

Prospecção de promotores tecido-específicos em café

De Almeida, Juliana D.¹
Barros, Leila M.G.¹
Santos, Daiene B. M.¹
Cotta, Michelle G.¹
Barbosa, Eder. A.¹
Cação, Sandra B.²
Eira, Miriam T. S.⁴
Alves, Gabriel S.C.¹
Vinecky, Felipe.¹
Pereira, L.F.P.⁴
Da Silva, Felipe R.¹
Andrade, A. C.¹
Marraccini, Pierre^{1,3}
Carneiro, M.¹

A maioria dos organismos transgênicos relatados na literatura foi obtida utilizando promotores constitutivos. No entanto, existem restrições econômicas, ambientais e de biossegurança relacionadas à expressão indiscriminada (constitutiva) de genes heterólogos. O uso de promotores tecido-específicos e induzidos podem suavizar esses problemas por limitar a expressão do transgene aos tecidos e às condições necessárias. Os promotores atualmente utilizados pela EMBRAPA são de propriedade transnacional, onerando as

pesquisas e causando dependência tecnológica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de encontrar e caracterizar promotores específicos de tecidos e órgãos em *Coffea* spp. Nós utilizamos o banco de dados genoma Café como ferramenta *in silico* para identificar genes expressos preferencialmente em raiz, folha e fruto. Dessa forma, achamos 72 candidatos órgão-específicos: 18 expressos em folhas, 14 em raiz e 40 em frutos. Alguns desses candidatos foram testados *in vitro* utilizando-se ensaios RT-PCR, PCR semi-quantitativa, northern



1 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, BR
2 IAPAR, Londrina PR Brasil
3 Cirad UMR-DAP, Montpellier, FR
4 Embrapa Café Brasília, DF, Brasil

blotting e qPCR. Todos os quatro candidatos folha-específicos testados (GCFo1, GCFo2, GCFo3 e GCFo4) e pelo menos um dos dois candidatos fruto-específicos testados (GCFr1 e GCFr2) tiveram o seu caráter órgão-específico confirmado. Ensaios de expressão temporal e espacial mostraram que GCFr2 tem um pico de expressão no endosperma, 180 dias depois do florescimento. Os genes mais expressos de folha (GCFo3 e GCFo4) e de fruto (GCFr2) foram usados como sondas para isolar seus respectivos promotores através da *screening* de bibliotecas de BAC ou utilizando a técnica de 5' RACE.

Introdução

A produção comercial de café no Brasil é baseada em duas espécies: *C. arabica* L e *C. canephora* Pierre, cada uma representando 70% e 30% do Mercado, respectivamente. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, responsável por aproximadamente um quarto da produção mundial. No entanto, a cultura de café vem enfrentando vários problemas que podem comprometer drasticamente sua produção. O Projeto Genoma Café brasileiro foi executado com o objetivo de fornecer informação sobre o genoma de café para pesquisadores que visam desenvolver variedades melhoradas. Uma vez que *Coffea arabica*, a variedade mais importante, é perene, tetraplóide e tem baixa variabilidade genética, a transgenia é uma boa maneira de obter plantas mais adequadas a diferentes propósitos como resistência a patógenos, tolerância à seca ou a qualidade da bebida. De fato, existem alguns protocolos estabelecidos de transformação de café, especialmente de *C. canephora* (CANCHE-MOO et al., 2006; KUMAR et al., 2006; RIBAS et al., 2006) e experiências promissoras com *C. arabica* (ALPIZAR et al., 2006; ALPIZAR et al., 2008). Porém, transgênicos em geral são submetidos a várias restrições, em parte devido à expressão indiscriminada do transgene guiada por promotores constitutivos como o

35SCaMV. Dessa maneira, a obtenção de um controle da expressão do transgene, que assegure níveis de expressão altos e somente nos tecidos desejados é importante para uma melhor aceitação comercial da engenharia genética. Esse controle ajudaria a diminuir alguns questionamentos sobre biossegurança de plantas geneticamente modificadas, Além disso, preveniria o desperdício de energia que ocorre durante a expressão exagerada na planta inteira, a qual pode comprometer a produtividade. A expressão de um transgene em um órgão específico ou condição específica é bem vinda no melhoramento genético molecular de plantas e poderia ser atingida com o uso de promotores adequados (LANG et al., 2008; CHIOU et al., 2008; WALLY et al., 2008; MARRACCINI et al., 2002; MARRACCINI et al., 1999). Com o objetivo de identificar genes órgão-específicos (folha, raiz e fruto) que poderiam ser utilizados como sondas para isolar seus respectivos promotores, realizamos várias análises *in silico* usando o banco de dados do Projeto Genoma Café. O northern eletrônico identificou 18 genes de folha, 14 genes de raiz e 40 genes de frutos. Alguns desses genes foram testados através de RT-PCR, PCR semi quantitativa e RT qPCR. Dessa forma confirmamos a expressão preferencial de 4 genes de folha, aqui chamados de GCFo1, GCFo2, GCFo3 e GCFo4 e 1 gene de fruto, o GCFr2. Os promotores de GCFo4 e GCFr2 foram isolados e seqüenciados. Futuramente serão testados em plantas-modelo e depois em café.

Materiais e métodos

Análises in silico

Baseado nos Unigenes do banco de dados do projeto genoma café (VIEIRA et al., 2006) bibliotecas de ESTs de apenas um tecido (folha, raiz ou fruto) foram agrupadas e contrastadas contra outro grupo contendo todas as outras bibliotecas através do Teste Exato de Fisher. Os genes os quais se

apresentaram como preferencialmente expressos em raízes, folhas ou frutos foram selecionados. Dentre esses foram escolhidos os mais expressos e inéditos.

Análise da expressão

RT PCR: RNA de raiz, folha e fruto foi tratado com DNase e convertido a cDNA, que por sua vez foi utilizado como molde em reações de amplificação com *primers* específicos.

qPCR: O mesmo cDNA utilizado nas reações de RT-PCR foi usado nos experimentos de RT qPCR. As reações foram preparadas com SYBR Green e *primers* específicos e executadas em um sistema PCR 7500 (Applied Biosystems) como descrito por Bustin (2002). A normalização foi feita com o gene ubiquitina.

Isolamento do promotor:

Método 5' RACE: A região 5' da seqüência codificadora dos candidatos de folha e do candidato de fruto confirmados pela análise de expressão foi usada como molde para desenhar *primers* reversos específicos usados para amplificar a região promotora. A região promotora desses genes foi amplificada a partir do molde de DNA genômico pelo método 5' RACE utilizando o Genome Walker Universal Kit (Clontech) segundo instruções do fabricante.

Seleção de clones BAC: Membranas de nitrocelulose contendo 18.432 clones

BAC (*bacterial artificial cromossome*) contendo fragmentos genômicos de alto peso molecular, foram hibridizadas com sonda específica para GCFr2.

As seqüências promotoras obtidas através das estratégias descritas acima foram analisadas no banco de dados PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>), (HIGO et al., 1999) e PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantCARE>) para identificação dos elementos cis.

Resultados e discussão

A análise do Northern blot eletrônico apontou 103 UniGenes tecido-específicos. Entre esses, 18 referem-se a folhas, 40 a frutos, 14 a raiz e 31 a botões florais. Análises de comparação de seqüência mostraram que 84% dos ESTs são homólogos a seqüências conhecidas e 16% são desconhecidas. O primeiro passo para confirmar a tecido-especificidade dos genes candidatos identificados pela análise virtual foi o estudo de expressão, por meio de RT-PCR, realizado com amostras de RNA total extraídas de folhas, raízes e frutos convertidas em cDNA. Os resultados da RT-PCR mostraram que os transcritos de GCFo1, GCFo2, GCFo3 e GCFo4 foram detectados preferencialmente em folhas e GCFr1 foi detectado preferencialmente em fruto (Figura 1).

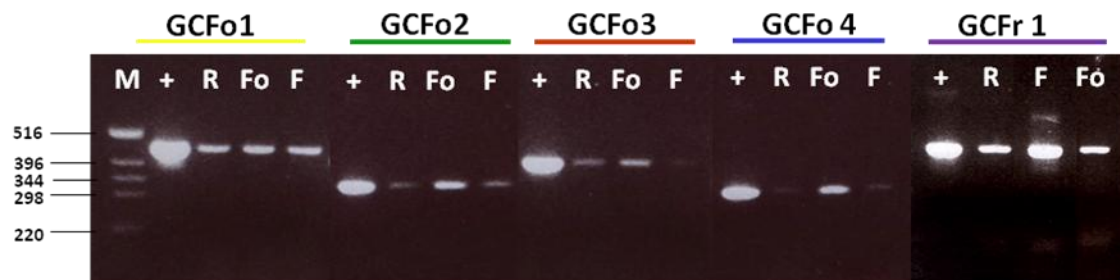


Figura 1 – Análise de RT-PCR para GCFo1, GCFo2, GCFo3, GCFo4 e GCFr1. Moldes usados nas reações: (+) controle positivo (R) cDNA de raiz; (Fo) cDNA de folha; (F) cDNA de fruto.

Uma análise quantitativa foi então realizada com o objetivo de conhecer os níveis de expressão desses genes em cada tecido. Os dados apresentados aqui

são baseados em uma quantificação relativa em comparação com o gene constitutivo ubiquitina. Os dados obtidos na RT-PCR foram confirmados (Figura 2).

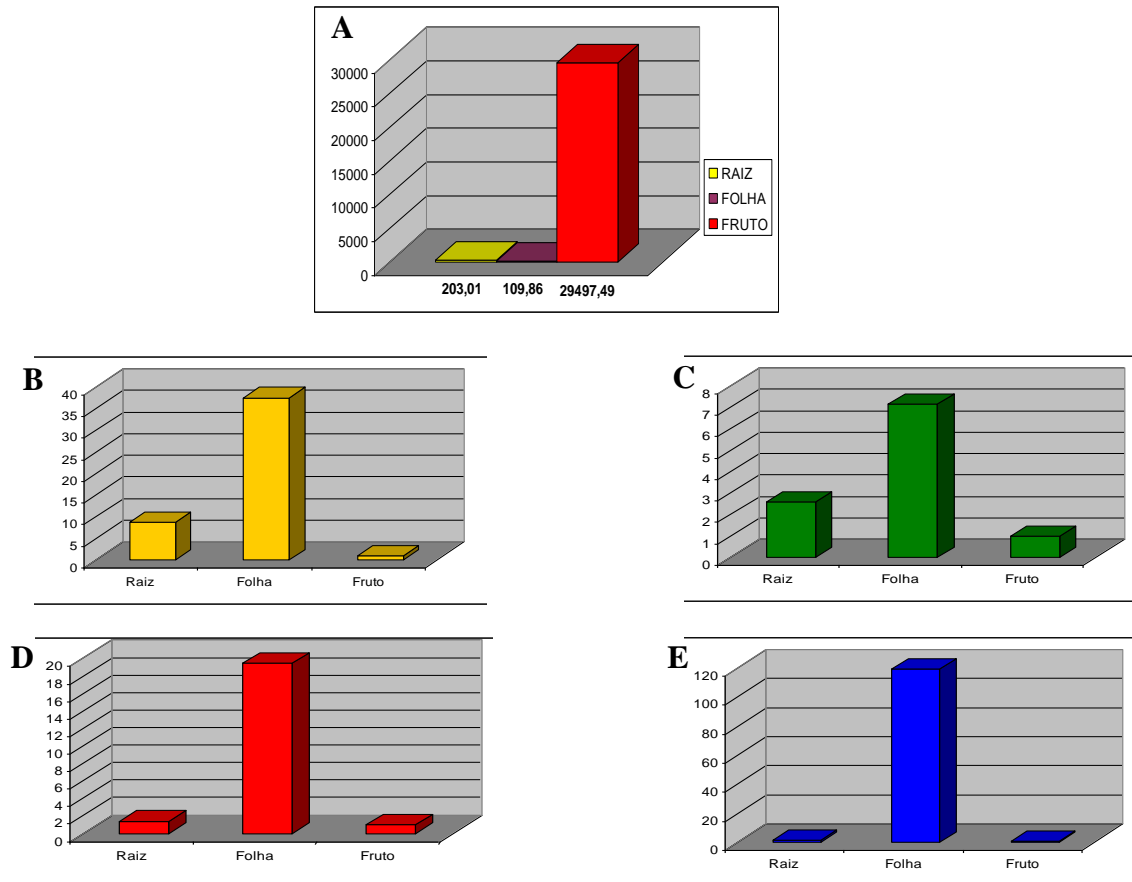


Figure 2 – Análise de RT q PCR relativa. (A) GCFr1, (B) GCFo1, (C) GCFo2, (D) GCFo3 e (E) GCFo4. O gene da ubiquitina foi usado como um controle constitutivo.

Para o isolamento dos promotores foram escolhidos o GCFo4 no caso de folhas e o GCFr2 no caso de fruto. O critério usado foi o alto nível de expressão, o ineditismo e a especificidade no tecido-alvo. Visando isolar esses 2 promotores, duas abordagens diferentes foram utilizadas: método do genome walker (GCFo4 e GCFr2) e *screening* de bibliotecas de BAC (GCFr2) (Figure 3). Os clones físicos foram obtidos, seqüenciados e analisados

(figure 4). No caso do promotor de GCFo4, a análise de seqüência pelos programas PLACE e PlantCare mostraram elementos cis básicos como TATA Box e CAT Box e também elementos responsivos como ABRELATERD1 (resposta a stress hídrico) (SIMPSON et al., 2003) e CAATWATTG (reconhecimento da proteína Athb-1 de *Arabidopsis*) (SESSA et al., 1993).

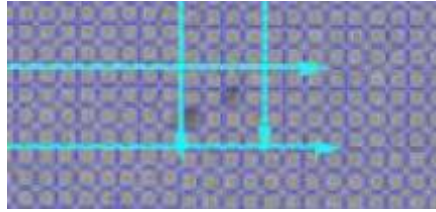


Figure 3 – Seleção de clones de BAC de *Coffea arabica* por meio de hibridização com sonda GCFr2. Clones positivos estão delimitados por setas verdes.

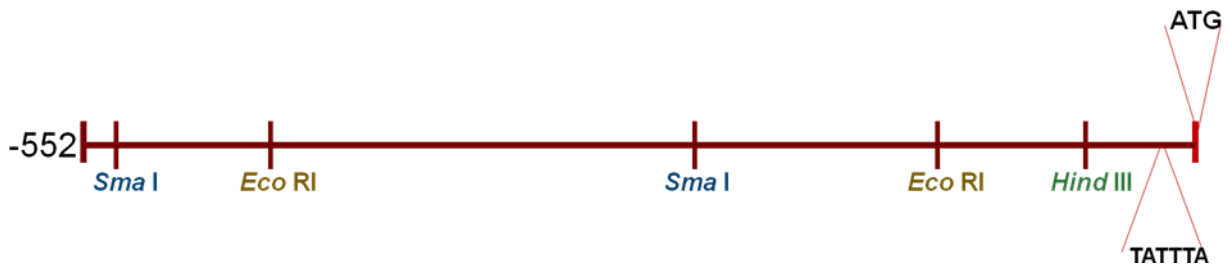


Figure 4: GCFo4 promoter restriction map.

Nossos resultados demonstram que a estratégia utilizada para isolar promotores específicos é eficiente, mas ensaios de expressão *in vivo* são necessários para confirmar a especificidade dos promotores.

Uma vez validados esses promotores podem ser muito úteis na obtenção de transgênicos adaptados a diferentes condições como seca, presença de patógenos e qualidade de bebida. Esses promotores podem ser testados em outras espécies para avaliar seu desempenho de uma forma universal. A descoberta de novos promotores com padrão de expressão específico é importante para o futuro desenvolvimento de novas cultivares e estratégico no aspecto comercial da aplicação da biotecnologia

Conclusão

A metodologia de análise *in silico* associada às técnicas de clonagem apresentadas demonstram ser eficientes para o isolamento de promotores a partir do genoma de cafeeiro.

Referências

ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; ESPEOUT, S.; ROYER, M.; LECOULS, A. C.; NICOLE, M.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 25, n. 9, p. 959-967, 2006.

ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; LAPEYRE-MONTES, F.; GUILHAUMON, C.; BERTRAND, B.; JOURDAN, C.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of Coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. **Annals of Botany**, London, GB, v. 101, p. 929-940, 2008.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, Inglaterra, GB, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.

- CANCHE-MOO, R. L. R.; KU-GONZALEZ, A.; BURGEFF, C.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; RODRÍGUEZ-ZAPATA, L. C.; CASTAÑO, E. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Holanda, NL, v. 84, n. 3, p. 373-377, 2006.
- CHIOU, C. Y.; WU, K.; YEH, K. W. Characterization and promoter activity of chromoplast specific carotenoid associated gene (*CHRC*) from *Oncidium* Gower Ramsey. *Biotechnol Letters.*, v. 30, n. 10, p. 1861-1866, 2008.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. **Nucleic Acids Research**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 27, n. 1, p. 297-300, 1999.
- KUMAR, V.; SATYANARAYANA, K. V.; SARALA ITTY, S.; INDU, E. P.; GRIDHAR, P.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, D. G. A. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v.25, n.3, p. 214-222, 2006.
- LANG, Z.; ZHOU, P.; YU, J.; AO, G.; ZHAO, Q. Functional characterization of the pollen-specific *SBgLR* promoter from potato (*Solanum tuberosum* L.). **Planta**, Berlin, DE, v. 227, n. 2, p. 387-396, 2008.
- MARRACCINI, P.; COURJAU, C.; CAILLET, V.; LAUSANNE, F.; LEPAGE, B.; ROGERS, W. J.; TESSERAU, S.; DESHAYES, A. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, FR, v. 41, n. 1, p. 17-25, 2003.
- MARRACCINI, P.; DESHAYES, A.; PÉTIARD, V.; ROGERS, W. J. Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, FR, v. 37, n. 4, p. 273-282, 1999.
- RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Production of herbicide-resistant coffee plants (*Coffea canephora* P.) using *Agrobacterium*-mediated transformation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, PR, v. 49, n. 1, p. 11-19, 2006.
- SALES, R. M. O. B.; ANDRADE, A. C.; SILVA, F. R. da. Determinação do unigene do projeto genoma café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR; Brasília, DF: Embrapa Café, 2005. 1 CD ROM.
- SALES, R. M. O. B.; SILVA, F. R. Desenvolvimento de ferramenta web para análise de dados de projetos genoma do tipo EST. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 10., 2005, Brasília, DF. **Anais: resumos dos trabalhos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 61.
- SESSA, G.; MORELLI, G.; RUBERTI, I. The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. **EMBO Journal**, Oxford, Inglaterra, v. 12, n. 9, p. 3507-3517, set. 1993.
- SIMPSON, S. D.; NAKASHIMA, K.; NARUSAKA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **Plant journal: for cell and molecular biology**, Oxford, Inglaterra, v. 33, n. 2, p. 259-70, 2003.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; PEREIRA, L. F. P.; et al. The Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic source. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, SP, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

WALLY, O.; JAYARAJ, J.; PUNJA, Z. K. Comparative expression of β -

glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 27, p. 279-287, 2008.

Comunicado Técnico, 187

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2008):

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*
Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva
Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode
Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*
Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

