

## Identificação e caracterização do gene M6PR de *Coffea spp*

Silva, NV<sup>1,2</sup>; Cação, SB<sup>1,2</sup>; Santos, TB<sup>1,2</sup>; Pereira, LFP<sup>1,3</sup>; Vieira, LGE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, PR.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina (UEL) - Londrina, PR

<sup>3</sup>Embrapa - Café, Brasília, DF

e-mail: nathvolpi@yahoo.com.br

**Palavras-chave:** *C.arabica*, Manitol, Cromossomo Artificial de Bactéria (BAC), estresse abiótico, M6PR

Devido às mudanças climáticas a tolerância a estresses abióticos, como estresse hídrico e salino, têm tido cada vez maior importância na agricultura. Plantas com alta produção de manitol apresentam elevado grau de tolerância a esses estresses abióticos. Em plantas superiores, a enzima chave na produção de manitol é a manose-6-fosfato redutase dependente de NADPH (M6PR), que converte manose-6-fosfato em manitol-1-fosfato. Este trabalho visa a identificação e caracterização *in silico* e *in vivo* de genes de M6PR, em *Coffea spp.*, bem como a identificação deste gene em uma biblioteca BAC de *Coffea arabica*. Através da comparação da expressão dos reads e contigs *intra* e *inter* bibliotecas utilizando a ferramenta Northern Eletrônico-Teste Exato de Fischer (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/>) foi observado que o gene M6PR apresenta uma maior expressão em bibliotecas submetidas a estresse hídrico e salino. Foram clusterizadas 350 seqüências de ESTs do banco de dados do Projeto Genoma Café que permitiram identificar 2 haplótipos de M6PR em *C. arabica* e 1 haplótipo em *C. canephora*. Análise da seqüência deduzida apresentou uma proteína com tamanho, ponto isoelétrico, peso molecular e domínio semelhante ao encontrados em M6PR de *Apium graveolens*. Para produção de sonda visando hibridizações de Southern e Northern Blot, o gene M6PR foi amplificado, clonado no vetor PCR 2.1-TOPO<sup>®</sup> clonagem (Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies) e seqüenciado. Iniciou-se também a identificação de clones de Cromossomo Artificial de Bactéria (BAC), contendo gene de M6PR. Foi utilizada uma biblioteca BAC de café contendo 55.000 clones representando 5X o genoma do *Coffea arabica*. A identificação de clones BACs na biblioteca foi feita através da seleção por PCR de pools de BACs e posteriormente por hibridização em filtros de membrana de colônia. Os clones identificados foram submetidos a PCR individualmente e confirmaram a presença do gene. Os BACs positivos e DNA genômico de *C. canephora* e *C. eugenioides* estão sendo seqüenciados a fim de confirmar a presença de dois haplótipos em *C. arabica*. Análises de expressão por Northern Blot em condições de estresse hídrico, salino e térmico em *C. arabica* e *C. canephora* possibilitou detectar maiores níveis de expressão quando submetido à estresse hídrico moderado (- 2.39 MPa) e severo (- 4.5 MPa). Também foi observada expressão durante estresse salino em plantas irrigadas com solução de NaCl 150 mM por 25 dias). Não foi observada expressão em plantas submetidas ao estresse térmico. A caracterização e identificação do M6PR possibilitará compreender melhor o papel do acúmulo de manitol em condições de estresses abióticos em *Coffea spp.* Através da identificação de BACs de *C. arabica* contendo genes de M6PR será possível realizar a caracterização genômica do gene, e auxiliar o mapeamento físico desta espécie para características de interesse agrônomo como a tolerância a estresses abióticos. Apoio Financeiro: CNPq, Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café.