GUS). The results of the histochemistry of GUS activity showed that the fragments of 1.2 kb, 1.0 kb and 0.78 kb direct the expression for all tested plant organs with differences inactivity level, and all three fragments promote low or null expression in roots. On the other hand, the smaller fragment of 0.4 kb led to the expression of the *uidA* gene only in seeds, fruit and floral buds.

Keywords: *Coffea arabica*, *CALTP1*, fruit-specific promoter, GUS, *Nicotiana tabacum*.

INTRODUÇÃO

Proteínas de transferência de lipídeos (LTPs) são proteínas básicas, subdivididos em duas famílias que apresentam massas moleculares de cerca de 7 e 10 kDa, presentes em altas quantidades (podem representar até 4% das proteínas solúveis) em plantas superiores. Tais peptídeos catiônicos foram denominados como LTPs devido à capacidade de se ligar reversivelmente e transportar moléculas hidrofóbicas, e desse modo, aumentam a transferência de

fosfolípidos entre membranas *in vitro*. Ambas subfamílias possuem padrão de conservação de oito resíduos de cisteína e suas estruturas tridimensionais revelam uma cavidade interna hidrofóbica que compreende o sítio de ligação de lípidos. Com base no crescente conhecimento sobre a estrutura, expressão do gene e regulação da atividade *in vitro*, acredita-se que essas moléculas desempenham um papel chave nos processos fisiológicos da planta. Embora a função deste peptídeo ainda não esteja completamente elucidada o isolamento de cDNA de vários genes revelaram a presença de um peptídeo sinal que indicam que LTPs estariam envolvidas em vias secretórias. Essas proteínas mostraram-se localizadas e secretadas nas paredes celulares. Assim, novos papéis foram sugeridos para LTPs nas plantas: participação na formação da cutina, embriogênese, reações a fitopatógenos, simbiose e adaptação de plantas a diferentes condições ambientais. Essas sugestões precisam ainda ser validadas para que se possa elucidar o papel dessa família integrante das proteínas vegetais (Kader, 1996; Carvalho & Gomes, 2007).

O promotor compreende por definição a região 5' a montante da sequência a ser transcrita podendo se estender por algumas centenas de pares de bases (pb). É o processador central da expressão de um gene uma vez que contém os sítios de ligação para os fatores de transcrição (TFs) e para a RNA polimerase responsável pela transcrição gênica. Os elementos *cis* de regulação normalmente determinam o ponto correto de início da transcrição, bem como o local e o momento em que o processo biológico deverá ocorrer, isto é, são importantes no controle do perfil de expressão global de um gene de forma que direcionam ou previnem a transcrição. Os processos que proporcionam a modulação transcricional são complexos e envolvem uma rede de interações dos elementos presentes tanto na região do promotor mínimo como em regiões distais.

Destacam-se entre os promotores usualmente empregados na produção de plantas geneticamente modificadas, o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV 35S), os promotores dos genes que codificam respectivamente a nopalina sintetase (NOS) e a octopina sintetase (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens* e o promotor do gene que codifica a ubiquitina (Ubi-1) de milho. Estudos mostraram que a expressão da construção pUbi-1::CAT (cloranfenicol acetil transferase) foi dez vezes maior em protoplastos de milho do que o 35S::CAT, mas foi dez vezes menor em protoplastos de tabaco que o 35S::CAT, limitando o seu potencial de uso para os cereais monocotiledôneos (Gupta *et al.*, 2001). A maioria dos organismos transgênicos relatados na literatura utiliza promotores constitutivos. Entretanto, além das restrições econômicas e ambientais relacionadas à expressão indiscriminada de genes heterólogos pode haver divergência de expressão ao utilizar um mesmo promotor dentro do grupo das angiospermas, pois há muitas vezes diferenças no nível de expressão para mono e dicotiledôneas e, do mesmo modo, pode não existir garantia de que esses reguladores se comportem da forma desejada em plantas perenes e anuais.

Promotores órgão/tecido-específicos já têm sido isolados em diferentes espécies vegetais e até mesmo sinteticamente construídos para esse fim (Rushton *et al.*, 2002). A utilização de promotores endógenos preferencialmente expressos nos frutos de café se mostra necessário, visto que, o cafeeiro possui a maturação não uniforme, pragas específicas de fruto e a qualidade da bebida está diretamente relacionada às proteínas expressas na semente. A produção comercial de café está baseada principalmente na espécie *C. arabica* que é tetraplóide, perene e possui baixa variabilidade genética, o que dificulta o melhoramento por métodos tradicionais. Assim, a engenharia genética se destaca como uma boa maneira para obter plantas de café com genótipos superiores em menor espaço de tempo adequadas para diversos fins. A disponibilidade de amplo espectro de promotores que regulem padrões de expressão temporal e espacial de diferentes maneiras tende a aumentar o sucesso da tecnologia dos transgênicos e é de grande importância para a cultura do café.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Amostras dos órgãos raiz, folha e fruto de *C. arabica* (var. Catuaí amarelo e IAPAR59[I59]) bem como dos principais tecidos que compõem os frutos em desenvolvimento (pericarpo, perisperma e endosperma) foram coletados (Embrapa CENARGEN, Embrapa CPAC e cedidas pelo Funprocafé – Varginha, MG) em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para extração de RNA total, isolamento do RNAm e síntese de cDNA por transcrição reversa.

Análise *in silico* e seleção de Unigenes candidatos a fruto-especificidade

Baseado nos *Unigenes* do Banco de dados do projeto genoma café (Mondego *et al.*, 2011), bibliotecas de EST de fruto nos estágios iniciais foram agrupadas e contrastadas pelo Teste Exato de Fisher contra outras bibliotecas de tecidos e condições que não representassem a condição do grupo fruto. Os *Unigenes* que apresentaram padrão de expressão máxima no grupo fruto e mínima no grupo não fruto foram selecionados para validações experimentais por RT-qPCR e Northern blot.

Validação e caracterização experimental do gene *CALTP1*

Northern blot

Raízes, folhas e frutos foram utilizados para extração dos RNAs totais (Jones *et al.*, 1985). Os tecidos foram macerados em N₂ líquido e solubilizados em tampão apropriado para remoção das proteínas. Após centrifugação, recuperou-se a fase aquosa rica em DNA e RNA na qual foi adicionado LiCl. O Lítio promove uma precipitação preferencial do RNA que é finalmente recuperado por centrifugação. Depois de isolado, o RNA total foi fracionado por eletroforese em gel desnaturante e transferido a vácuo para membrana de náilon. A membrana foi hibridizada com um fragmento do gene *CALTP1* marcado com ³²P.

RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR utilizou curva de eficiência de amplificação, conforme recomendado pela Applied Biosystems (CA, USA) para o transcrito em estudo. O gene da Ubiquitina (Barsalobres-Cavallari *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2009) foi utilizado como controle endógeno para a normalização das amostras. O cálculo de quantificação relativa foi feito pelo método Ct calculado pela fórmula $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ onde E representa a eficiência dos primers (Ramakers *et al.*, 2003). As análises de quantificação relativa seguiram os mesmos parâmetros de ciclagem e coleta de dados das amostras utilizados para gerar a curva de eficiência de amplificação. Os resultados foram analisados pelo programa Sequence Detection (Applied Biosystems, CA, USA). As reações de PCR foram realizadas, em termociclador 7500 FAST Real Time System (Applied Biosystem, Foster, CA, USA), utilizando SYBR green fluorochrom (SYBRGreen qPCR Mix-UDG/ROX, Invitrogen), conforme recomendações do fabricante.

Isolamento de fragmentos promotores, construção dos vetores de expressão e transformação de planta modelo

O promotor foi isolado pelo método 5'RACE utilizando o kit Genome Walker Universal kit (Clontech). Um fragmento de 1.2 kb e três versões truncadas de 0.4, 0.78 e 1.0 kb foram isolados começando a partir do primeiro códon ATG da proteína a fim de analisar o perfil de expressão dos diferentes módulos. As seqüências foram analisadas *in silico* (através do programas PlantCare, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Cassetes de expressão com as quatro versões promotoras foram clonadas no vetor binário PBI 121 substituindo o promotor 35S, que regula o gene *uidA* que codifica para a β -glucuronidase (GUS). Os vetores binários construídos foram utilizados para transformar *N. tabacum* através de *Agrobacterium tumefaciens*.

Ensaio para detecção da tecido-especificidade dos promotores isolados

Para monitoramento da atividade enzimática da β -glucuronidase foram realizados ensaios histoquímicos segundo o protocolo descrito por Jefferson *et al.* (1987) e modificado por Guivarc'H *et al.* (1996). Segmentos foliares, raízes jovens e frutos de café foram colocados em solução contendo o substrato da enzima 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronídeo (X-glucA): tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7.0, ferricianeto de potássio 3 mM, ferrocianeto de potássio 3 mM, EDTA 10 mM pH 7.0, X-glucA 2 mM dissolvido em 500 μ L de DMSO. O tecido foi incubado nesta solução durante 16 h a 37°C. Em seguida, o tecido em análise foi transferido para solução de etanol 70% durante 48 h com trocas aleatórias do etanol 70%, para a extração da clorofila o que facilitou a observação da coloração azul



Figura 1 - Representação esquemática da metodologia utilizada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da validação experimental apresentam o gene *CALTP1* como fruto-específico pela técnica de Northern blot (Figura 2A) e preferencialmente expresso em fruto pela técnica de RT-qPCR, visto que, no último caso expressão basal foi encontrada também nos tecidos de folha e raiz (Figura 2B). Isto pode se explicar pela maior

sensibilidade da segunda técnica se comparada à primeira. Apesar disso, os níveis de expressão relativa evidenciam que a expressão de *CALTP1* nos frutos é 245 vezes e 145 vezes maior do que o encontrado nas folhas e raízes o que permite classificá-lo como um gene fruto -específico.

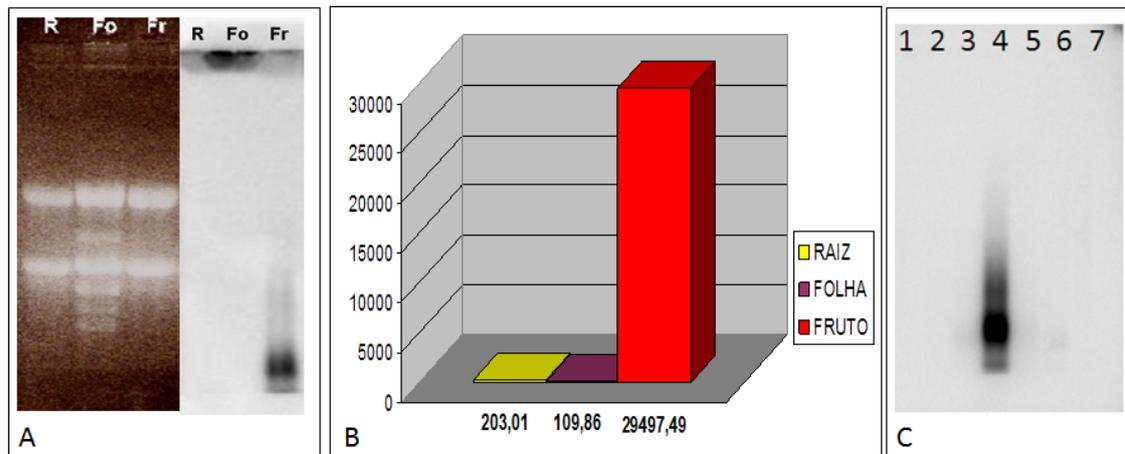


Figura 2 - Validação e caracterização de *CALTP1* como fruto-específico. A: Northern blot com a sonda *CALTP1* e gel desnaturante 1.5% com amostras de raiz (R), folhas (Fo) e fruto (Fr, 120 dias após o florescimento - DAF) de *C. arabica* var. I59. B: Expressão quantitativa de *CALTP1* em raiz, folha e fruto de *C. arabica* var. I59 pela técnica de RT-qPCR. C: Resultado da expressão do gene *CALTP1* nos estágios de desenvolvimento do fruto de *C. arabica* var. I59 após o florescimento (1) 30, (2) 60, (3) 90, (4) 120, (5) 150, (6) 180 e (7) 210 DAF.

A caracterização temporal do gene *CALTP1* através da técnica de Northern blot destaca uma expressão pontual do gene nos frutos de 120 Dias Após a Floração (DAF) (Figura 2C). Por outro lado, a técnica de Real time PCR evidencia dois picos de expressão aos 120 e 180 DAF sempre no tecido do endosperma (Figura 3).

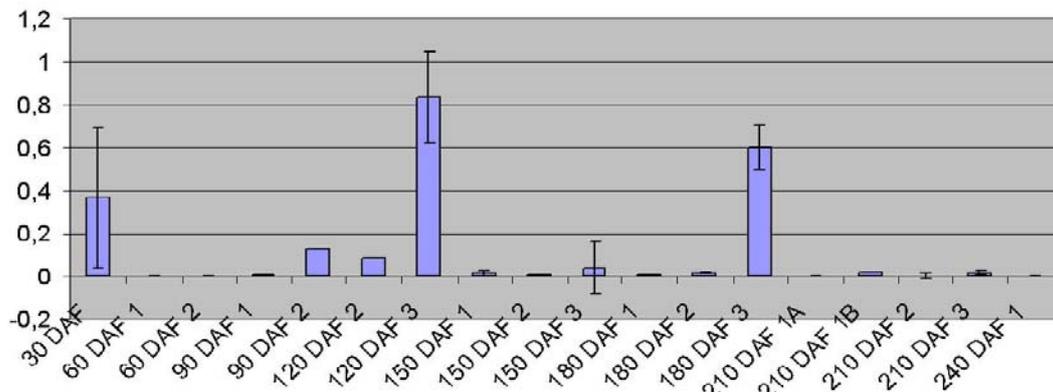


Figura 3 - Expressão relativa tecido-temporal de *CALTP1* durante o desenvolvimento de frutos de *C. arabica* var. Catuaí vermelho (1) Pericarpo; (2) Perisperma; (3) Endosperma. Picos de expressão no endosperma de frutos de café com 120 e 180 Dias Após o Florescimento (DAF).

O pico de expressão do gene *CALTP1* presente aos 180 DAF no resultado de RT-qPCR (Figura 3) e ausente no resultado de Northern blot (Figura 2C) pode ser avaliada (a) pela técnica, onde a sensibilidade do Real Time PCR possibilitou verificar esse nível de expressão; (b) Por diferenças de expressão do gene entre cultivares, no Northern blot foi utilizado o cultivar I59 e no RT-qPCR o Catuaí amarelo; (c) Por diferenças na influencia ambiental das plantas analisadas já que o cultivar I59 estava em contato direto com a luz solar e o Catuaí vermelho encontrava-se em região sombria no momento da coleta do material vegetal. Apesar dessa variação, esse período de expressão é condizente com dados da literatura, os quais sugerem um período de maior expressão da LTP, no fruto, entre 160 e 200 DAF (Salmona *et al.*, 2007). Como em outras plantas, o endosperma de café é um tecido triploide. As paredes celulares do endosperma começam a engrossar no período entre 130 e 190 DAF. Esse período corresponde a uma fase de armazenamento quando intensa expressão gênica é observada (De Castro & Marraccini, 1999).

Quatro fragmentos promotores foram amplificados e montados para que a seqüência promotora completa do gene *CALTP1* fosse utilizada para amplificar novos fragmentos (0,4, 0,78, 1,0 e 1,2 kb) que representassem versões truncadas do promotor fruto-específico (Figura 4).

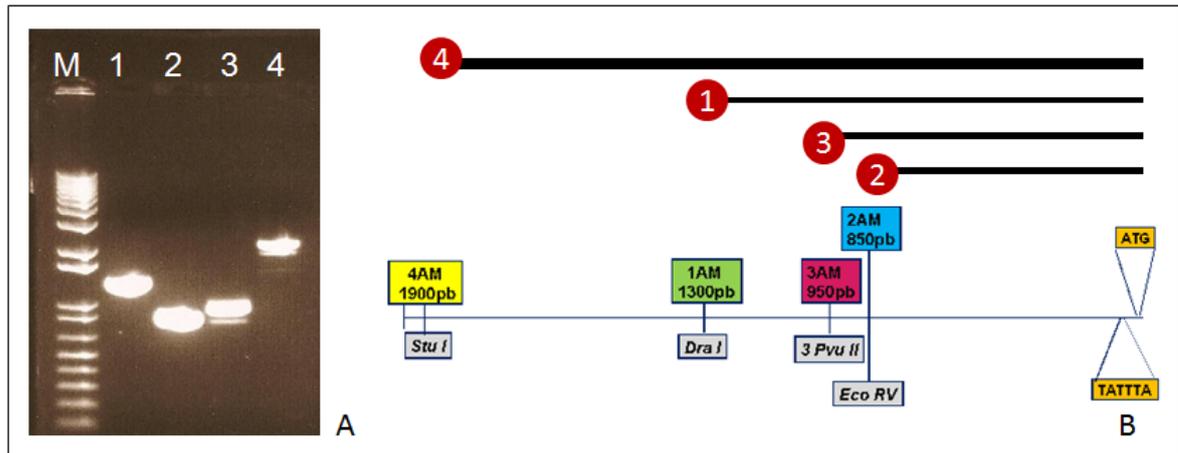


Figura 4 - Isolamento do promotor de *CALTP1*. Migração eletroforética de fragmentos obtidos a partir das bibliotecas do kit Genome Walker. M: 1 Kb DNA ladder, 1: 1AM, 2: 2AM, 3: 3AM, 4:4AM

Os fragmentos promotores foram clonados em vetores binários e transformados na planta modelo *N. tabacum* para análises de expressão envolvendo o gene repórter *uidA*. As análises histoquímicas de atividade GUS mostram que os fragmentos de 1.2, 1.0 e 0.78 kb direcionam a expressão para todos os órgãos testados da planta com diferenças no nível de atividade e, todos os três fragmentos promovem expressão baixa ou nula em raízes. Por outro lado, o fragmento menor de 0.4 kb levou a expressão do gene *uidA* somente nas sementes, tecidos florais e frutos (Figura 5).

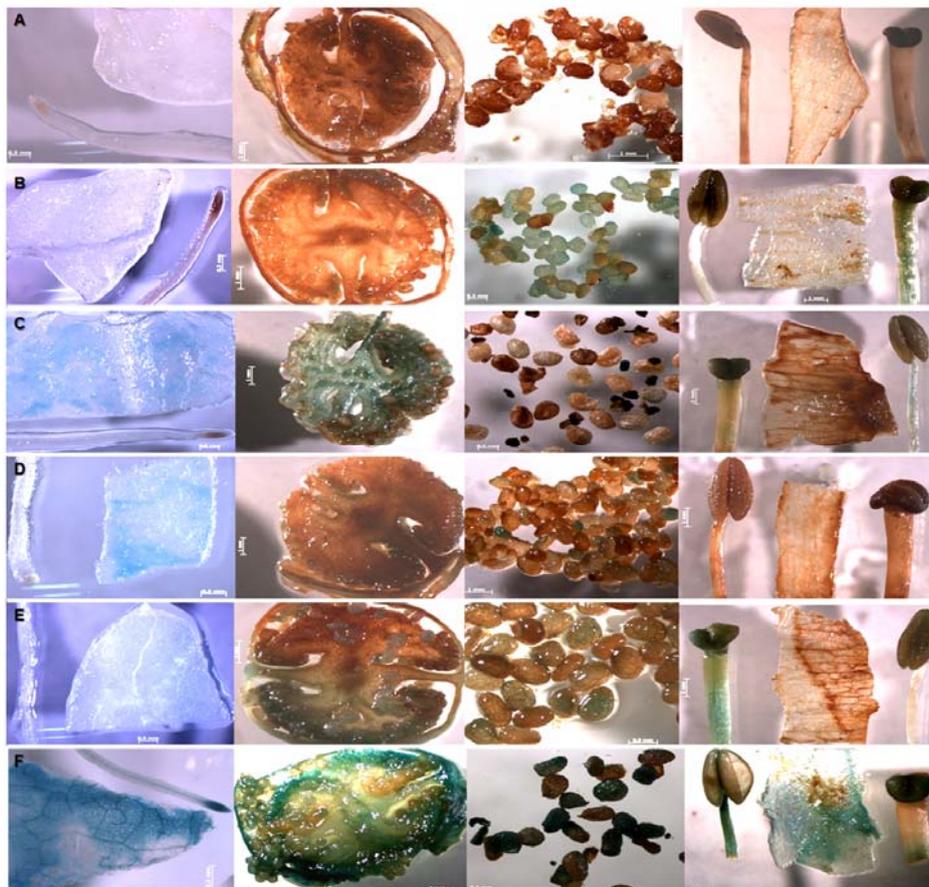


Figura 5 - Fotomicrografia do ensaio histoquímico GUS em plantas de *N. tabacum* transformadas com vetores binários contendo diferentes fragmentos do promotor do gene *CALTP1*. A: Plantas não transgênicas (controle negativo); B, C, D e E: Plantas transgênicas transformadas com diferentes fragmentos do promotor do gene *CALTP1* (0.4, 0.78, 1.0 e 1.2 kb, respectivamente) a montante do gene repórter *uidA*; F: Plantas transgênicas transformadas com o promotor 35S a montante do gene *uidA* (controle positivo). Da direita para a esquerda os tecidos examinados foram os seguintes: raízes e folhas, frutos, sementes, gineceu, pétalas e anteras.

CONCLUSÕES

As análises *in silico* mostraram-se adequadas para diminuir os custos das análises e o tempo na busca de genes candidatos a órgão-especificidade. O gene *CALTP1* se mostra expresso preferencialmente em endosperma de sementes de *C. arabica* aos 120 e 180 DAF. A técnica 5' RACE se mostrou adequada para isolar a seqüência promotora em *C. arabica*. O fragmento de 0.4 kb promove a expressão do gene *uidA* exclusivamente em flores, frutos e sementes de tabaco transgênicos. Trabalhos futuros serão realizados visando caracterizar os níveis de expressão que o promotor fruto-específico de *CALTP1* é capaz de direcionar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARSALOBRES-CAVALLARI, C.F.; SEVERINO, F.E.; MALUF, M.P.; MAIA, I.G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology** v. 10, no.1, 2009.
- CARVALHO, AO.; GOMES, V.M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – A concise review. **Peptides** v. 28, p. 1144-1153, 2007.
- CRUZ, F.; KALAOUN, S.; NOBILE, P.; COLOMBO, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L.M.G.; ROMANO, E.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; VASLIN, M.; ALVES-FERREIRA, M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, v.l. 23, no. 4, p. 607-616, 2009.
- DE CASTRO, R.D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal Plant Physiology** v. 18, p. 75-199, 2006.
- GUIVARCH, A.; CAISSARD, J.C.; AZMI, A.; ELMAYAN, T.; CHRQUI, D.; TEPFER, M. *In situ* detection of expression of the *gus* reporter gene in transgenic plants: ten years of blue genes. **Transgenic Research** v. 5, p. 281-288, 1996.
- GUPTA, P.; RAGHUVANSHI, S.; TYAGI, A.K. Assessment of the efficiency of various gene promoters via biolistics in leaf and regenerating seed callus of millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crusgalli*. **Plant Biotechnology** v. 18, p. 275–282, 2001.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J**, v. 6, p. 3901–3907, 1987.
- JONES, J.D.; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. **EMBO J**. v.4, p. 2411-2418, 1985.
- KADER, J.C. Lipid transfer proteins in plants. **Annu Review Plant Physiology Plant Molecular Biology** v.47, p. 627-654, 1996.
- MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; TOKUDA, E.K.; PARIZZI, L.P.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G. AND BRAZILIAN COFFEE GENOME PROJECT CONSORTIUM. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology** n. 11, p. 30, 2011.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters** v, 339, p. 62-66, 2003.
- RUSHTON, P.J.; REINSTÄDLER, A.; LIPKA, V.; LIPPOK, B.; SOMSSICH, I.E. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen and wound induced signaling. **Plant Cell** v. 14, p. 749-762, 2002.
- SALMONA, J.; DUSSERT, S.; DESCROIX, F.; DE KOCHKO, A.; BERTRAND, B.; JOËT, T. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and Real time RT-PCR approach. **Plant Molecular Biology** v. 66, p.105–124, 2008.