

CARACTERIZAÇÃO DE GENES COM EXPRESSÃO TECIDO-ESPECÍFICA EM RAIZ E FOLHA DE *Coffea arabica*

Marcos Brandalise¹, Miriam Perez Maluf², Oliveira Guerreiro Filho³, Wallace Gonçalves³ e Ivan de Godoy Maia¹
E-mail: brandalise@iac.sp.gov.br

¹Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, ²Embrapa Café, Brasília, DF, ³Instituto Agrônomo de Campinas, SP.

Resumo:

O grande número de genes que tem sido identificado nos últimos anos terá um grande impacto no melhoramento genético vegetal, principalmente pela obtenção de plantas geneticamente modificadas. Tal inovação, apesar de já ocasionar um grande impacto na agricultura mundial aumentando produtividade e diminuindo custos no cultivo, tem sido alvo de muitas críticas e, uma das principais, tem sido a expressão constitutiva dos transgenes, a qual é promovida pelas seqüências promotoras atualmente empregadas. A alternativa mais viável para substituição de tais promotores é investir na clonagem e caracterização de promotores tecido-específicos. Visando selecionar genes com expressão tecido-específica em café (*Coffea arabica*) para posterior clonagem dos promotores correspondentes, no presente trabalho foi realizada a identificação e posterior validação de ESTs com expressão específica em raiz e folha. Para tal, análises “*in silico*” foram realizadas utilizando-se as informações e ferramentas disponíveis no Banco de Dados do Projeto Genoma Café. Até o momento foram identificadas treze seqüências com expressão específica em raiz e quatorze seqüências com expressão específica de folha. Visando a validação biológica de tais resultados, primers específicos para as seqüências alvo foram sintetizados. No processo de validação por RT-PCR empregando RNA total de diferentes tecidos, dentre os vinte e sete candidatos analisados, apenas dois confirmaram ser tecido-específicos, apresentando expressão em raiz e folha, respectivamente.

Palavras-chave: seqüências expressas, EST, promotores tecido-específicos, *Coffea arabica*

ANALYSIS OF TISSUE-SPECIFIC GENES FROM LEAF AND ROOT OF *Coffea arabica*

Abstract:

The great number of genes that have been identified in the last few years will have a great impact on the genetic improvement of plants, mainly by the use of biotechnology. Although such innovation has already had a great impact in the world agriculture, improving productivity and reducing costs, it has been target of many critiques. One of the main critiques is the constitutive expression of the transgenes, which is provided by the promoter sequences that has been recently utilized. The most viable alternative to replace these promoters would be the cloning and characterization of tissue-specific promoters. To this goal, the identification of genes with tissue-specific expression for further cloning of their corresponding promoter sequences is essential. In this work, ESTs with root and leaf-specific expression were selected in the database of the Brazilian Coffee Genome Project and validated by RT-PCR. For instance, 13 sequences showing root-specific expression and 14 sequences showing leaf-specific expression were identified in the database. Among them, only two have been validated as tissue-specific (root and leaf, respectively) in RT-PCR experiments using total RNA from different coffee tissues.

Key words: promoter sequences, tissue-specific genes, *Coffea arabica*.

Introdução

A crescente demanda mundial por alimentos de melhor qualidade, principalmente livre de defensivos agrícolas, têm promovido um avanço significativo em diversas áreas da produção vegetal. Dentre estas se destaca o melhoramento genético vegetal (Borém, 1998).

O melhoramento genético de plantas visando melhorias agrônomicas vem sendo realizado pelo homem há milhares de anos utilizando-se de procedimentos clássicos, funcionais, de cruzamentos controlados entre espécies. Entretanto com o advento da biologia molecular nos últimos anos, somado ao desenvolvimento de técnicas biotecnológicas avançadas, o melhoramento genético de plantas via engenharia genética tornou-se uma ferramenta importante na obtenção de plantas genotipicamente superiores em um curto período de tempo, sendo de grande interesse para o setor biotecnológico – agrícola (Borém, 1998).

Métodos avançados de melhoramento genético vegetal têm se destacado principalmente devido à possibilidade de obtenção de resultados uniformes e direcionados para características desejáveis. Dentre inúmeros métodos biotecnológicos mundialmente utilizados para o melhoramento, destaca-se como um dos mais importantes a produção de plantas geneticamente modificadas. A transgenia tem permitido o melhoramento de genótipos selecionados por métodos convencionais através da introdução de um ou poucos genes que, em muitos casos, são encontrados em espécies distantes e que não poderiam ser transferidos via recombinação, o que acontece obrigatoriamente entre indivíduos sexualmente compatíveis. Por outro lado, se fossem transferidos levariam anos para obtenção do genótipo desejado. As características melhoradas são muitas, indo desde de aumento de resistência a estresses bióticos (Kazan et al., 1998; Kanzaki et al., 2002)

e abióticos (Serrano, et al., 1999; Shen et al., 2002) até o uso das plantas como biorreatores (Leite et al., 1999; Börnke et al., 2002).

O uso de organismos geneticamente modificados tende ainda a aumentar, uma vez que um grande número de genes de diferentes espécies tem sido identificado e caracterizado, ampliando ainda mais as possibilidades de manipulações via processos biotecnológicos. Muitos destes genes têm sido identificados em projetos onde genomas inteiros têm sido seqüenciados, como no caso de *Arabidopsis thaliana* (Kaul et al., 2000) ou em projetos nos quais são seqüenciados milhares de cDNAs oriundos de bibliotecas construídas a partir de diferentes tecidos e em diferentes condições de estresse. Como exemplo do último caso, na área vegetal destaca-se o projeto EST Café.

Os projetos de seqüenciamento acima citados são de extrema importância, entretanto sabe-se que somente a caracterização de um gene não garante sua utilidade na obtenção de transgênicos. A produção eficiente de uma proteína heteróloga em uma planta depende da obtenção de altos níveis de transcrição do gene introduzido e para isso promotores altamente ativos são necessários (Rance et al., 2002).

O promotor é o processador central da regulação de um gene uma vez que contém os sítios de ligação para as RNAs polimerases, responsáveis pela transcrição gênica. Atualmente, os promotores mais utilizados em plantas geneticamente modificadas são o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e os promotores dos genes da nopalina e octopina de *Agrobacterium tumefaciens*. Apesar dos grandes avanços que têm sido obtidos com esses promotores, os padrões de expressão dos transgenes são variados e baixos em alguns casos (Zheng e Murai, 1997; Green et al., 2002) não havendo por outro lado garantia de expressão no tecido adequado (Neuteboom et al., 2002).

Além disso, o uso de promotores constitutivos é uma das causas da grande preocupação a respeito dos efeitos dos transgênicos no meio ambiente. Promotores como o CaMV 35S quando ligados a genes utilizados para seleção de transformantes (genes de resistência a antibióticos) determinam, em geral, a expressão do produto gênico em todos os tecidos da planta. Tal característica, desnecessária e indesejável em plantas geneticamente modificadas, tende a diminuir a aceitação dos produtos derivados pelos consumidores. Portanto, promotores tecido-específicos seriam de grande importância nestes casos e estudos já vem sendo conduzidos com esse propósito. Outro motivo de preocupação sobre o uso de plantas geneticamente modificadas refere-se à expressão de proteínas tóxicas como as utilizadas para o controle de determinadas pragas. Tais proteínas são normalmente pouco específicas podendo agir em organismos não alvos, causando um desequilíbrio no meio ambiente. Este efeito indesejado seria sem dúvida minimizado por meio do uso de promotores que respondessem a estímulos específicos como, por exemplo, ataques de nematóides em café. Neste caso, a expressão do transgene seria limitada ao período de duração do estímulo e direcionada para o local de estímulo, no caso específico apenas na raiz, livrando principalmente os frutos e o resto da planta, da proteína “tóxica” indesejada (Park et al., 2000; Song et al., 2002; Wang et al., 2002).

A expressão tecido-específica é altamente desejável tanto do ponto de vista de biossegurança como de opinião pública, evitando, por exemplo, a expressão do transgene em tecidos destinados à alimentação humana. A busca por promotores com tais características tem sido uma prioridade em programas biotecnológicos que visam a produção e liberação comercial de organismos geneticamente modificados. Adicionalmente, tal especificidade poderá ser associada à indução por estresses bióticos. Os promotores aqui identificados serão de grande valia nos programas de melhoramento da espécie *Coffea arabica*, esta uma das espécies mais importantes para a indústria cafeeira brasileira. Acredita-se ainda que o presente trabalho contribuirá para futuras aplicações biotecnológicas na produção de café geneticamente modificado, agregando melhorias agronômicas ao produto.

Material e Métodos

Análises “*in silico*” de genes com expressão tecido-específica foram realizadas utilizando-se informações e ferramentas disponíveis no Banco de Dados do projeto EST Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>).

A fim de confirmar a especificidade gênica tecidual via RT-PCR dos candidatos selecionados “*in silico*”, RNA total foi isolado de diferentes tecidos de *Coffea arabica*, Mundo Novo IAC 388-17, com ou sem estresse (fruto, raiz, raiz infectada com nematóide, folha, folha infectada com bicho mineiro) (Figura 1) e de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento (chumbinho, chumbão, fruto verde, fruto verde cana, fruto maduro) (Figura 2). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit ThermoScript™ RT-PCR System da Invitrogen Life Technologies e oligo(dT). As amostras de cDNA foram validadas quanto à integridade a partir da amplificação de um transcrito ubíquo, utilizando-se da técnica de PCR. Na reação de PCR, primers específicos para seqüências alvos foram empregados.

Resultados e Discussão

Foram identificadas “*in silico*” treze seqüências com expressão específica em raiz e quatorze seqüências com expressão específica de folha. Dentre as vinte e sete seqüências analisadas, duas foram confirmadas como tecido-específicas, sendo uma de raiz – denominada RSG (root-specific gene) (Figura 3) e outra de folha – denominada LSG (leaf-specific gene) (Figura 4). As demais seqüências analisadas, ou apresentaram expressão ubíqua ou então não se encontravam enriquecidas no tecido em estudo. É importante salientar que a integridade dos cDNAs obtidos a partir dos diferentes tecidos foi confirmada através da amplificação por PCR de um gene ubíquo (actina).

Na Figura 3 estão apresentados os resultados de amplificação via RT-PCR obtidos para o gene RSG. O aparecimento de um produto de amplificação de aproximadamente 500 pb indica que o gene RSG apresenta expressão específica em raiz, sendo a mesma aumentada em situações de ataque por nematóide (comparar poços 8, 9 e 10 da Figura 3).

Já para a seqüência identificada “*in silico*” como sendo específica de folha, experimentos de RT-PCR utilizando-se de primers específicos confirmaram tal resultado. Pode-se notar que o gene LSG é expresso especificamente em folhas mesmo quando infectadas por bicho mineiro (Figura 4).

O isolamento das regiões promotoras correspondentes está sendo executado utilizando-se o kit “Universal Genome Walker” (Clontech), para posterior clonagem e análise funcional dos mesmos.

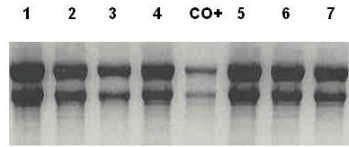


Figura 1. Extração de RNA total de diferentes tecidos com ou sem estresse de *Coffea arabica*. Amostras; 1-fruto, 2-raiz sadia, 3-raiz infectada com nematóide (24 horas), 4- raiz infectada com nematóide (72 horas), CO+-controle positivo, 5-folha sadia, 6-folha infectada com bicho mineiro (6 dias), 7-folha infectada com bicho mineiro (11 dias). A extração foi feita via protocolo estabelecido em nosso laboratório. As amostras foram analisadas em gel desnaturante 1% agarose corado com brometo de etídeo.

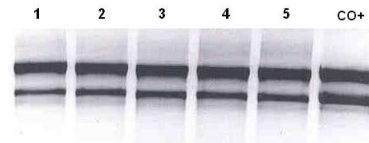


Figura 2. Extração de RNA total de diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos de *Coffea arabica*. Amostras; 1- chumbinho, 2-chumbão, 3-fruto verde, 4- fruto verde cana, 5-fruto maduro, CO+- controle positivo. A extração foi feita via protocolo estabelecido em nosso laboratório. As amostras foram analisadas em gel desnaturante 1% agarose corado com brometo de etídeo.

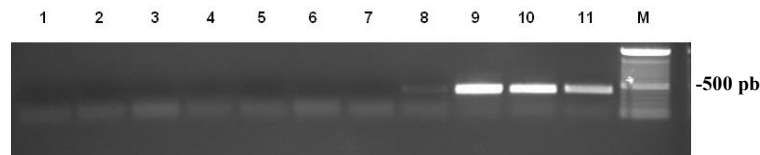


Figura 3. Análise de PCR demonstrando que o transcrito do gene RSG é raiz-específico em *Coffea arabica*, variedade Mundo Novo. Uma banda de tamanho esperado (~500 pb) é detectada em raiz, mesmo quando infectada por nematóide. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo. Amostras; 1-chumbinho, 2-chumbão, 3-fruto verde, 4-fruto verde-cana, 5-fruto maduro, 6-folha sadia, 7-folha infectada com bicho mineiro, 8-raiz sadia, 9-raiz infectada com nematóide (24 horas), 10-raiz infectada com nematóide (72 horas), 11-raiz infectada com nematóide (240 horas), M-marcador de peso molecular.

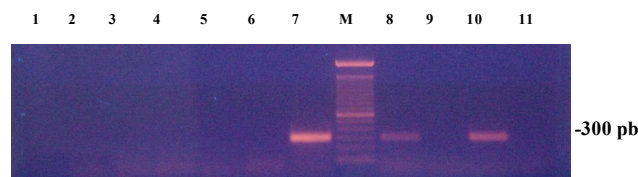


Figura 4. Análise de PCR revela que o transcrito do gene LSG é específico de folha em *Coffea arabica*, variedade Mundo Novo. Uma banda de tamanho esperado (~300 pb) é detectada em folha, mesmo quando infectada por bicho mineiro. As amostras foram analisadas em gel 1% agarose corado com brometo de etídeo. Amostras; 1-chumbinho, 2-chumbão, 3-fruto verde, 4-fruto verde-cana, 5-fruto maduro, 6-raiz, 7-folha sadia, 8-folha infectada com bicho mineiro (6 dias), 9- folha de híbrido resistente (*Coffea arabica* com *Coffea racemosa*) infectada com bicho mineiro (6 dias), 10- folha infectada com bicho mineiro (11 dias), 11- folha de híbrido resistente (*Coffea arabica* com *Coffea racemosa*) infectada com bicho mineiro (11 dias), M-marcador de peso molecular.

Referências bibliográficas

- Borém, A. 1998. Biotecnologia no melhoramento de plantas In: Melhoramento de Plantas, 2.ed, Editora UFV, Viçosa.
- Börnke, F., Hajirezaei, M., Sonnewald, U. 2002. Potato tubers as bioreactors for palatinose production. *Biotechnology*, 96: 119-124.
- Green, J., Vain, P., Fearnough, M.T., Worland, B., Snape, J.W., Atkinson, H.J. 2002. Analysis of the expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* tubulin-1 and *Zea mays* ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60: 197-205.
- Kanzaki, H., Nirasawa, S., Sayito, H., Ito, M., Nishihara, M., Terauchi, R., Nakamura, I. 2002. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *Theoretical Applied Genetics*, 105: 809-814.
- Kaul, S. *et al.* 2000. The Arabidopsis Genome Initiative. *Nature*, 408:796-815.
- Kazan, K., Goulter, K.C., Way, H.M., Manners, J.M. 1998. Expressions of a pathogenesis-related peroxidase of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco and canola and its effect on disease development. *Plant Science*, 136: 207-217.
- Leite, A., Kemper, E.L., da Silva, M.J., Luchessi, A.D., Siloto, R.M.P., Bonaccorsi, E.D., El-Dorry, H.F. e Arruda, P. 1999. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding* 6: 47-53.
- Neuteboom, L.W., Kunimitsu, W.Y., Webb, D., Christopher, D.A. 2002. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. *Plant Science*, 163: 1021-1035.
- Park, K.S., Kloepper, J. 2000. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci. *Biological Control*, 18: 2-9.
- Rance, I., Norre, F., Gruber, V., Theisen, M. 2002. Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. *Plant Science*, 162: 833-842.
- Song, F., Goodman, R.M. 2002. Cloning and identification of the promoter of the tobacco Sar8.2b gene, a gene involved in systemic acquired resistance. *Gene*, 290: 115-124.
- Zheng, Z., Murai, N. 1997. A distal promoter regions of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. *Plant Science*, 128: 59-65.
- Wang, S-J., Lan, Y-C., Chen, S.F., Chen, Y.M., Yeh, K.-W. 2002. Wound-response regulation of the sweet potato sporamin gene promoter region. *Plant Molecular Biology*, 48: 223-231.