



# Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia

Jorge Maurício Costa Mondego

## **Caracterização de genes de café (*Coffea sp.*) induzidos durante a infestação do bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*)**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Jorge Maurício Costa Mondego  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada no Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de  
Doutor em Genética e Biologia  
Molecular, área de concentração  
Genética Vegetal e Melhoramento.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira**

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**M744C**

Mondego, Jorge Maurício Costa  
Caracterização de genes de café (*Coffea* sp.)  
induzidos durante a infestação do bicho mineiro  
(*Leucoptera coffeella*) / Jorge Maurício Costa Mondego.  
- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Café. 2. Bicho-mineiro-do-cafeeiro. 3.  
Expressão gênica. 4. Inibidores de proteases. I.  
Teixeira, Marcelo Menossi. II. Universidade Estadual  
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Characterization of coffee (*Coffea* sp.) genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation.

**Palavras-chave em inglês:** Coffee, Coffee leaf-miner, Gene expression; Protease inhibitors.

**Área de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Marcelo Menossi Teixeira, Paulo Mazzafera, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Carlos Augusto Colombo.


**Data da defesa:** 22/11/2005

**Banca Examinadora**



---

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (orientador)



---

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



---

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



---

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo



---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

---

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti (suplente)

---

Prof. Dr. Marcio de Castro Silva-Filho (suplente)

---

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas (suplente)

***"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que (se) adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto"***  
**Albert Einstein**

***"Conhece-te a ti mesmo"***  
**Sócrates**

***"...se o principal intuito das ciências é esclarecer a relação do homem com o universo, como eu acredito, a biologia deve ser posicionada numa posição central (dentre as ciências)"***  
**Jacques Monod**

***Aos meus pais,  
Celso e Teresinha***

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira, pela orientação, pelo companheirismo, pelo incentivo, pela compreensão nos momentos difíceis pelos quais passei, pela cumplicidade e por ser um grande amigo. Muito obrigado;

Aos amigos do Laboratório de Genoma Funcional, pela amizade, pelos momentos divertidos compartilhados e pela ajuda durante os experimentos. Gostaria de fazer agradecimentos especiais a cada um de vocês, mas eu gastaria umas cinco folhas para isso..... Agradeço a Paulino (o “oráculo” da fisiologia vegetal e da bioquímica), Ju Felix, Sandra, Melina, Carol, Rodrigo “Boi”, Geraldo, Edna, Dudu, Lígia, Lucia, Michelle, Renato, Eduardo, Marcio Kenji, Agustina, Renata, Layra, Paulo “Xilol”, Cristiane, Marcelo, Vanusia, Janaína, Sidney, Kiara, Pedro, etc. Obrigado por tudo;

Aos meus pais, pelo amor, carinho e dedicação. A distância somente aumentou a admiração e o amor que sinto por vocês;

A Bia, pelo seu amor, amizade, compreensão, carinho, paciência, convivência, etc. Você foi essencial para que eu cumprisse essa jornada. Você é um grande presente que recebi;

Ao Dr. Oliveira Guerreiro Filho, pela amizade, pela ajuda experimental e por ter nos mostrado um modelo biológico tão interessante para trabalhar;

Aos amigos do IAC, Dra Mirian Perez Maluf, Daniel Alves Ramiro, Silvia Chebabi Mathiessen, Masako Toma Braghini e Dra Rachel Voltan pela ajuda em diversos experimentos;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IQ da USP, Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Mario Henrique Bengtson (meu “mestre” em biblioteca de subtração) e Christian Colin, pela amizade e pela ajuda no “período-biblioteca-de-subtração-na-USP” da tese;

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal do IB da UNICAMP, Prof Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro, Sebastião Militão e Fabiano Martins pela ajuda nas etapas de microscopia da *In situ*;

Ao Vicente e ao Fábio Tebaldi, pela amizade, pelas discussões enriquecedoras e pelos momentos divertidos que passamos, como correr que nem loucos para não perder o “Ferrocastilho”. Impagável....;

Aos amigos do “Genoma”, Almir, Susan, Ana Luiza, Adriana, Gabriel, Fabiana, Heidi, Elaine, pela amizade, pelo empréstimo de materiais e pela ajuda valiosa durante a “fase biblioteca”;

Aos amigos Dra. Gláucia Mello, Paulo Baldasso, Prof. Dr. João Alexandre Barbosa e Profa. Dra. Maria Aparecida Tanaka pela ajuda experimental e pelas discussões sobre o “mundo dos inibidores de proteinase”;

Ao Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin pelo uso do microscópio de fluorescência, pelo empréstimo de material e pelas conversas e sugestões na etapa bioquímica da tese;

Aos amigos CBMEGuianos pelo companheirismo durante o período da tese: Marcio José, Danizinha, Mario, Sylvia, Jiri, Germano, Fisch, Natalia, Thaís, Kivia, Silvia Regina, Luciane, etc.;

Às amigas Nathaly e Adriana Silva pela ajuda nos momentos de “adaptação” logo que cheguei em Campinas;

A Dona Elza e família pela acolhida e por preencherem o espaço da minha família aqui em Campinas;

A todos os meus familiares e às madrinhas Suely e Jacira pelo incentivo e apoio;

Aos amigos do CEAK pelo aprendizado e companheirismo;

A Miriam, Jair, Fabio, Tininha, Tiago, Ana, Victor, Rafael, Mari, André, Rodrigo, Renato “Lilica” e a todos os outros amigos da Bia, pelos momentos divertidos, pelas conversas científicas e “além-ciência”. Para vocês vai o meu...OK !!!

Aos familiares da Bia, Virginia, Carol, Chico, Mario, Lucy, Celso e Capella pelos momentos divertidos que passamos e pelo incentivo;

Aos amigos do “Fundão do coração” que torcem por mim e me incentivam: Rodrigo Galhardo, Cris “Toquinho”, Léo Karam e família, Cristiano e Ana Paula, Samantha e Glauco, Daniel “Huski” e Michelle, Bia Pérez, Fabrícia, Rubens “Jiraia”, Rafael “Pancho”, Simone, Prof. Dr. Marcio Alves Ferreira, Rodrigo “Mum”, Beth, Vinícius Farjalla, Marcelo Nolla, etc;

Aos amigos da “eterna 502” do São José, pela amizade de tantos anos e pelo incentivo;

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Adilson Leite (*in memoriam*), por ter me incentivado a vir trabalhar no CBMEG;

Às meninas da secretaria do CBMEG, Tânia, Sandra, Andressa e Paula, pela ajuda imprescindível nos momentos “burocráticos”, e às secretárias da pós-graduação da Genética pela ajuda nos “momentos derradeiros” da tese;

Ao professores doutores Marcelo Carnier Dornelas, Michel Vincentz e Paulo Mazzafera pelas contribuições valiosas na pré-banca;

Aos professores doutores membros da banca por terem aceitado participar da avaliação do nosso trabalho;

À FAPESP e à FAEPEX pelo financiamento;

A DEUS.



## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1 - O cafeeiro e o bicho-mineiro .....	2
1.1 - Café: origem e história .....	2
1.2 - O café no Brasil e a economia cafeeira .....	2
1.3 - <i>Coffea arabica</i> - características morfológicas e fenologia .....	4
1.4 - <i>Leucoptera coffeella</i> - o bicho mineiro .....	4
1.5 - Melhoramento genético e biotecnologia no combate ao bicho mineiro .....	6
<b>2 - Genoma funcional</b> .....	9
2.1 - DNA arrays .....	9
2.2 - Bibliotecas de subtração .....	11
<b>3 - Defesa vegetal contra estresse biótico</b> .....	13
3.1 - Defesa contra patógenos .....	15
3.2 - Defesa contra artrópodos .....	17
3.3 - Interações entre vias de sinalização de defesa e fitohormônios .....	21
<b>4 - Os Inibidores de Proteinases</b> .....	24
4.1 - Proteases e proteinases .....	24
4.2 - Inibidores de proteinase: modo de ação e classificação .....	26
4.3 - Participação no desenvolvimento vegetal .....	32
4.4 - Envolvimento na defesa vegetal .....	35
4.5 - A família Kunitz STI de inibidores de proteinase e proteínas similares a miraculina .....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	40
<b>RESULTADOS</b> .....	40
<b>Capítulo I - Isolation and characterization of <i>Coffea</i> genes induced during coffee leaf miner (<i>Leucoptera coffeella</i>) infestation</b> .....	41
<b>Capítulo II - <i>CoMir</i>, a coffee Kunitz STI protease inhibitor gene, is induced by coffee leaf miner oviposition and is regulated during coffee development</b> .....	52
<b>DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>CONCLUSÕES</b> .....	96
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	98
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	99

## RESUMO

O café é um dos principais produtos agrícolas mundiais. O Brasil é um dos maiores países produtores e consumidores de café. Assim sendo, a cafeicultura possui extrema importância econômica em nosso país. Um dos principais fatores que causam prejuízo à lavoura do café é o ataque do bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*), pois *Coffea arabica*, principal espécie cultivada do café, é suscetível a essa praga. O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) empreende um projeto de melhoramento de *Coffea arabica*, visando a resistência ao bicho mineiro, através de cruzamentos com *C. racemosa*, espécie naturalmente resistente a *L. coffeella*.

Neste trabalho isolamos genes diferencialmente expressos durante o ataque do bicho mineiro a plantas de uma progênie híbrida derivada de cruzamentos entre *Coffea arabica* e *C. racemosa*. Foram construídos macroarranjos de DNA contendo 1536 ESTs de bibliotecas de subtração enriquecidas em genes preferencialmente expressos em plantas resistentes infestadas. Membranas foram hibridadas com sondas de cDNA obtidas a partir de RNA total de folhas suscetíveis e resistentes ao bicho mineiro, em diferentes momentos da infestação (controle não infestado, pós-oviposição e pós-eclosão). Após análises estatísticas e clusterização hierárquica, 21 cDNAs induzidos em pelo menos um tratamento foram selecionados como diferencialmente expressos durante a infestação do bicho mineiro. A expressão diferencial de cinco genes (*PR-8*, *CAX9*, *SPC25*, *psaH*, *BEL*) foi confirmada através de *RNA blot* contendo RNA de um segundo experimento de infestação, demonstrando a eficiência dos macroarranjos de DNA na seleção de genes diferencialmente expressos. O padrão de expressão dos cinco genes citados foi verificado em

diferentes órgãos do cafeeiro e durante o desenvolvimento do fruto do café. Nossos resultados sugerem que o mecanismo de resistência ao bicho mineiro é derivado de uma maior expressão basal de genes relacionados a defesa em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis, e que plantas resistentes possuem um mecanismo de sinalização de defesa disparado pela oviposição de *L. coffeella*.

Dentre os cDNAs selecionados, destacamos SSH101B04, cuja proteína deduzida é similar a inibidores de protease do tipo Kunitz STI (*Soybean Trypsin Inhibitor*). Devido a sua alta similaridade com proteínas do tipo miraculina, esse gene foi denominado *CoMir* (*Coffea Miraculin*). *CoMir* foi induzido após a oviposição em plantas resistentes, mas não foi induzido após a eclosão da lagarta do minador em plantas resistentes nem em plantas suscetíveis. Através de ensaios de *RNA blot* foi verificado que *CoMir* é expresso em folhas, botões florais verdes e brancos e em frutos verdes imaturos. Ensaios de hibridação *in situ* demonstraram que *CoMir* é expresso no metaxilema de folhas, de pétalas e do estigma, e no estômio, endotécio, tapete e feixe vascular da antera. Ensaios de localização subcelular demonstraram que a proteína *CoMir* localizou-se preferencialmente no apoplasto e no citoplasma de células de epiderme de cebola (*Allium cepa*). Nossos resultados sugerem que *CoMir* é uma proteína reguladora de proteólise durante o desenvolvimento do café, que é mobilizada para defesa após a oviposição de *L. coffeella*.

## ABSTRACT

Coffee is one of the most important crops in the world. Brazil is one of the biggest coffee producer and consumer countries. Therefore, coffee plantations have great relevance in our country. One of the main factors that affect coffee plantations is the attack of the coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*). This is due to the susceptibility of *Coffea arabica*, the main cultivated species. The Agronomic Institute of Campinas (IAC) develops a *Coffea arabica* breeding program aiming the resistance to the infestation of coffee leaf miner, using crosses with *C. racemosa*, a resistant species.

In this work, we have isolated differentially expressed genes during *L. coffeella* attack to plants of a hybrid progenie between *C. arabica* and *C. racemosa*. We have produced cDNA arrays containing ESTs from subtracted cDNA libraries enriched in genes preferentially expressed in infested resistant plants. Arrays were probed with samples from susceptible and resistant leaves, in different treatments (control non-infested, after oviposition and after caterpillar eclosion). After statistical analysis and hierarchical clustering, 21 cDNA clones induced in at least one treatment were selected as differentially expressed during coffee leaf miner infestation. The differential expression of five genes (*PR-8*, *CAX9*, *SPC25*, *psaH*, *BEL*) was confirmed by RNA blot containing samples from a second infestation experiment, demonstrating the efficiency of DNA arrays in the identification of differentially expressed genes. The expression profile of these five genes was verified in different organs of coffee plants and during coffee fruit development. Our results suggest that the resistance mechanism against coffee leaf miner is derived from a higher basal expression of

defense/stress genes in resistant plants, and that resistant plants have a defense signaling mechanism triggered by *L. coffeella* oviposition.

Among the selected cDNAs, we identified SSH101B04, which deduced protein is similar to Kunitz STI (Soybean Trypsin Inhibitor) protease inhibitors. The gene was named *CoMir* due to its high similarity to miraculin-like proteins. *CoMir* was induced after oviposition in resistant plants, but it was not induced after larval eclosion in susceptible and resistant plants. RNA-blot experiments showed that *CoMir* was expressed in leaves, green flower buds, white flower buds and early green fruits. *In situ* hybridization showed that *CoMir* is expressed in the metaxylem vessels of leaves, petals and stigma and in the stomium, endothecium and vascular bundles of anthers. Subcellular localization assays demonstrated that *CoMir* was localized in the apoplasm and cytoplasm of onion (*Allium cepa*) epidermal cells. Our results suggest that *CoMir* is a protein that regulates proteolysis during coffee development that is mobilized to defense after *L. coffeella* oviposition.

## INTRODUÇÃO

O café (*Coffea arabica*) é um dos principais produtos agrícolas brasileiros. O inseto lepidóptero minador *Leucoptera coffeella*, conhecido como bicho-mineiro, vem sendo considerado como a principal praga do café. Espécies do gênero *Coffea* apresentam diferentes níveis de resistência ao bicho mineiro, embora *C. arabica* seja suscetível à praga. O Instituto Agrônomo de Campinas empreende um programa de melhoramento do cafeeiro visando à resistência a *L. coffeella*. Para tal, utiliza plantas derivadas do cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*, espécie de café resistente ao bicho mineiro.

Os vegetais são atacados por diversos organismos. Pouco se sabe sobre como as plantas se defendem de artrópodos que interagem de forma mais prolongada com o vegetal. As lagartas minadoras, como o bicho mineiro, estão incluídas nesse caso, já que se desenvolvem durante dias dentro de minas formadas no mesófilo foliar. Assim sendo, o entendimento dos mecanismos moleculares de percepção, sinalização e ajuste do metabolismo perante o ataque do bicho mineiro pode ajudar a elucidar o mecanismo de resistência a esse inseto praga, assim como trazer novas hipóteses para defesa contra minadores. A presente tese de doutoramento teve como objetivo principal a análise da expressão gênica de uma população de plantas derivada do cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*, quando infestadas pelo bicho mineiro.

Além desta introdução, contendo uma revisão bibliográfica, a tese contém dois capítulos referentes a um artigo publicado e outro em preparação, onde nossos resultados são apresentados, uma discussão geral e, por fim, conclusões gerais sobre o nosso trabalho.

## **1- O cafeeiro e o bicho-mineiro**

### **1.1- Café: origem e história**

Estudos historiográficos indicam que o centro de origem do cafeeiro é a região de Kaffa, na atual Etiópia. No século XV, o café começou a ser consumido no Oriente Médio, sendo os árabes a primeira civilização a cultivá-lo. Isso originou o nome científico da principal espécie cultivada de café (*Coffea arabica*). A partir da intensificação do comércio entre ocidente e oriente e da invasão dos árabes na península Ibérica, o consumo do café difundiu-se pela Europa. As primeiras mudas de café foram plantadas na Europa no Jardim Botânico de Paris e no Jardim Botânico de Amsterdã. Entretanto, o clima europeu não foi favorável para a cafeicultura. Foi através dos holandeses que o café chegou ao Novo Mundo, em 1714. O clima das Américas se mostrou propício para o cultivo do café que logo se propagou para outros países do continente (Joly e Hermógenes, 1979).

### **1.2 - O café no Brasil e a economia cafeeira**

Em 1727, o oficial português Francisco de Mello Palheta foi enviado à Guiana Francesa para resolver problemas de delimitação de fronteiras, mas também para trazer secretamente sementes do fruto de café. Palheta trouxe as sementes ao Pará, que tornou-se o primeiro estado a cultivar o cafeeiro. Em 1774, as mudas de cafeeiro chegaram ao Rio de Janeiro, donde a planta iniciou sua notável expansão. Do Rio de Janeiro, o café atingiu o Vale do Paraíba, adentrando no Estado de São Paulo por volta de 1790. Em seguida, a cafeicultura alcançou o Estado de Minas Gerais. Em pouco tempo o café tornou-se a base da economia brasileira. O “ciclo de ouro do café” iniciou-se no meio do século XIX, durando até 1931, quando milhões de sacas de café estocadas foram destruídas devido ao excesso de produto no mercado.

A cada ano são produzidos mais de 6,5 milhões de toneladas de grãos de café em 11 milhões de hectares no mundo. O café é a segunda commodity mais valorizada nos mercados internacionais, atrás somente do petróleo (Leroy *et al.*, 2001). *Coffea arabica* (75% do mercado) e *Coffea canephora* (25% do mercado) são as espécies de café que abastecem o mercado mundial (Daviron e Fosse, 1993). Cerca de 70 países produzem café. No entanto, Brasil, Indonésia e Colômbia detêm juntos mais de 50% do mercado mundial (Daviron e Fosse, 1993). A cafeicultura tem uma importância fundamental na criação de empregos e na fixação do homem no campo. No Brasil, o cultivo do café está presente em 14 estados (São Paulo, Paraná, Espírito Santo, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Pará, Rio de Janeiro, Rondônia e Acre), distribuindo-se em mais de 300.000 propriedades, que em sua maioria são de pequeno porte (até 10 hectares). Dados da safra 2002/2003 demonstram que o estado de Minas Gerais é o maior produtor de café do Brasil. Em segundo lugar vem o Espírito Santo, seguido por São Paulo. A cafeicultura no Brasil gera em torno de 3 milhões de empregos diretos. Em torno de 4% do volume total das exportações brasileiras são representados pelo café. Além disso, os setores de exportação e industrial do café originam em torno de 6 milhões de empregos indiretos. Entre janeiro e março de 2005, as exportações brasileiras de café em grão, solúvel e torrado foram de 6,711 milhões de sacas de 60 quilos (Cecafé - Conselho dos Exportadores de Café). Mais particularmente no Estado de São Paulo, a cafeicultura gera aproximadamente 5 bilhões de reais por ano e 5 mil empregos diretos ou indiretos (Thomaziello *et al.*, 2000). Além disso, segundo dados da ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café) o Brasil representa 13% de todo o consumo mundial de café.



### **1.3 - *Coffea arabica* – Características morfológicas e fenologia**

*Coffea arabica* é uma planta perene dicotiledônea da família Rubiaceae, de porte arbustivo ou arbóreo, caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas. Essa espécie de café é autocompatível, apresentando altos níveis de autofecundação. Além disso, *C. arabica* é a única espécie tetraplóide ( $2n = 4X = 44$  cromossomos) do gênero *Coffea* (Lashermes *et al.*, 1999).

As plantas de *C. arabica* podem atingir 4m de altura, apresentando ramos ortotrópicos (crescimento vertical), dos quais se originam ramos plagiotrópicos (crescimento lateral). Suas folhas são de formato oval, cor verde escura contendo um pecíolo curto. A raiz de *C. arabica* é do tipo pivotante profunda com grande ramificação nas primeiras camadas do solo (Graner e Godoy-Júnior, 1967). As gemas florais são encontradas nos ramos laterais originando flores de coloração branca. A abertura dos botões florais ocorre na primavera sendo que o fruto produzido é uma drupa elipsóide, contendo geralmente duas sementes. Somente um único ciclo de frutificação anual é verificado em *C. arabica*. A fenologia do café é bem característica: florescimento na primavera, frutificação no verão, maturação no outono e “repouso” no inverno. Outra característica de *C. arabica* é a sua intolerância a altas temperaturas e ao frio (Thomaziello *et al.*, 2000).

### **1.4 - *Leucoptera coffeella* - o bicho mineiro**

O sistema de manejo da cultura cafeeira foi radicalmente modificado a partir do aparecimento da broca do café em 1924 e sobretudo da ferrugem do café em 1970. Além disso, a utilização incorreta de produtos químicos, como fungicidas e inseticidas, provocou desequilíbrios biológicos muito severos para a cafeicultura brasileira, como o aumento da incidência do bicho mineiro. Esse inseto representava

um problema para a cultura apenas nas estações secas do ano, mas se tornou um problema mesmo durante as estações chuvosas (Parra, 1975).

Acredita-se que a origem do bicho mineiro tenha ocorrido no continente africano, sendo constatado no Brasil já no século XIX, provavelmente advindo de mudas de café provenientes das Antilhas e da ilha de Bourbon (atual ilha Réunion). Atualmente essa praga é encontrada em todas as regiões cafeeiras do país. O bicho mineiro ataca somente o cafeeiro, sendo portanto uma praga monófaga, que na fase adulta é uma mariposa de coloração prateada de cerca de 6,5 mm de envergadura e 2,2 mm de comprimento. As mariposas escondem-se na face inferior das folhas durante o dia e iniciam a oviposição na parte superior das folhas ao anoitecer. Após a eclosão dos ovos, que ocorre de 4 a 6 dias após a oviposição, as larvas do bicho mineiro penetram diretamente no mesofilo foliar, alimentando-se então do parênquima paliádico. As regiões destruídas vão secando e a área atacada aumenta com o próprio desenvolvimento da lagarta dentro do mesofilo. Essa lesão é chamada de "mina". A lagarta de *L. coffeella* mede 4 a 5 mm de comprimento e 0,75 mm de largura, possui corpo achatado e coloração transparente-amarelada. Após o término de seu desenvolvimento, que dura de 7 a 11 dias, a lagarta sai do mesofilo através de uma fenda na epiderme superior, e em seguida se torna uma crisálida na parte inferior desta mesma folha. Essa etapa do desenvolvimento de *L. coffeella* é reconhecida pela presença de um casulo em forma de X, usado para proteção da pupa. Após o período pupal, surgem as mariposas que vivem em torno de 15 dias, embora em alguns casos possam viver mais de um mês.

Os prejuízos causados pelo inseto podem chegar a 50% da produção (Almeida, 1973; Paulini *et al.*, 1975), devido à redução da fotossíntese (Magalhães, 1964), causada sobretudo pela queda prematura das folhas (Crowe, 1964). As plantas

que sofrem intenso ataque do bicho-mineiro desfolham e levam até dois anos para se recuperarem completamente. De modo geral, os prejuízos aparecem na safra seguinte, sendo que eventos consecutivos de desfolha levam ao enfraquecimento do cafeeiro, diminuindo sua longevidade (Parra *et al.*, 1992).

Diversos fatores determinam a presença do bicho mineiro nos cafezais. Um dos mais importantes é a condição climática. Em geral, o aumento da temperatura influencia positivamente a ocorrência das mariposas, enquanto o aumento da pluviosidade e da umidade influenciam negativamente a praga (Reis e Souza, 1986). Lavouras espaçadas tendem a favorecer o ataque do bicho mineiro. Isso vai de encontro ao que se vê em relação à ferrugem do café, onde cultivos espaçados tendem a sofrer menor ataque do fungo. Outros fatores como o estado nutricional do cafeeiro e a quantidade de inimigos naturais, como parasitas, predadores e patógenos, também influenciam a infestação por *L. coffeella* (Parra *et al.*, 1992).

### **1.5 - Melhoramento genético e biotecnologia no combate ao bicho mineiro**

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) conduz um programa de melhoramento genético no intuito de se obter variedades de café arábica resistentes ao bicho mineiro. De modo geral, todas as variedades de *C. arabica* são suscetíveis a *L. coffeella* (Medina Filho *et al.*, 1977a). Contudo, diferentes níveis de resistência foram verificados em outras espécies do gênero *Coffea* (Medina Filho *et al.*, 1977a; Guerreiro Filho *et al.*, 1991). Medina Filho *et al.* (1977b) determinaram que para *C. racemosa* a taxa de infestação no campo foi de 6%, enquanto que os cultivares *C. arabica* Acaiá e Catuai tiveram 86% e 96% de folhas infestadas respectivamente. Em plantas resistentes como no caso de *C. racemosa*, as larvas não completam seu

desenvolvimento pois morrem no interior das minas. Em casos mais extremos de resistência, as larvas não eclodem dos ovos (Medina Filho *et al.*, 1977b).

Além de ser resistente a *L. coffeella*, *C. racemosa* apresenta floração abundante e uma relativa facilidade de cruzamentos com *C. arabica*, o que a indicou como genótipo doador de resistência ao bicho mineiro para o programa de melhoramento do IAC. Progênes resultantes de hibridações entre *C. arabica* e *C. racemosa* foram testadas quanto à resistência ao bicho mineiro. Indivíduos da terceira e da quarta geração de retrocruzamentos (*C. arabica* X *C. racemosa*) X *C. arabica* apresentaram uma taxa de segregação de 9 indivíduos resistentes para 7 indivíduos suscetíveis quando cruzados entre si através de polinização aberta, e de 1 indivíduo resistente para 3 suscetíveis quando retrocruzadas com *C. arabica* (Guerreiro-Filho *et al.*, 1999). Essas taxas de segregação levaram à constatação de que a resistência apresentada por *C. racemosa* é determinada pela expressão de dois genes complementares e dominantes, que foram denominados *Lm1* e *Lm2* (Guerreiro-Filho *et al.*, 1999). Curiosamente, plantas resistentes dessas progênes híbridas apresentaram padrão de resistência ao bicho mineiro similar ao apresentado por *C. racemosa*. No momento o IAC possui plantas pertencentes à quinta geração de retrocruzamentos. A tabela 1 mostra a genealogia das plantas desse programa de melhoramento.

Alguns trabalhos buscaram correlações entre a resistência ao bicho mineiro e fatores anatômicos e bioquímicos do cafeeiro. Ramiro *et al.* (2004) caracterizaram anatomicamente folhas de *C. arabica* e de *C. racemosa* e plantas resistentes e suscetíveis das progênes RC4, F2RC4 e RC5 derivadas de cruzamentos entre essas espécies. Os autores não encontraram uma correlação entre as características anatômicas foliares e o mecanismo de resistência ao bicho mineiro. Tendo em vista

que o alcalóide majoritário no cafeeiro, a cafeína, apresenta efeitos de inibição de desenvolvimento de insetos, Guerreiro-Filho e Mazzafera (2000) tentaram correlacionar a variabilidade genética do conteúdo de cafeína em folhas de diferentes espécies de café à resistência a *L. coffeella*. Não foi encontrada correlação entre as duas características. Curiosamente, a infestação por *L. coffeella* induziu o acúmulo de cafeína, o que ao mesmo tempo demonstra que existe uma resposta metabólica ao estresse causado por essa praga, e que o bicho mineiro é resistente aos efeitos da cafeína.

Tabela 1: Genealogia das plantas de café do programa de melhoramento genético do IAC visando resistência ao bicho mineiro

Geração	População
Parental	<i>C. racemosa</i> C1195 (R) x <i>C. arabica</i> cultivar Blue Mountain (S)
F <sub>1</sub>	C1195-5 (R) ( <i>C. racemosa</i> x <i>C. arabica</i> )
BC <sub>1</sub>	C1195-5-6 (R) ( <i>C. arabica</i> x C1195-5)
BC <sub>2</sub>	C1195-5-6-2 (R) ( <i>C. arabica</i> x C1195-5-6)
BC <sub>3</sub>	H11421 (R) (C1195-5-6-2 x H4782-7-882)
BC <sub>4</sub>	H13685 (R) (IAC 81 x H11421-11)
BC <sub>5</sub>	H14954 (R) (IAC 62 x H13685-1)
F <sub>2</sub> BC <sub>5</sub>	H14954-29 ⊗

(R) = Resistente; (S) = Suscetível; H 4782-7-882 = Cultivar Icatu Vermelho;

IAC 81 = Cultivar Catuaí Vermelho;

IAC 62 = Cultivar Catuaí Amarelo

⊗ = Autofecundação

Nos últimos anos, vem se investindo na biotecnologia aplicada ao melhoramento no cafeeiro, mais especificamente, na obtenção de cafeeiros transgênicos resistentes a herbicidas ou a pragas de importância econômica, como o

bicho mineiro. Leroy *et al.*, (2000) transformaram *C. canephora* com um gene da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* chamado *Cry1Ac*, que produz uma proteína com propriedade inseticida (toxina *Bt*). Esses autores verificaram que *Cry1Ac* aumentou a resistência do cafeeiro à infestação de *L. coffeella*, demonstrando que a transgenia pode ser uma técnica eficiente no combate a esse inseto praga. Entretanto, faz-se necessário o desenvolvimento de plantas transgênicas contendo outros genes que produzam proteínas inibidoras do desenvolvimento de artrópodos herbívoros, já que existe a possibilidade de surgimento de insetos resistentes a *Cry1Ac*. Nesse caso, é importante que sejam executados estudos detalhados sobre modelos de herbivoria, no intuito de se identificar e caracterizar genes que confirmam resistência a essas pragas.

## **2 – Genoma funcional**

### **2.1 - DNA arrays**

A partir do advento da genômica, a identificação de genes tornou-se um processo mais rápido. Nos últimos anos, diversos projetos denominados projetos ESTs (*Expressed Sequence Tags*) vêm sendo conduzidos para identificar as populações de mRNA expresas por um organismo (transcriptoma) (Dong *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003; Vettore *et al.*, 2003). O desenvolvimento desses projetos propiciou o surgimento de novas metodologias que ampliaram consideravelmente a capacidade de análise da expressão gênica. O SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) é uma metodologia baseada em seqüenciamento utilizada na avaliação da expressão gênica. Essa técnica se baseia no isolamento de pequenas moléculas de cDNA que são concatenadas, clonadas e, em seguida, sequenciadas. A partir do

seqüenciamento pode-se avaliar a quantidade e a identidade dos transcritos celulares (Velculescu *et al.*, 1995).

Os arranjos de DNA (*DNA arrays*) são outra metodologia que propicia a caracterização da expressão gênica de milhares de ESTs. Os arranjos de DNA se dividem em microarranjos e macroarranjos. No primeiro caso, ESTs, produtos de PCR, ou oligonucleotídeos são fixados em lâminas de vidro ou *chips* de silício. No caso dos macroarranjos, a fixação é feita em membranas de náilon. Os microarranjos vêm sendo amplamente utilizados na análise de expressão gênica em diferentes espécies vegetais (Arimura *et al.*, 2000a; Reymond *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2000; Moy *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004; Voelckel *et al.*, 2004). Nessa metodologia, seqüências de DNA são imobilizadas em lâminas e hibridadas com sondas de cDNA, derivadas de amostras de RNA de um controle e de um tratamento, cada uma marcada com um fluoróforo (*Cy-3* ou *Cy-5*). A comparação entre as fluorescências permite a avaliação da expressão gênica durante o tratamento. Outros sistemas utilizando arranjos de DNA são os fornecidos pelas empresas Affymetrix® e Agilent®. Esses métodos se baseiam na síntese dos oligonucleotídeos diretamente na lâmina (Pease *et al.*, 1994; Chee *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 2001).

Os macroarranjos de DNA são uma alternativa para aos microarranjos. A sua principal vantagem é que essa técnica não necessita de equipamentos especiais para hibridação e que os arranjos podem ser construídos manualmente, barateando seu custo de execução (Felix *et al.*, 2002). Os macroarranjos de DNA também vêm sendo usados com sucesso na análise da expressão gênica de vegetais (Desprez *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2003; Cristopher *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; De Rosa Jr. *et al.*, 2005). Na metodologia dos macroarranjos as sondas de cDNA obtidos de tratamentos contrastantes são marcadas radioativamente e

hibridadas contra os ESTs depositados em membranas réplicas. É possível determinar o padrão de expressão de um determinado EST, comparando-se a intensidade do seu sinal nos diversos tratamentos.

## 2.2 - Bibliotecas de subtração

Uma das limitações para o uso de arranjos de DNA relaciona-se ao fato de que nem todos os genes induzidos podem estar representados na lâmina ou membrana. Embora os diversos processos biológicos sejam controlados por intrincadas redes de expressão gênica, apenas uma fração dos genes ativos tem sua expressão alterada quando as células são expostas a um estímulo particular. Portanto, se a seleção dos clones de uma biblioteca de ESTs for feita ao acaso, a representatividade de genes induzidos será prejudicada.

A partir da década de 90 foram desenvolvidas metodologias que permitem a obtenção de bibliotecas de cDNA enriquecidas em seqüências diferencialmente expressas, conhecidas como bibliotecas de subtração. As etapas dessa metodologia envolvem: (a) a ligação de adaptadores a moléculas de cDNA de um tratamento que queremos enriquecer em nossa biblioteca (*tester*), hibridação dessas moléculas com moléculas de cDNA de um controle (*driver*), (c) amplificação por PCR utilizando *primers* que anelam nos adaptadores ligados às moléculas *tester*, e (d) separação dessas seqüências dos híbridos formados entre seqüências comuns entre *tester* e *driver* (figura 1). Dentre essas estratégias destacam-se o SSH (*Subtractive Supression Hybridization*) e o RDA (*Representational Difference Analysis*). O SSH (Diatchenko *et al.*, 1996), combina subtração com normalização e possibilita o ajuste da eficiência da subtração através da alteração do tempo de hibridação entre as moléculas de *driver* e *tester* (Gurskaya *et al.*, 1996). Diversos trabalhos utilizaram



essa técnica na identificação de genes induzidos por estresses em vegetais (Xiong *et al.*, 2001; Wulf *et al.*, 2003; Schulze Gronover *et al.*, 2004). A metodologia do RDA não permite a normalização das seqüências subtraídas, mas propicia três *rounds* de subtração, o que tende a diminuir o número de falsos-positivos (Hubank e Schatz, 1994; Hubank e Schatz, 2000). O RDA também já foi utilizado no isolamento de genes diferencialmente expressos em plantas (Li *et al.*, 1998; Ling *et al.*, 2003). A combinação entre DNA *arrays* e bibliotecas de subtração possibilitou a identificação de diversos genes de plantas induzidos durante diferentes estresses de natureza abiótica (Watt *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2004), e biótica (Matvienko *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2001; Verica *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2005).

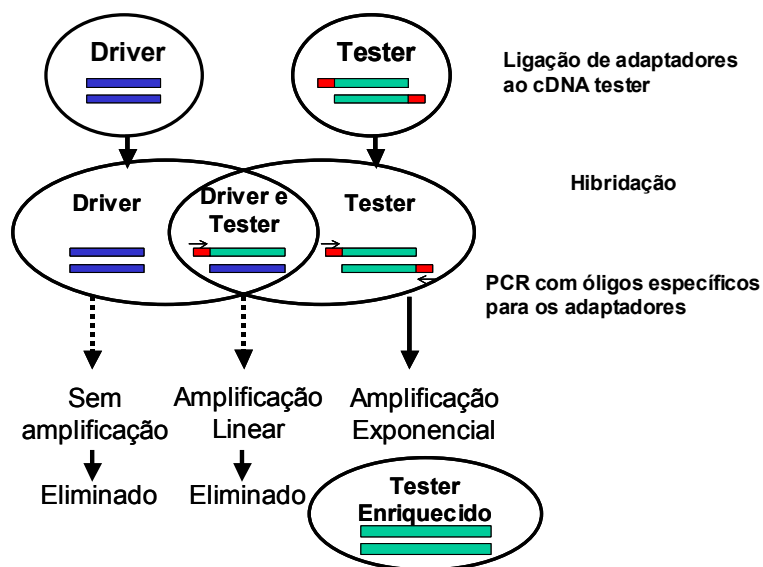


Figura 1: Representação esquemática da metodologia de construção de bibliotecas de subtração de cDNA

### **3 - Defesa vegetal contra estresse biótico**

Em seu habitat natural os vegetais encontram diferentes tipos de estresse, causados por fatores abióticos (altas e baixas temperaturas, seca, umidade, etc.) e por fatores bióticos (vírus, bactérias, fungos, nematódeos, artrópodos e mamíferos herbívoros etc.). Esses organismos apresentam os mais diversos tamanhos; desde microorganismos como vírus e bactérias que atacam uma única célula, até herbívoros de grande porte que se alimentam de grandes porções do vegetal. Logo, as plantas devem ser capazes de identificar o agressor e priorizar a forma de defesa mais eficaz contra o estresse, levando em conta o custo metabólico desencadeado pela ativação desse mecanismo de defesa e a melhor forma de assegurar o seu desenvolvimento e reprodução (Walling, 2000). Diferentemente dos animais, os vegetais não são capazes de se locomover para evitar o agressor. Além disso, as plantas não apresentam células especializadas no mecanismo de sinalização de defesa (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, etc.) como os mamíferos. Portanto, cada célula vegetal possui a capacidade de perceber o ataque, defender-se e sinalizar o ataque para células vizinhas (Nürnberger *et al.*, 2004).

Os mecanismos de defesa vegetal seguem dois tipos de classificação. O primeiro separa a defesa das plantas entre defesa direta e indireta. Defesa direta é aquela na qual um fator vegetal age diretamente na diminuição da performance do organismo inimigo. Por outro lado, a defesa indireta está baseada em características vegetais que atraem animais predadores do organismo nocivo à planta (Baldwin *et al.*, 2001; Kessler e Baldwin, 2002). A defesa vegetal também pode ser dividida entre defesa constitutiva e induzida. A defesa constitutiva inclui barreiras físicas (espinhos, tricomas, cutículas, etc.) que diminuem a penetração e acesso dos organismos

nocivos aos tecidos, e também metabólitos secundários estocados (alcalóides, terpenóides, fenólicos, glicosinolatos, compostos cianogênicos, etc.) que podem evitar a colonização (antixenose) ou o crescimento, reprodução, desenvolvimento ou sobrevivência (antibiose) do patógeno ou herbívoro (Walling, 2000). Em contrapartida, a defesa induzida é caracterizada pela ativação de cascatas de sinalização induzidas após o estresse biótico, que ativam a transcrição *de novo* de genes cujas proteínas resultantes participam na defesa. Essas proteínas podem atuar no reforço da parede celular, na transdução de sinal de defesa, no ajuste metabólico pós-estresse ou na síntese de compostos tóxicos que inibem o desenvolvimento do organismo colonizador (Walling, 2000; Leon *et al.*, 2002).

As defesas contra patógenos e herbívoros apresentam diferenças marcantes derivadas principalmente da diferença de escala espacial e sensorial entre os dois grupos. Os herbívoros apresentam maior autonomia de deslocamento, sistemas sensoriais que propiciam o reconhecimento do melhor nicho de alimentação, aparatos bucais que auxiliam no rompimento da cutícula protetora dos vegetais e em alguns casos, conseguem manipular os compostos dos vegetais hospedeiros em prol de seu desenvolvimento (Kessler e Baldwin, 2002). Desse modo, os vegetais desenvolveram mecanismos de defesa especializados contra a herbivoria utilizando uma miríade de metabólitos secundários. Esses compostos podem ser direcionados a sistemas corporais (endócrino, digestivo, nervoso. etc.) presentes em herbívoros, prejudicando seu funcionamento. Além disso, metabólitos secundários voláteis podem agir como sinalizadores do ataque para vegetais da mesma comunidade, que podem ativar seus sistemas de defesa antes da agressão do herbívoro (Arimura *et al.*, 2000b). Alguns desses compostos têm a capacidade de atrair predadores e parasitas dos herbívoros (Kessler e Baldwin, 2002), levando à defesa indireta mencionada anteriormente. No

entanto, nos últimos anos vem se descobrindo que a interação entre vegetais e herbívoros mais sedentários, como afídios, insetos galhadores e minadores como o bicho mineiro, apresenta similaridades com a defesa contra patógenos.

### **3.1 - Defesa contra patógenos**

No desencadeamento de uma resposta rápida de defesa contra patógenos é imprescindível haver o reconhecimento do organismo agressor e a disseminação dessa sinalização. Segundo a hipótese “gene-a-gene” de Flor (1971), a interação entre produtos de genes de avirulência (*avr*) de um patógeno, com proteínas codificadas por alelos dominantes de genes de resistência (*R*) de vegetais, leva à ativação dos mecanismos de defesa. Essa interação é denominada como incompatível. No entanto, se o patógeno não apresentar o gene *avr* ou a planta não apresentar o gene *R*, ocorre uma interação compatível que acarreta na disseminação da doença (Hammond Kosack e Jones, 1996; Glazebrook *et al.*, 2005). A maioria dos genes *R* identificados codifica proteínas NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeat*), enquanto que a maior parte das proteínas *avr* caracterizadas até o momento são secretadas para o interior da célula hospedeira pelo sistema de secreção bacteriano do tipo III (Dangl e Jones, 2001). No entanto, o conceito de um gene *R* para cada gene *avr* mostrou-se simplista. Verificou-se que um gene *R* pode controlar a resistência a diferentes patógenos, que uma proteína *avr* pode se ligar a mais de uma proteína *R*, e que muitas vezes não ocorre uma interação direta entre as proteínas *R* e *avr* (Dangl e Jones, 2001). Atualmente, a “hipótese do guarda”, que sugere que as proteínas *R* protegem proteínas vegetais que são alvos de proteínas *avr*, é a mais aceita para esse tipo de interação (Dangl e Jones, 2001).

Na interação incompatível ocorre uma resposta hipersensível (HR) que leva à formação de lesões necróticas no sítio da infecção após poucas horas do ataque do patógeno. Essas lesões são derivadas de morte celular programada (PCD – do inglês *Programmed Cell Death*) (Feys and Parker, 2000), que é um mecanismo de “suicídio celular”, que no caso da HR impede a disseminação do patógeno. A ocorrência da HR e/ ou ataque de certos patógenos leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio, de óxido nítrico, e também à ativação da cascata de sinalização dependente de SA (ácido salicílico ou salicilato). Esse composto que é produzido a partir de isocorismato ou do aminoácido fenilalanina induz a expressão de várias proteínas PRs (*Pathogenesis Related*) que agem no combate contra os patógenos. Dentre elas podemos destacar PR-1 (função desconhecida), PR-2 ( $\beta$ -glucanase), PR-3 (quitinase classe I) e PR-5 (taumatina) (Stintzi *et al.*, 1993). O SA também é um dos compostos responsáveis pelo mecanismo conhecido como resistência sistêmica adquirida (SAR – do inglês *Systemic Acquired Resistance*), que confere resistência a sítios distantes da infecção (Shah, 2003).

A sinalização de defesa por HR/SA é utilizada durante o ataque de patógenos biotróficos que se caracterizam por se nutrirem de tecidos vivos do hospedeiro. Esse mecanismo não é usado contra patógenos necrotróficos que têm a capacidade de matar as células hospedeiras e se alimentarem de seus restos celulares (Glazebrook, 2005). Nesse caso uma HR estaria favorecendo a infecção desse tipo de microorganismo. Thomma *et al.* (1998) demonstraram que mutações no gene *Co1*, que codifica uma proteína F-box envolvida na sensibilidade ao octadecanóide ácido jasmônico (jasmonato ou JA), aumentaram a susceptibilidade a patógenos o que evidenciou a participação de JA na defesa contra necrotróficos. Entretanto, outros

estudos demonstram que o JA também pode participar na sinalização contra patógenos biotróficos (Ellis *et al.*, 2002).

### **3.2 - Defesa contra artrópodos**

As plantas também precisam se defender de artrópodos com diferentes hábitos e formas de alimentação. A grande maioria dos trabalhos relacionados a herbivoria lida com insetos que causam danos extensivos à folhagem, como lagartas de vida livre (Reymond *et al.*, 2000; Hermsmeier *et al.*, 2001; Reymond *et al.*, 2004). De modo geral, as sinalizações de defesa à herbivoria e ao estresse abiótico causado por um ferimento são mediadas por JA e pelo seu precursor, o 12-oxo-ácido fitodienóico (OPDA). O JA também está envolvido em diversos processos de desenvolvimento como senescência foliar, amadurecimento de frutos e desenvolvimento do pólen (Wasternack e Parthier, 1997). Alguns genes regulados por JA produzem proteínas que agem como inibidoras de insetos e/ou patógenos, como as defensinas (PDF1.2), inibidores de proteases (PIN I e II), polifenol oxidase (PPO), além de fosfatases ácidas (VSP) envolvidas na remobilização de compostos nitrogenados durante o estresse (Walling, 2000).

A herbivoria e o dano mecânico geram sinais elétricos e/ou hidráulicos que se propagam do local do ferimento, estimulando a ação da enzima poligalacturonidase que libera oligalacturonídeos (OGAs) derivados da pectina presente da parede celular. Os OGAs levam ao aumento do cálcio citoplasmático, geração de espécies reativas de oxigênio, ativação de quinases do tipo MAP (MAPK) e de fosfolipases A<sub>2</sub> e D (Walling, 2000). As fosfolipases liberam ácido linoléico da membrana, que é convertido a 13-hidroperóxido (13-S-HPOT) através da enzima lipoxigenase do tipo 3 (LOX3). Em seguida, 13-S-HPOT é mobilizado para a via dos octadecanóides através

das enzimas aleno óxido sintase (AOS) e aleno óxido ciclase (AOC) que originam o OPDA. Após reações de redução e de  $\beta$ -oxidação ocorre a formação do JA, que em sua forma metilada (MeJA), ou conjugado a isoleucina (Staswick e Tiryaki, 2004) torna-se uma potente molécula sinalizadora. A aplicação exógena de JA ou de MeJA aumenta a expressão de AOS, o que indica um *feedback* positivo na regulação do jasmonato (Laudert e Weiler, 1998). Um dado interessante é que a via dos octecanóides pode ser desviada para a geração de hexenóis, conhecidos como GLVs (*Green Leaf Volatiles*), a partir da ação de outra isoforma de lipoxigenase (LOX13). Os GLVs fazem parte do grupo de compostos usados na defesa indireta contra herbívoros (Halitschke e Baldwin, 2004).

Os OGAs têm mobilidade limitada e provavelmente agem somente como resposta local do dano mecânico. No entanto, foi verificado em tomate que um oligopeptídeo de 18 aminoácidos chamado sistemina é liberado dos sítios de ferimento, possuindo grande mobilidade pelo floema (Ryan, 2000). Essa pequena molécula é ativa em fentomoles e provavelmente é responsável tanto pela ativação de uma resposta local, quanto pela resposta sistêmica, ativando a via dos octadecanóides à distância do sítio de ferimento (Ryan, 2000).

Apesar de várias respostas à herbivoria, ferimento e JA serem similares, os genes induzidos por essas vias não são totalmente equivalentes. Verificou-se que vários genes induzidos por ferimento não são regulados por JA (Reymond *et al.*, 2000) e que diversos genes são expressos diferencialmente ao se compararem processos de herbivoria, ferimento e aplicação de jasmonato (Reymond *et al.*, 2000; Reymond *et al.*, 2004). Além disso, a herbivoria, ou somente o conteúdo salivar de herbívoros, pode causar acúmulo de JA e de transcritos da via de octadecanóides maior do que somente o dano mecânico (Korth e Dixon, 1997). Essa diferença é

devida em parte a moléculas presentes nas secreções orais de herbívoros que são capazes de induzir resposta de defesa nos vegetais. Por exemplo, a enzima  $\beta$ -glucosidase presente nas secreções orais de *Pieris brassicae* induziu a produção de terpenóides voláteis em *Brassica* (Mattiacci *et al.*, 1995). Conjugados de aminoácidos e ácidos graxos (FACs), encontrados em regurgitantes de lagartas, também são considerados eliciadores de defesa indireta (Walling, 2000). O FAC volicitina induziu a liberação de terpenóides e indoles voláteis de *Zea mays*, que são liberados durante a herbivoria por lagarta (Alborn *et al.*, 1997), e também acarretou na expressão de genes relacionados à síntese de terpenóides (Lawrence e Novak, 2004). Truit *et al.* (2004) evidenciaram que a volicitina liga-se a uma proteína da membrana plasmática, e que provavelmente JA ativa a transcrição do gene que codifica o receptor desse FAC. Curiosamente, volicitina tem similaridade estrutural com o OPDA, um dos precursores do jasmonato (Walling, 2000),

Pouco se sabe sobre como as plantas se defendem de herbívoros mais sedentários, que passam maior tempo em contato com o vegetal. Nessa classe de herbívoros incluem-se os afídios que se alimentam do fluido floemático e xilemático através de um aparelho bucal picador/sugador (Moran e Thompson, 2001; Walling, 2000); os artrópodos galhadores, cujas larvas induzem a formação de galhas, dentro das quais terminam seu desenvolvimento (Ollerstam *et al.*, 2002); os ácaros que laceram as células para se alimentarem de fluidos intracelulares (Arimura *et al.*, 2000a) e lagartas minadoras, como é o caso de *L. coffeella*. Nos últimos anos foi verificado que genes *R* podem conferir resistência a insetos não-mastigadores, mais especificamente a afídios (Rossi *et al.*, 1998). *Mi.2* foi o primeiro gene de resistência a insetos a ser clonado, e faz parte da família de genes *R* da classe NBS-LRR. Esse gene também medeia a HR entre *Solanum tuberosum* e o nematódeo *Meloidogyne*



*incognita* (Rossi *et al.*, 1998). Vários genes ativados por SA (*PR1*, genes *Touch*, *GST1*, *GST11*, *Cu/ZnSOD*) foram ativados durante a infestação de afídios (Moran *et al.*, 2002). Além disso, genótipos de trigo resistentes ao ataque de afídios têm uma indução mais rápida de genes *PRs* do que genótipos suscetíveis (van der Westhuizen *et al.*, 1998).

Também foi verificado que a resistência do trigo à larva da mosca *Mayetiola destructor* é acompanhada de uma lesão similar a HR que circunda o sítio de infestação da lagarta (Grover, 1995). A resistência a esse inseto é controlada por mais de 26 genes (Dweikat *et al.*, 1997). Alguns relatos demonstram que artrópodos galhadores como o ácaro *Aceria cladophytirus* (Bronner *et al.*, 1991) e os mosquitos *Orseolia oryzae* (Bentur e Kalode, 1996) e *Dasineura marginemtorquens* (Ollerstam *et al.*, 2002) também produzem lesões do tipo HR. Com relação aos minadores, Hoch *et al.*, (2000) observaram diferentes níveis de resistência ao himenóptero minador *Fenusa pusilla* em diversas espécies de bétula. Na espécie *Betula davurica*, os ovos depositados são circundados por uma área necrosada e morrem. Os autores sugerem que essa resposta é similar a uma morte celular programada associada à HR (Hoch *et al.*, 2000). Entretanto, em todos os casos citados acima, a HR foi visualizada após alguns dias e não após poucas horas da infestação, como descrito para patógenos. O único trabalho com galhadores que descreve os mecanismos moleculares que originaram as lesões similares a HR é o de Ollerstam e Larson (2003). Nesse trabalho, verificou-se que ocorreu acúmulo de SA em plantas resistentes a *D. marginemtorquens* e que a aplicação de SA em plantas suscetíveis diminuiu a taxa de sobrevivência da larva desse galhador.

Outros relatos comprovam que o mecanismo de oviposição pode desencadear mudanças metabólicas nos vegetais. Mumm *et al.* (2003) e Colazza *et al.* (2004)

verificaram que a oviposição de himenópteros modificou a emissão de terpenóides voláteis em *Pinus* e em leguminosas, respectivamente. A deposição de ovos por *Dipiron pini* em *Pinus* levou a diminuição da taxa fotossintética em regiões adjacentes a oviposição (Schröder *et al.*, 2005). Além disso, foi descoberto que uma proteína, ou um composto ligado a um polipeptídeo, presente na secreção do oviduto de *Dipiron pini* é responsável pela resposta de defesa indireta de *Pinus* frente à oviposição desse inseto (Hilker *et al.*, 2005).

Dióis de cadeia longa, conhecidos como bruchinas, são eliciadores de defesa encontrados no fluido de oviposição do bruquídeo monófago de ervilhas *Bruchus pisorum* (Doss *et al.*, 2000). As larvas desse bruchídeo não entram em contato com a porção exterior da vagem, penetrando diretamente em seu interior para se alimentar das sementes imaturas. Em genótipos de ervilha que contêm o gene de resistência *Np*, as bruchinas eliciam a formação de neoplasmas no sítio de oviposição impedindo a entrada da larva na vagem (Doss *et al.*, 2000). A bruchina do tipo B induziu a expressão de um gene que codifica uma proteína de função desconhecida envolvida em nodulação e senescência foliar (Doss, 2005) e de um gene similar a citocromos P450 envolvidos na síntese de isoflavonas (Cooper *et al.*, 2005).

### **3.3 - Interações entre vias de sinalização de defesa e fitohormônios**

De modo geral, as moléculas SA e JA atuam em vias antagonistas de sinalização de defesa. Aplicação de SA ou de seus análogos funcionais INA (2,6 ácido dicloroisonicotínico) e BTH (benzotiodiazol) diminui a expressão de genes induzidos por JA (Bowling *et al.*, 1997). Spoel *et al.* (2003) demonstraram que o efeito antagônico do SA sobre a expressão gênica disparada por JA é mediado pela proteína NPR1. Além disso, o fator de transcrição WRKY70 é um ativador das vias do

salicilato e um repressor das vias do jasmonato (Li *et al.*, 2004). Todavia, a coordenação dessas vias ainda não foi completamente entendida. Por exemplo, foi verificado que genes característicos das vias de jasmonato e de salicilato são induzidos durante a infestação de afídios (Moran *et al.* 2002), e que JA e SA têm efeito aditivo na resistência de *Arabidopsis* à bactéria *Pseudomonas syringae* (Van Wees *et al.*, 2000).

Fitohormônios como etileno e ácido abscísico (ABA) também interferem na sinalização da defesa vegetal. O etileno age sinergisticamente com JA na resistência a patógenos necrotróficos (Lorenzo *et al.*, 2004; Feys e Parker, 2000). Esse sinergismo é derivado da ativação transcricional de *ERF1*, que regula genes que respondem tanto a etileno quanto a jasmonato (Lorenzo *et al.*, 2003). Pieterse *et al.* (1998) descreveram um mecanismo de resistência sistêmica dependente de JA/etileno e independente de SA, que foi denominado ISR (do inglês *Induced Systemic Resistance*). Entretanto, dependendo do vegetal, o etileno pode antagonizar (Rojo *et al.*, 1999) ou ter efeito aditivo na resposta local à ferida (O'Donnell *et al.*, 1996). O ABA parece ter papel essencial na regulação da via dos octadecanóides e na indução seletiva entre vias de defesa contra ferida ou patógenos mediadas por JA. Mutantes de tomate *flacca*, que não produzem ABA, tiveram a expressão do gene induzido por jasmonato *LapA* bloqueada após o estímulo por ferimento (Chao *et al.*, 1999). Além disso, o fator de transcrição AtMYC2, regulador da expressão de genes da via de ferimento mediada por JA, é induzido por ABA (Lorenzo *et al.*, 2004). Entretanto, a aplicação exógena de ABA inibiu a expressão de genes da via JA/etileno de resposta a patógenos (Anderson *et al.*, 2004). A figura 2 mostra a complexidade das vias de sinalização de defesa em vegetais frente a diversos tipos de estresse biótico.

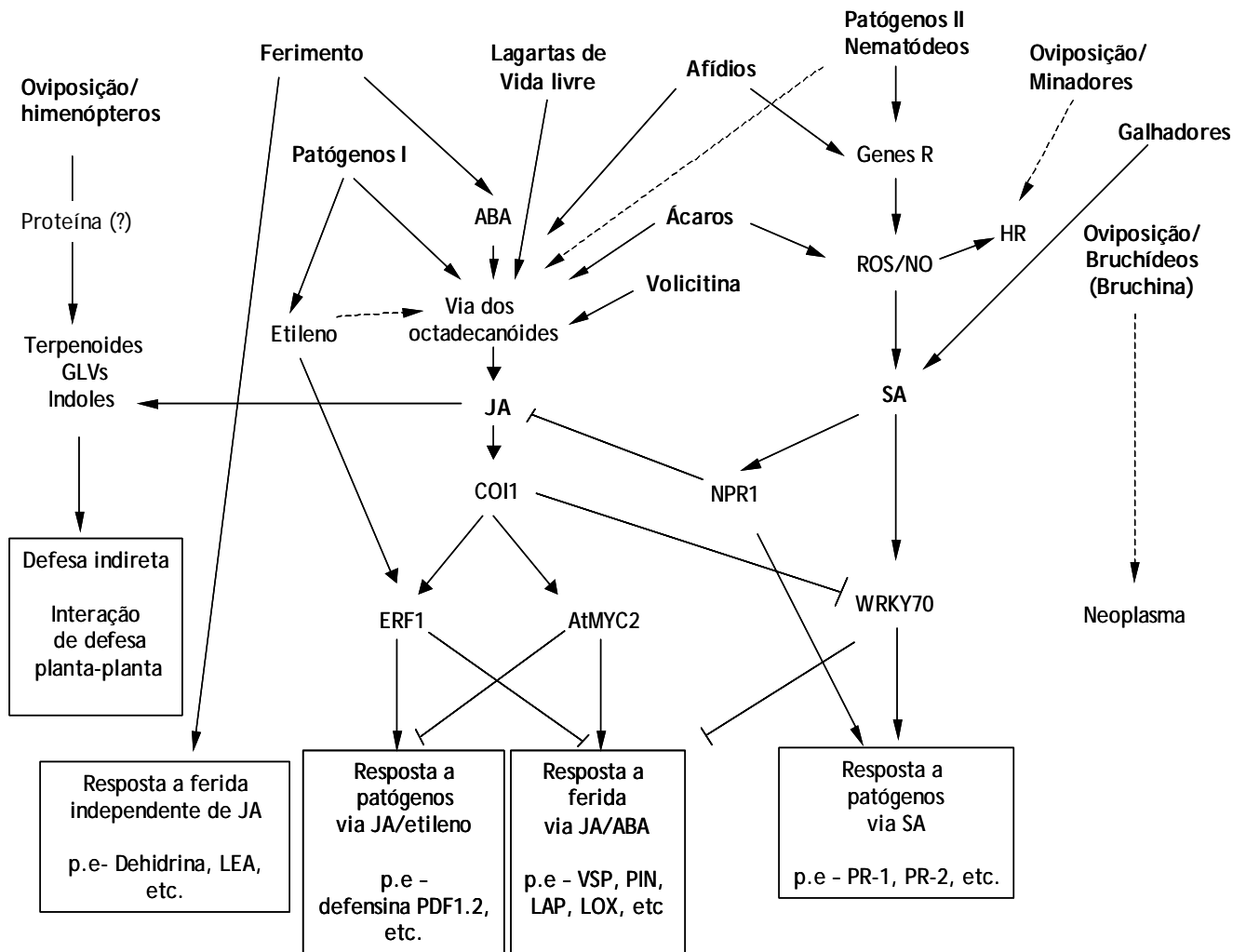


Figura 2: Mecanismos de transdução de sinal durante a defesa vegetal. Setas tracejadas apontam mecanismos desconhecidos ou dados contraditórios. Patógenos I correspondem à maioria dos patógenos necrotróficos como *Botrytis cinerea*. Patógenos II incluem a maioria dos patógenos biotróficos, como *Pseudomonas syringae*, e vírus. Adaptado de Walling (2000), Lorenzo *et al.*, (2004), Li *et al.*, (2004), Leon *et al.*, (2001) e Ferry *et al.*, (2004).

## **4. - Os Inibidores de Proteinases**

### **4.1 – Proteases e proteinases**

Um dos principais mecanismos de regulação protéica se dá pela ação das proteases. Essas enzimas participam do processo de tradução, da clivagem de peptídeos-sinal durante o direcionamento de proteínas e da degradação das proteínas nos proteossomos. Entretanto, talvez a principal função das proteases seja a ativação e desativação de enzimas. Esse mecanismo ocorre em diversos fenômenos biológicos como apoptose, coagulação sanguínea, ativação hormonal, etc.

Existe certa confusão quando ao uso da nomenclatura de proteases ou proteinases. Proteases (ou peptidases) são enzimas que hidrolizam ligações peptídicas, podendo remover aminoácidos seqüencialmente pela extremidade amino (N) terminal, sendo chamadas então de endopeptidases ou proteinases, ou pela extremidade carboxi (C) terminal, sendo denominadas exopeptidases.

As endopeptidases ou proteinases são divididas em seis classes: serínicas, aspárticas, cisteínicas, treonínicas, glutâmicas e metaloproteinases (MEROPS Database. <http://merops.sanger.ac.uk/>. Rawlings *et al.*, 2004a). Essa nomenclatura é baseada em mecanismos catalíticos que não serão descritos em detalhe aqui. A interação entre um substrato e uma proteinase acontece através da ligação entre resíduos de aminoácidos do substrato em subsítios da enzima ativa. Esses subsítios na proteinase são chamados S (para subsítios) e os resíduos de aminoácidos do substrato são chamados P (para peptídeo). Os resíduos de aminoácidos do substrato presentes no lado N-terminal da ligação peptídica que é hidrolisada pela proteinase são numerados P<sub>n</sub>, P<sub>(n-1)</sub>, ..., P<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub> e os resíduos do lado C-terminal são numerados P<sub>1</sub>' , P<sub>2</sub>' , P<sub>3</sub>' , ..., P<sub>(n-1)</sub>' , P<sub>n</sub>'. Os subsítios da proteinase que se ligam aos

resíduos do substrato são numerados  $S_n, S(n-1), \dots, S_3, S_2, S_1, S_1', S_2', S_3', \dots, S(n-1), S_n$ . A ligação peptídica do substrato que é clivada pela proteinase na hidrólise (resíduos  $P_1-P_1'$ ) é chamada “scissile bond” (figura 3). Na maioria das vezes, a clivagem ocorre em estruturas secundárias do substrato conhecidas como *loops*, que são estruturas mais expostas e flexíveis, facilitando a ação das proteinases.

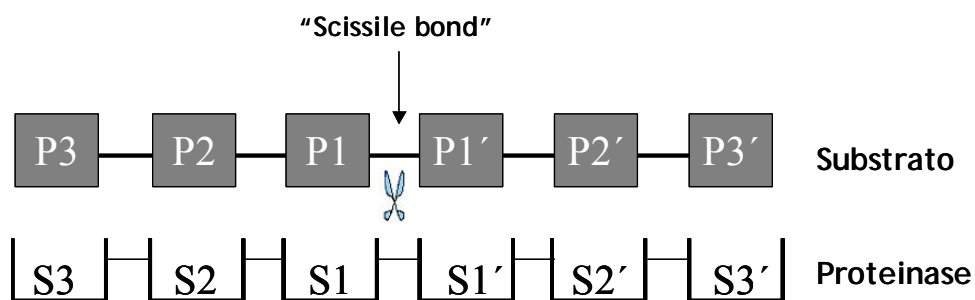


Figura 3: Esquema do mecanismo de ação de proteinases.

Sabendo que as proteinases são de grande importância na atividade celular, a regulação dessas enzimas deve ser finamente controlada. Um dos mecanismos de controle proteolítico advém da auto-regulação das proteinases. Essas enzimas são sintetizadas como precursores inativos, chamados de zimógenos, zimogênios ou pró-proteinases. A ativação dessas enzimas ocorre através da proteólise a partir do N-terminal (Schaller, 2004). O outro mecanismo de regulação envolve os inibidores de proteinase.

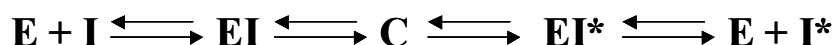
#### 4.2 – Inibidores de proteinase : modo de ação e classificação

Os inibidores de proteinase formam complexos inativos ou parcialmente inativos quando ligados a uma “proteinase alvo”. Essas proteínas são encontradas nos mais diversos organismos, desde bactérias até plantas e animais.

Os inibidores podem ser classificados quanto ao seu mecanismo de ação. O primeiro grupo inclui os inibidores que executam reações de *trapping*. Nesse mecanismo, o inibidor sofre uma mudança estrutural após clivagem pela proteinase, formando uma armadilha onde a proteinase fica presa. Esses inibidores não inibem a atividade da proteinase, mas simplesmente bloqueiam o acesso de substratos aos sítios S. As macroglobulinas e serpinas são proteínas presentes no plasma sanguíneo, que possuem esse tipo de mecanismo de inibição. Esse tipo de reação não é reversível, já que o inibidor não-modificado não é refeito após o *trapping*. Logo, inibidores desse grupo são considerados como “inibidores suicidas” (Rawlings *et al.*, 2004b). O outro grupo inclui os inibidores de proteinase que executam reações reversíveis do tipo *tight-binding*. A classificação referencial desse grupo de inibidores de proteinase é a de Laskowski e Kato (1980). Nessa revisão os autores dividem esses inibidores de acordo com a classe da proteinase por eles inibida. Seguindo essa classificação, até o momento são conhecidas quatro classes de inibidores de proteinase: inibidores de metaloproteinases, inibidores de proteinases aspárticas, inibidores de proteinases cisteínicas e inibidores de proteinases serínicas.

O mecanismo de ação dos inibidores de proteinase do tipo *tight-binding* começou a ser desvendado a partir da descoberta da reação de “mecanismo padrão”, através da interação entre a proteinase serínica tripsina e o inibidor de tripsina de soja (*Soybean Trypsin Inhibitor* Kunitz-STI) (Finkenstadt e Laskowski, 1965; Laskowski e

Kato, 1980). Por esse mecanismo, evidenciou-se que esses inibidores “mimetizam” substratos proteolíticos, impedindo a ação das proteinases sobre seus substratos “alvo”, através do bloqueio dos sítios reativos. Esse mecanismo obedece a seguinte reação:



E é a enzima, I e I\* são inibidor “virgem” e inibidor modificado, respectivamente, EI e EI\* são complexos rapidamente dissociáveis de E com I e I\* respectivamente, e C é o complexo estável entre enzima e inibidor.

Foi verificado que I liga-se perfeitamente a E, como um “substrato perfeito” Obedecendo ao mecanismo de ação das proteinases, seria esperado que a ligação entre I e E resultasse na desestabilização total de I após a clivagem na *scissile bond* P1-P1', e que não se formasse um complexo estável entre I e E. Entretanto, fatores estruturais dos inibidores indicam porque somente a *scissile bond* é clivada. Ao contrário da maioria dos substratos proteolíticos, esses inibidores possuem apenas um *loop* exposto, muitas vezes “enterrado” entre outras estruturas do inibidor. Além disso, a maioria dos inibidores é de tamanho pequeno (entre 3 e 44 kDa), possuem pontes disulfeto e uma grande quantidade de folhas-β, o que tornam os inibidores estruturas rígidas. Logo, a compactação, rigidez e estabilidade dos inibidores impedem a sua desestabilização após a clivagem no *loop* reativo.

Apesar do grande avanço ocorrido entre as décadas de 50 e 70 no entendimento da ação dos inibidores, e de quais seriam suas “proteinases alvo”, Laskowski e Kato (1980) enfatizaram que os inibidores foram descobertos a partir da sua atividade contra proteinases disponíveis (comerciais) como tripisna,



quimiotripsina, subtilisina (proteínases serínicas), papaína (proteínase cisteínica), catepsina D e pepsina (proteínases aspárticas) e que estes foram nomeados de acordo com o tecido (inibidor de tripsina pancreática) ou organismo (Inibidor de subtilisina de *Streptomyces*) de onde foram isolados. Esse tipo de denominação não traz evidências sobre a relação entre os inibidores e torna difícil saber se o mecanismo de ação de um inibidor pode ser aplicado a outro (Rawlings *et al.*, 2004b). Devido a sua facilidade de entendimento, a classificação de Laskowski e Kato (1980) tende ainda a perdurar por algum tempo. Entretanto, foi proposta uma nova classificação que procura não se basear nos padrões de classificação para proteínases (Rawlings *et al.*, 2004b).

Existem três diferenças básicas entre proteínases e inibidores: a) uma unidade inibitória (segmento de uma proteína que está envolvido na atividade inibitória) pode conter apenas 14 aminoácidos, enquanto unidades proteolíticas contêm aproximadamente 200 aminoácidos; b) sítios reativos dos inibidores não são tão conservados entre si como no caso das proteínases. Isso dificulta afirmar a partir da seqüência se um inibidor tem a mesma atividade observada em um inibidor homólogo; c) unidades inibitórias duplicaram e reduplicaram durante a evolução. Várias proteínas contêm cópias divergentes dessas unidades. Em contrapartida, em alguns poucos casos foi documentada a presença de mais de uma unidade proteolítica numa proteína. Tendo em vista essas diferenças, Rawlings *et al.* (2004b) fundamentaram sua classificação comparando seqüências de diferentes inibidores de proteína hipotéticos, com seqüências *type-examples*, ou seja, arquétipos de famílias de inibidores, cuja atividade enzimática já foi comprovada. A partir dessa análise, verificou-se que dentro da família de inibidores Kunitz STI (*Soybean Trypsin Inhibitor* – Kunitz; 1946), pertencente à classe de inibidores de proteínases serínicas (Laskowski

e Kato, 1980), podem também ser incluídos inibidores de proteinases cisteínicas e inibidores de proteinases aspárticas. Isso levou os autores a abandonarem a classificação por classes de proteinases inibidas e a adotarem uma classificação por similaridade de seqüência dentro de famílias, independente de qual classe de proteinase é inibida pelo inibidor. Adicionalmente, as famílias foram divididas em clãs quando proteínas da mesma família apresentaram estruturas terciárias distintas. Outro fator usado para o agrupamento dos inibidores em famílias é a quantidade e a localização de pontes dissulfeto nas proteínas. Entretanto, o estudo de Rawlings *et al.*, (2004b) comprovou que a conservação dos padrões de pontes disulfeto dentro dos diferentes clãs não foi tão marcante quanto o esperado. A tabela 2 resume a classificação adotada por Rawlings *et al.*, (2004b), que deu origem ao banco de dados de inibidores de proteinase MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>).

**Tabela 2: Famílias de inibidores de proteinase**

Família ou subfamília	Nome comum	Arquétipo de unidade inibitória (organismo)	Números de acesso no SWISS-PROT ou TrEMBL (unidade inibitória); e no Pfam	Famílias de proteinases inibidas <sup>a</sup>
I1	Kazal	Unidade ovomucóide 3 ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	P01004 (135–185); PF00050	S1
I2	Kunitz (animal)	Aprotinina ( <i>Bos taurus</i> )	P00974 (36–93); PF00014	S1
I3A	Kunitz (planta)	Inibidor de tripsina de soja ( <i>Glycine max</i> )	P01070 (25–205); PF00197	Principalmente S1, mas também C1 e A1
I3B		Inibidor de proteinase B ( <i>Sagittaria sagittifolia</i> )	P07479 (25–181); PF00197	S1
I4	Serpina	Inibidor de proteinase $\alpha$ ( <i>Homo sapiens</i> )	P01009 (25–418); PF00079	Principalmente S1, mas também S8, C1 e C14
I5	Ascidian	Inibidor de tripsina de ascidia ( <i>Halocynthia roretzi</i> )	P16589 (1–55)	S1
I6	Cereal	Inibidor de tripsina/ $\alpha$ -amylase de sementes de raji ( <i>Eleusine coracana</i> )	P01087 (1–122); PF00234	S1
I7	Squash	Inibidor de tripsina MCTI-1 ( <i>Momordica charantia</i> )	P10294 (1–30); PF00299	S1
I8	Ascaris	Inibidor anticoagulante de nematódeos ( <i>Ascaris suum</i> )	P07851 (1–63); PF01826	S1, mas também M4
I9	YIB	Inibidor de proteinase B ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	P01095 (1–74)	S8
I10	Marinostatina	Marinostatina ( <i>Alteromonas sp.</i> )	P29399 (1–14)	S1
I11	Ecotina	Ecotin ( <i>Escherichia coli</i> )	P23827 (21–162); PF03974	S1
I12	Bowman-Birk	Inibidor de tripsina vegetal Bowman–Birk ( <i>G. max</i> )	P01055 (42–71); PF00228	Principalmente S1, mas também C1
I13	pot 1	Eglna C ( <i>Hirudo medicinalis</i> )	P01051 (1–70); PF00280	Principalmente S1, mas também S8
I14	Hirudina	Hirudina ( <i>H. medicinalis</i> )	P01050 (1–65); PF00713	S1
I15	Antistasina	Antistasina unidade 1 ( <i>Haementeria officinalis</i> )	P15358 (18–72); PF02822	S1
I16	SSI	Inibidor de subtilisina ( <i>Streptomyces albogriseolus</i> )	P01006 (32–144); PF00720	Principalmente S8, mas também S1 e M4
I17	Elafina	Inibidor de proteinase de muco unidade 2 ( <i>H. sapiens</i> )	P03973 (26–83); PF00095	S1
I18	Mustard	Inibidor de tripsina de mostarda ( <i>Sinapis alba</i> )	P26780 (31–93); PF05828	S1
I19	Pacifastina	Inibidor de proteinase LCMI I ( <i>Locusta migratoria</i> )	P80060 (20–54)	S1
I20	pot 2	Inibidor de proteinase II ( <i>Solanum tuberosum</i> )	P01080 (28–86); PF02428	S1
I21	7B2	secretogranina V ( <i>H. sapiens</i> )	P05408 (27–212); PF05281	S8
I24	pinA	Inibidor pinA de endopeptidase La (bacteriófago T4)	P07068 (1–161)	S16
I25A	Cistatina 1	Cistatina A ( <i>H. sapiens</i> )	P01040 (1–98); PF00031	C1
I25B	Cistatina 2	Ovocistatina ( <i>Gallus gallus</i> )	P01038 (24–139); PF00031	Principalmente C1 mas também C13
I25C	Cistatina 3	Inibidor de metaloproteinase ( <i>Bothrops jararaca</i> )	Q9DGI0 (28–141); PF00031	Não inibe C1, mas S8, M12
I27	Calpastatina	Calpastatina unit 1 ( <i>H. sapiens</i> )	P20810 (170–222); PF00748	C2
I29	CTLA	Antígeno de linfócito T Citotóxico ( <i>H. sapiens</i> )	P12399 (27–136)	C1
I31	Tiropina	Equistatina ( <i>Actinia equina</i> )	P81439 (50–98); PF00086	C1
I32	IAP	BIRC-5 ( <i>H. sapiens</i> )	O15392 (1–142); PF00653	C14
I33	Ascaris PI3	Inibidor de pepsina PI-3 de <i>Ascaris (A. suum)</i>	P19400 (21–169)	A1

(Continua na próxima página)

(Continuação da página anterior)

Família ou subfamília	Nome comum	Arquétipo de unidade inibitória (organismo)	Números de acesso no SWISS-PROT ou TrEMBL (unidade inibitória); e no Pfam	Famílias de proteinases inibidas <sup>a</sup>
I34	IA3	Inibidor de saccharopepsina ( <i>S. cerevisiae</i> )	P01094 (1–68)	A1
I35	Timp	Timp-1 ( <i>H. sapiens</i> )	P01033 (24–207); PF00965	Principalmente M10, mas também M12
I36	SMI	Inibidor de metaloproteinase <i>Streptomyces</i> ( <i>Streptomyces nigrescens</i> )	P01077 (30–131)	M4
I37	PCI	Inibidor de carboxipeptidase de batata ( <i>S. tuberosum</i> )	P01075 (1–39)	M14
I38	Aprina	Inibidor de metaloproteinase ( <i>Erwinia chrysanthemi</i> )	P18958 (20–120); PF02977	M10
I39	$\alpha_2$ M	$\alpha_2$ -macroglobulina ( <i>H. sapiens</i> )	P01023 (24–1474); PF00207	Várias famílias de proteinases aspárticas, cisteínicas, serínicas e metaloproteinases
I40	Bombyx	Inibidor de subtilisina Bombyx ( <i>Bombyx mori</i> )	Q10731 (1–77)	S8
I42	Chagasina	Chagasina ( <i>Leishmania major</i> )	Q9GY64 (1–179)	C1
I43	Oprina	Oprina ( <i>Didelphis marsupialis</i> )	P82957 (83–291); PF00047	M12
I44	–	Inibidor de carboxipeptidase A ( <i>A. suum</i> )	P19399 (1–65)	M14
I46	LCI	Inibidor de carboxipeptidase de sanguessuga ( <i>H. medicinalis</i> )	P81511 (16–81)	M14
I47	Latexina	Latexina ( <i>H. sapiens</i> )	Q9BS40 (1–222)	M14
I48	Clitocipina	Clitocipina ( <i>Lepista nebularis</i> )	Q9P4A2 (1–150)	C1
I49	proSAAS	proSAAS ( <i>H. sapiens</i> )	Q9UHG2 (34–260)	S8
I50	p35	Baculovirus p35 caspase inibidor ( <i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus)	O41275 (1–296); PF02331	C14, mas também C25
I51	IC	Inibidor de carboxipeptidase Y ( <i>S. cerevisiae</i> )	P14306 (1–219); PF01161	S10
I52	TAP	Peptídeo anticogulante de carrapato ( <i>Ornithodoros moubata</i> )	P17726 (1–60)	S1
I57	–	Estafostatin B ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	Q9EYW6 (1–109)	C47
I58	–	Estafostatina A ( <i>S. aureus</i> )	Q99SX7 (1–108)	C47
I59	Triabina	Triabina ( <i>Triatoma pallidipennis</i> )	Q27049 (19–160)	S1

a – Identificação das famílias de proteinases inibidas segundo o banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>).

Tabela adaptada de Rawlings *et al.*, (2004b)

### 4.3 – Participação no desenvolvimento vegetal

Nos últimos anos cresceu o interesse no estudo dos mecanismos de regulação proteolítica em vegetais. Isso se deve principalmente à descoberta da ligação entre a principal via proteolítica de eucariontes, a via ubiquitina-proteossomo, com inúmeros processos de desenvolvimento vegetal, como fotomorfogênese, embriogênese, ritmo circadiano, senescência foliar, sinalização hormonal, desenvolvimento floral e de tricomas, assim como na resposta a auxinas, citocininas, giberelinas, ABA e jasmonato (Vierstra, 2003). Entretanto, outras proteinases que não fazem parte do complexo de ubiquitinação participam de mecanismos de regulação de crescimento vegetal. Proteinases cisteínicas como as fitocalpaínas, papaína-*like* e VPEs atuam na formação do meristema foliar, na regulação da formação da epiderme e do endosperma do embrião e na degradação e mobilização de aminoácidos durante germinação e senescência foliar (revisado por Schaller, 2004). Proteinases aspárticas como fitepsinas agem na senescência foliar e na interação pólen-pistilo (Simões e Faro, 2004). Metaloproteinases estão envolvidas na remoção de peptídeos sinal de direcionamento ao estroma de cloroplastos e na remodelagem da matriz extracelular (Richter e Lamppa, 1998; Maidment *et al.*, 1999). Proteinases serínicas do tipo serino-carboxipeptidases participam da sinalização de brassinoesteróides (Li *et al.*, 2001), enquanto proteinases serínicas do tipo subtilase estão envolvidas na formação da cutícula e da epiderme na embriogênese, no desenvolvimento de nódulos de fixação de nitrogênio e também na regulação da densidade de estômatos (Ribeiro *et al.*, 1995; Berger e Altmann, 2000; Tanaka *et al.*, 2001). Provavelmente, essas proteinases agem como ativadores de uma proteína inativa, que quando clivada desempenharia funções durante o desenvolvimento. Existem diversos trabalhos demonstrando ou correlacionando ação de proteinases com eventos de PCD, como xilogênese,

degradação do tapete da antera e das células da aleurona. Foi verificado que subtilases são expressas na diferenciação do xilema (Zhao *et al.*, 2000; Gollmack *et al.*, 2003) e no tapete da antera nos estágios finais da microsporogênese (Taylor *et al.*, 1997). Algumas proteinases cisteínicas vegetais são capazes de clivar substratos de caspases, que são proteinases cisteínicas envolvidas na cascata proteolítica de iniciação de apoptose em animais (Chichkova *et al.*, 2004). Coffeen e Wolpert (2004) descobriram duas subtilases de aveia aparentemente envolvidas numa cascata proteolítica que leva a PCD incentivada por uma micotoxina. Assim como as caspases, essas subtilases requerem resíduos de aspartato na posição P1 do substrato. Desse modo, por analogia as caspases animais, elas foram nomeadas saspases (proteinases serínicas aspartato-específicas).

Seguindo a premissa de que o mecanismo proteolítico é regulado, o papel dos inibidores de proteinase durante o desenvolvimento vegetal deve ser de suma importância. Entretanto, existem poucos relatos comprovando a participação efetiva dos inibidores na homeostase vegetal. Um dos processos onde a ação de inibidores de proteinase é sugerida é a inibição de enzimas endógenas de sementes, como  $\alpha$ -amilases e proteinases serínicas e cisteínicas. Nesse caso, acredita-se que os inibidores estariam impedindo a hidrólise prematura dos materiais de reserva. De fato, diversos inibidores são encontrados em sementes e frutos imaturos (Spencer e Hodge, 1991; Corre-Menguy *et al.*, 2002; Rodrigues-Macedo *et al.*, 2003). Também é possível que os próprios inibidores de proteinase possam servir como proteínas de reserva em sementes e em tubérculos de batata. Proteínas de reserva costumam ser robustas, resistindo a ataque proteolítico e a variações intensas de temperatura. Os inibidores de proteinase encaixam-se perfeitamente nessas características. Também

foi proposto que os inibidores possam servir de fontes de enxofre para a planta, graças a sua grande quantidade de pontes dissulfeto.

Sugawara *et al.* (2002) identificaram uma cistatina induzida durante o desenvolvimento de pétalas de *Dianthus caryophyllus*. Curiosamente, uma proteinase cisteínica é induzida no início do estágio de senescência da pétala, indicando que inibidores de proteinase possam regular o processo de senescência floral. Solomon *et al.* (1999) propuseram um novo papel para os inibidores em plantas. Nesse trabalho, a PCD ativada por estresse oxidativo em células de tabaco induziu a expressão de proteinases cisteínicas. Além disso, a expressão ectópica do inibidor de proteinase cistatina inibiu a atividade de proteinases cisteínicas e bloqueou a PCD. A partir desses resultados pode-se inferir que inibidores de proteinase possam atuar na regulação de proteinases envolvidas em PCD.

Apesar de poucos trabalhos terem comprovado a ação efetiva dos inibidores de proteinase durante o desenvolvimento de plantas, essas proteínas têm a sua expressão modulada pela ação de fitohormônios. Como mencionado anteriormente, a expressão de inibidores de proteinase durante a maturação de sementes facilitaria o acúmulo de proteínas de reserva pela inibição de proteinases (Ishikawa *et al.*, 1994). Consistente com essa função, giberelinas incentivam a germinação, induzem a expressão de proteinases e inibem a expressão de inibidores de proteinase PinII da família Pot1 (Jacobsen e Olszewski, 1996). Esse dado corrobora com a indução de *PinII* por ABA, fitohormônio inibidor da germinação de sementes (Hildmann *et al.*, 1992). Carrera e Prat (1998) verificaram que em mutantes deficientes em ABA, ocorreu o bloqueio da expressão de *PinII* induzida por ferimento.

#### 4.4 – Envolvimento na defesa vegetal

A participação de proteinases e inibidores também é importante durante a defesa em vegetais. Proteinases cisteínicas papaína-*like* mostraram-se tóxicas ao desenvolvimento de larvas de lepidópteros (Pechan *et al.*, 2000; Konno *et al.*, 2004). RD-21, outra proteinase papaína-*like*, é induzida em batata após infecção do oomiceto biotrófico *Phytophthora infestans* (Avrova *et al.*, 1999). A subtilase P69 foi induzida durante a infestação por viróides, e provavelmente é a responsável pelo processamento de uma proteína do tipo LRR (Tornerio *et al.*, 1996 a,b; Tornerio *et al.*, 1997). Recentemente, Tian *et al.* (2004) verificaram que P69B participa da defesa contra *P. infestans* e que, curiosamente, é alvo de um inibidor de proteinase da família Kazal liberado no meio apoplástico pelo patógeno. Os autores sugerem que ao inativar a subtilase P69B, esse inibidor poderia agir como um supressor de PCD.

Estudos com inibidores de proteinase da família cistatina demonstraram que essas proteínas têm atividade anti-fúngica (Soares-Costa *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2003). Plantas de tabaco superexpressando uma cistatina de arroz foram mais resistentes à infecção por vírus da família potivírus do que plantas selvagens (Gutiérrez-Campos *et al.*, 1999). Num seguimento do trabalho de Solomon *et al.* (1999), Belenghi *et al.* (2003) verificaram que a cistatina AtCYS de *Arabidopsis* é induzida por ferimento, por óxido nítrico e por uma cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae*, e que a superexpressão de AtCYS bloqueou a PCD ativada por *P. syringae* em células em suspensão e em plantas transgênicas. LeMir, proteína da família Kunitz STI, foi induzida durante o ataque de nematódeos em tomate (Brenner *et al.*, 1998), e os genes *SrPI1* e *NF34*, que codificam proteínas também da família Kunitz STI, foram induzidos durante a interação simbiótica de formação de nódulos de



fixação de nitrogênio e durante a HR contra TMV em tabaco (Lievens *et al.*, 2004; Karrer *et al.*, 1998), respectivamente.

A aplicação exógena de metil jasmonato, jasmonato e precursores octadecanóides, moléculas que regulam vias de resposta a ferimento, defesa contra herbívoros e patógenos, é capaz de induzir a expressão de inibidores de proteinase ativados por ferimento (Farmer e Ryan, 1992; Moura e Ryan, 2001; Zhang *et al.*, 2004). Além disso, vários trabalhos demonstram que genes que codificam inibidores de proteinase são induzidos por ferimento (Haruta *et al.*, 2001; Cheong *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). De fato, a maior parte dos trabalhos envolvendo inibidores de proteinase e defesa vegetal demonstrou que essas proteínas têm ação danosa contra artrópodos herbívoros (Walling, 2000; León *et al.*, 2000). Diversos inibidores de proteinase foram usados para criar plantas transgênicas que inibiram o desenvolvimento de insetos quando fornecidas como alimento ao artrópodo (Hilder *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1989; Lecardonnell *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Lawrence e Novak, 2001). Em outros trabalhos, os inibidores foram adicionados à dieta de insetos, acarretando na redução do crescimento, da fecundidade, e da reprodução desses animais (Rodrigues-Macedo *et al.*, 2003; Amirhusin *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2004). As proteinases são extremamente importantes no desenvolvimento de artrópodos, agindo na digestão de proteínas, na biossíntese de peptídeos hormonais e de neuropeptídeos, e no processo de ecdise (Lawrence e Koundal, 2002).

Insetos que possuem o pH do trato digestivo neutro ou alcalino possuem proteinases serínicas. Por outro lado, insetos que possuem trato digestivo ácido ou levemente ácido geralmente utilizam proteinases cisteínicas e/ou aspárticas. Embora exista um padrão de predominância envolvendo proteases serínicas em dípteros e lepidópteros, e proteinases cisteínicas em coleópteros, exceções são comuns.

Existem diferentes visões sobre o modo de ação dos inibidores no aparelho digestivo de insetos. Um dos mecanismos sugeridos propõe que as taxas de crescimento dos insetos caem devido à redução dos níveis de proteólise pela ação do inibidor. Entretanto, Broadway e Duffey (1988) sugeriram que existe um mecanismo de *feedback* que leva à uma hiperprodução de proteinases para compensar a falta de atividade proteolítica desencadeada pela ingestão do inibidor. Desse modo, os altos níveis proteolíticos causariam a depleção de aminoácidos essenciais e, por conseguinte, o retardamento dos níveis de crescimento do artrópodo.

Apesar de os inibidores de proteinase serem proteínas efetivas contra a herbivoria de artrópodos, biótipos resistentes de insetos podem surgir após a exposição prolongada à pressão de seleção mediada pela proteína inseticida. Por exemplo, lepidópteros e coleópteros são capazes de se adaptar à dieta contendo inibidores de proteinase através da produção de proteinases insensíveis à inibição proteolítica (Jongsma e Bolter, 1997; Bown *et al.*, 1997; Cloutier *et al.*, 2000; Muzamdar-Leighton e Broadway, 2001). Além disso, a habilidade de pragas na adaptação aos inibidores parece ser espécie-específica e dependente dos níveis de expressão em vegetais. De Leo *et al.* (2001) verificaram que baixos níveis de expressão do inibidor de tripsina MTI-2 na crucífera *Brassica napus* retardaram o desenvolvimento larval e ocasionaram alta mortalidade na lagarta *Plutella xylostella*, mas não da larva de *Spodoptera littoralis*. O estágio de desenvolvimento do inseto também parece interferir na sua resistência frente aos inibidores de proteinase. Liu *et al.*, (2004) verificaram que houve a indução de proteinases cisteínicas e aspárticas em larvas de coleópteros que sobreviveram à exposição contínua de altas doses de cistatina. Essas proteinases foram mais expressas em larvas em estágio final de

desenvolvimento, o que pode explicar o maior índice de mortalidade em larvas neonatas do que em indivíduos mais velhos, quando alimentados com esse inibidor.

#### **4.5 A família Kunitz STI de inibidores de proteinase e proteínas similares à miraculina**

Uma das famílias de inibidores de proteinase de plantas mais estudada é a família Kunitz STI. A maioria das proteínas dessa família tem massa molecular de cerca de 21 kDa, quatro resíduos de cisteínas formando duas pontes dissulfeto, além de possuírem uma seqüência de aminoácidos conservada no N-terminal: (L/I/V/M)-x-D-x-(E/D/N/T/Y)-(D/G)-(R/K/H/D/E/N/Q)-x-(L/I/V/M)-x(5)-Y-x-(L/I/V/M). Esses inibidores pertencem à família I3 clan IC segundo a classificação do MEROPS. Devido aos primeiros inibidores dessa família inibirem a atividade de tripsina, quimiotripsina e subtilisina, estes foram classificados como inibidores de proteinase serínica (Laskowski e Kato, 1980). Porém, proteínas Kunitz também inibem proteinases aspárticas e cisteínicas. Inibidores Kunitz de cereais tem atividade bi-funcional agindo sobre  $\alpha$ -amilase e subtilisina. Ao contrário dos inibidores Kunitz de legumes caracterizados até o momento, inibidores de cereais parecem ser importantes na regulação de proteínas endógenas, como a  $\alpha$ -amilase responsável pela mobilização de amido durante a germinação de sementes (Waghorn *et al.*, 2003). A existência de um membro dessa família (albumina de feijão alado - WBA) sem atividade inibitória sugere que essas proteínas evoluíram a partir de proteínas de reserva (Kortt *et al.*, 1989).

A estrutura terciária dessa família é bastante característica. A estrutura possui 12 folhas- $\beta$  formando um arranjo chamado de " $\beta$ -trefoil". Curiosamente, estruturas  $\beta$ -trefoil são encontradas em proteínas que não possuem similaridade funcional e pouca

ou nenhuma similaridade de seqüência com proteínas Kunitz STI. Essas proteínas incluem os fatores de crescimento de fibroblastos, interleucinas 1 $\alpha$  e 1 $\beta$ , toxinas do tipo ricina, aglutininas vegetais, histactofilina, fascina humana, etc. (revisado por Ponting e Russell, 2000). Estudos filogenéticos sugerem que proteínas  *$\beta$ -trefoil* possam ter origem a partir de um ancestral comum (Ponting e Russell, 2000).

Uma das proteínas constituintes da família STI é conhecida como miraculina. Essa proteína extraída de frutos do arbusto *Richadella dulcifica* é o princípio ativo que faz com que frutos vermelhos dessa planta tenham a propriedade de transformar sabores azedos em doces (Theerasilp e Kurihara, 1988). Estudos bioquímicos demonstraram que essa proteína é básica e altamente glicosilada (Theerasilp *et al.*, 1989). Além disso, a miraculina possui 7 resíduos de cisteínas, que originam três pontes dissulfeto dentro da mesma cadeia polipeptídica e uma ponte ligando duas cadeias polipeptídicas distintas. Essa proteína é capaz de formar homodímeros e homotetrâmeros que têm atividade modificadora de sabor (Igeta *et al.*, 1991). O gene que codifica essa proteína foi clonado por Masuda *et al.* (1995). Várias proteínas com funções desconhecidas possuem similaridade com a miraculina de *R. dulcifica*. Dentre elas podemos destacar a proteína relacionada a tumor e eliciadora da HR contra TMV em tabaco (Fujita *et al.*, 1994; Karrer *et al.*, 1998), a proteína LeMir induzida durante a infestação de nematódeos do gênero *Meloidogyne* em tomate (Brenner *et al.*, 1998), a albumina de 21 kDa de cacau (Spencer e Hodge, 1991) e MTt1 cuja expressão é aumentada durante a formação de micorriza em *Medicago trunculata* (Wulf *et al.*, 2003).

## **OBJETIVOS**

A partir da demanda pelo entedimento dos mecanismos moleculares que regem a interação entre o cafeeiro e o bicho mineiro, a presente tese de doutoramento foi realizada visando os seguintes objetivos:

- Identificar genes diferencialmente expressos durante a infestação do bicho mineiro (*L. coffeella*) em plantas resistentes e suscetíveis da progênie H14954-29, utilizando as técnicas de biblioteca de subtração e macroarranjos de DNA,
- Caracterizar genes de café induzidos durante a infestação do bicho mineiro (*L. coffeella*).

## **RESULTADOS**

Dividimos esse tópico da tese em dois capítulos, cada um referente a um artigo. No capítulo I apresentamos um artigo publicado que descreve o isolamento de genes induzidos durante a infestação do bicho mineiro em plantas de café da progênie H14954-29, através do uso das técnicas de macroarranjos de DNA e bibliotecas de subtração. O capítulo II é referente a um artigo a ser submetido descrevendo a clonagem e caracterização da expressão de um gene similar a proteínas da família Kunitz STI de inibidores de proteinases.

## Capítulo I

### Isolation and characterization of *Coffea* genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation

Jorge Maurício Costa Mondego, Oliveira Guerreiro-Filho,  
Mario Henrique Begtson, Rodrigo Duarte Drummond,  
Juliana de Maria Felix, Melina Pasini Duarte, Daniel Ramiro,  
Mirian Perez Maluf, Mari Cleide Sogayar e Marcelo Menossi

Plant Science, 169 (2): 351-360. (2005).

## Isolation and characterization of *Coffea* genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation

Jorge Maurício Costa Mondego<sup>a,b</sup>, Oliveira Guerreiro-Filho<sup>c</sup>, Mário Henrique Bengtson<sup>d</sup>, Rodrigo Duarte Drummond<sup>a,b</sup>, Juliana de Maria Felix<sup>a,b</sup>, Melina Pasini Duarte<sup>a,b</sup>, Daniel Ramiro<sup>c</sup>, Mirian Perez Maluf<sup>c</sup>, Mari Cleide Sogayar<sup>d</sup>, Marcelo Menossi<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Laboratório de Genoma Funcional, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010, 13083-875 Campinas, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Café Alcides Carvalho, Instituto Agrônomo de Campinas, 13020-902 Campinas, SP, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), Laboratório de Biologia Celular e Molecular, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

Received 7 January 2005; received in revised form 15 March 2005

Available online 2 April 2005

### Abstract

*Coffea arabica*, one of the most important breeding species in the world, is susceptible to the leaf miner *Leucoptera coffeella*, which causes severe damage to coffee plantations. A closely related coffee species (*Coffea racemosa*) resistant to this insect was crossed with *C. arabica* and resulted in segregating progenies with resistance or susceptibility to coffee leaf miner. The aim of this work was to isolate and characterize the genes involved in coffee resistance to this pest. Subtracted cDNA libraries enriched in genes preferentially expressed in coffee plants resistant to *L. coffeella* were constructed. Approximately 1500 clones were spotted on nylon membranes and hybridized to cDNA probes derived from RNA samples from infestation experiments. Several genes were differentially expressed. We selected expressed ESTs with the most interesting expression profiles and confirmed the up-regulation of five of them (Class III Chitinase PR-8, signal peptidase complex subunit SPC25, photosystem gene *psaH*, a putative calcium exchanger similar to *CAX9* and a homeotic gene *BEL*) by RNA blot. The possible functions of these genes in coffee resistance and coffee development, and a hypothetical defense mechanism against *L. coffeella* are discussed.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Biotic stress; Coffee; DNA arrays; Plant-insect interactions; Subtracted cDNA libraries

### 1. Introduction

Coffee (*Coffea* sp.) is one of the most important tropical crops in the world. *Coffea arabica*, the main cultivated species, is susceptible to infestation by the coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) (Guérin Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). This insect causes severe damage to coffee crops, with losses that may reach 50% of the total production [1]. The *L. coffeella* moth deposits its eggs on the adaxial

leaf surface. After the embryonic stage (4–6 days), the larva ecdyses from the egg towards the mesophyll and forms mines during its feeding. Subsequently, the larva leaves the mine and becomes a chrysalis that adheres to the abaxial leaf surface. The transformation of the chrysalis into a new moth completes the insect's life cycle (Fig. 1).

Different levels of resistance to this pest have been observed among *Coffea* species. In resistant species, the larva dies within the mine, or may not even manage to ecdyse from the egg. The genes of one of these naturally resistant species, *C. racemosa*, have been used to develop pest-resistant coffee varieties because of the ease with

\* Corresponding author. Tel.: +55 193788 1118; fax: +55 193788 1089.  
E-mail address: [menossi@unicamp.br](mailto:menossi@unicamp.br) (M. Menossi).

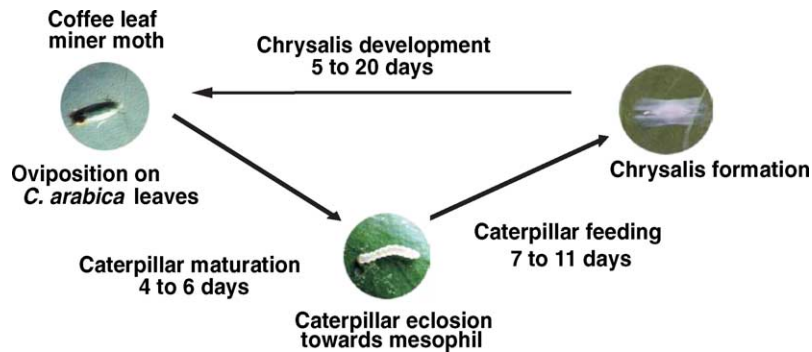


Fig. 1. Life cycle of the coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*).

which this species can be crossed with *C. arabica* [2]. The resistance to coffee leaf miner in plants obtained by crosses between *C. arabica* and *C. racemosa* apparently derives from two complementary and dominant genes [3,4]. Despite the importance of the damage caused by the coffee leaf miner to *C. arabica* crops, little is known about the defense mechanisms that resistant plants activate against *L. coffeella*.

Plants have developed several defense mechanisms to respond to biotic stress, such as caused by bacteria, fungi, nematodes and arthropods. Some signaling pathways have been identified as being important in this response. The salicylic acid (SA)-dependent cascade plays a central role in defense against pathogens [5,6], and the jasmonic acid (JA)-dependent cascade is related to the activation of defenses against pathogens and wounding, such as caused by herbivore chewing [5–7]. Most of the studies describing arthropod infestation have dealt with species that extensively injure the foliage [7]. There is little information on how plants deal with more sedentary herbivores, such as aphids, spider mites, galling insects and leaf miners, which cause less damage to the leaves [7].

The advent of genome projects has led to the development of new methodologies that have extended our ability to analyze gene expression. Among these techniques, DNA arrays on high-density nylon filters have been used to identify genes induced by various factors [8,9]. Additionally, the construction of subtractive cDNA libraries has also been used to isolate genes that are differentially expressed between two cDNA populations. Suppressive subtraction hybridization (SSH) [10] and Representational difference analysis (RDA) [11] are the most commonly used techniques to prepare subtracted cDNA libraries. The combination of DNA arrays and subtracted cDNA libraries has been applied to the identification and cloning of genes in various biological models [12–14].

In this work, we have used a combination of subtracted cDNA libraries (RDA and SSH) and DNA arrays to clone and analyze the expression of coffee plant genes induced during coffee leaf miner infestation. To our knowledge, this is the first report on gene expression in coffee plants attacked by *L. coffeella*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Insect rearing

*Leucoptera coffeella* were reared on seedlings of *C. arabica* on a 16:8 light/dark photoperiod, at a temperature of  $29 \pm 2$  °C and a relative humidity of  $85 \pm 5\%$ . The adult insects were fed with a 10% sucrose solution.

### 2.2. Plant material and evaluation of coffee plant resistance to *L. coffeella*

Coffee plants were obtained from the Agronomic Institute of Campinas (IAC), Campinas, São Paulo, Brazil. The experiments to assess leaf miner resistance were done with progeny H14954-29 plants, from the fifth backcross generation of the (*C. racemosa* × *C. arabica*) × *C. arabica* breeding program [4]. Isolated leaves were infested in rearing cages [4]. On the following day, 1.8 cm leaf discs were taken from the leaves using a cork bore. The discs were placed on damp plastic foam and maintained in a plastic box for two weeks. *Coffea arabica* cultivar Catuaí vermelho leaves were used as a susceptible control. *Coffea arabica* cultivar Mundo Novo plants were used to assess the organ-specific expression of coffee genes. Leaves, roots, different phases of flower development (green flower buds, white flower buds and open flowers) and fruits in different stages of development (early green, green, green–yellow, yellow, yellow–red and red) were collected and immediately frozen in nitrogen liquid.

### 2.3. Leaf miner infestation

Two infestation experiments were done. In each experiment, 60 young leaves from highly susceptible plants (S) and 60 leaves from highly resistant plants (R) were detached from the corresponding plants. Each leaf was inserted by the petiole into a 2 ml microcentrifuge tube filled with water. The tubes were then fixed to a plastic support and 40 S and 40 R leaves were placed in *L. coffeella* rearing cages. The other support containing 20 S and 20 R leaves was incubated in a plastic box without coffee leaf miners. Cork



bores 3–8 cm in diameter were used to collect leaf discs with eggs or with mines on the leaf surface. Three days after infestation, *L. coffeella* eggs were removed from 20 S leaves (So: susceptible after oviposition) and 20 R leaves (Ro: resistant after oviposition), and the respective leaf discs were collected. After egg hatching (i.e. four days after Ro/So collection), the larvae were removed from the mines of the remaining S leaves and leaf discs from S leaves (Se: susceptible after larval eclosion) and R leaves (Re: resistant after eclosion) were collected. Leaf discs from control S (Sc: susceptible control) and control R (resistant control) leaves were also collected. All leaf discs were immediately frozen in liquid nitrogen after collection.

#### 2.4. RNA extraction

Total RNA was isolated as previously described [15], with slight modifications. Leaf discs were ground in liquid nitrogen and 0.2 g of tissue was resuspended in 700  $\mu$ l of RNA extraction buffer (8 M guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) and 700  $\mu$ l of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v). The aqueous phase was recovered and extracted in 700  $\mu$ l of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v). The supernatant was then resuspended in 700  $\mu$ l of chloroform/isoamyl alcohol (24:1, v/v). The last supernatant was precipitated with 3 M sodium acetate, pH 5.2 (0.2 v) and ethanol absolute (1 v) at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 16 h. After centrifugation, the pellets were washed in 70% ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water.

#### 2.5. Construction of subtracted cDNA libraries

Double-stranded cDNA from tester (Ro + Re) and driver (Rc + So + Se) RNA samples was obtained using the Smart cDNA synthesis kit (Clontech, USA). RDA was done as described previously [16] and the double-stranded cDNA was digested with *Mbo*I. Three rounds of subtraction (DP1, DP2 and DP3) were executed [16]. SSH was done with the PCR-select subtraction kit, according to the manufacturer's recommendations (Clontech, USA). cDNA fragments were purified with GFX columns (ApBiotec, USA). Both SSH and RDA cDNAs were cloned into the SK II<sup>-</sup> pBluescript vector and transformed in DH5 $\alpha$  *E. coli* cells. Recombinant clones identified on X-gal-containing plates were picked into individual wells of 96-well trays containing 0.15 ml of Circle Grow broth (BIO 101, USA) in 8% glycerol and allowed to grow at  $37^{\circ}\text{C}$ . Plasmidial DNA was purified, resuspended in water and stored in 96-well trays at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.6. DNA array preparation, hybridization and analysis

Sixteen 96-well plates containing plasmid clones of subtracted cDNA libraries were selected (eight from RDA

and eight from SSH). The plasmid DNA was denatured in 0.2 N NaOH for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and spotted onto Hybond-N filters (Amersham, USA) with a hand-held 96-pin printhead tool (V&P Scientific, San Diego, USA), which applies 0.1  $\mu$ l of DNA solution (approximately 5 ng of DNA). The set of eight 96-well plates was spotted on different nylon filters in a  $4 \times 4$  array configuration (768 ESTs per filter). The DNA was fixed to the filters by baking at  $80^{\circ}\text{C}$  for 2 h and the filters were then stored at room temperature until hybridization. Variations in the amount of DNA on the spots were estimated by hybridizing the filters with a [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP labeled oligonucleotide probe that recognized the sequence of the *Amp*<sup>r</sup> gene of the plasmid vector, according to McPherson (<http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html>). The filters were then exposed to imaging plates for 96 h and scanned in a Phosphorimager FLA3000-G (Fujifilm, Japan). The oligo vector probe was stripped from the filters by boiling in 0.1% SDS. cDNA probes were produced as described previously [17]. Fifteen micrograms of total RNA was reverse transcribed in a final volume of 25  $\mu$ l with Superscript II RT (Invitrogen, USA) using 3  $\mu$ M of an oligo-dT18V primer, unlabeled dATP, dGTP, and dTTP (1 mM each) and 3000 Ci mmol<sup>-1</sup> of [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP at  $42^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Subsequently, unlabeled dCTP was added to a final concentration of 1 mM and, after 40 min, the probes were purified using ProbeQuant G-50 microcolumns (ApBiotec, USA).

Filter arrays were prehybridized in a solution containing 50% formamide, 5 $\times$ SSC, 5 $\times$  Denhardt's solution, 50 mM sodium phosphate pH 6.8, 1% SDS, and 100  $\mu$ g/ml of denatured salmon sperm DNA, for 4 h at  $42^{\circ}\text{C}$ . Thereafter, the filters were hybridized with denatured purified cDNA probes in hybridization solution (50% formamide, 5 $\times$  SSC, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 1% SDS, 5% dextran) for 16 h at  $42^{\circ}\text{C}$ . The arrays were washed in 0.2 $\times$  SSC with 0.5% SDS for 20 min at room temperature, twice in 0.5 $\times$  SSC with 0.5% SDS for 20 min at  $65^{\circ}\text{C}$ , and 0.2 $\times$  SSC with 0.5% SDS for 20 min at  $65^{\circ}\text{C}$ . The filters were sealed with a 29  $\mu$ m thick plastic film, and then exposed to imaging plates for 96 h and scanned in a Phosphorimager. The signal intensities were quantified using Array Vision software (Imaging Research, Canada).

The local background was subtracted from each spot. The median of the background intensities of each membrane was calculated by measuring the intensity of 12 spots positioned on filter areas without cDNA spots. This value was used to normalize the signals from each gene (see text for details). Normalized signal intensities were log<sub>2</sub>-transformed, and for each gene a one-way analysis of variance (ANOVA) was applied to the transformed data with a Bonferroni adjusted *p*-value of 3.26E-05 (0.05/1536 = *P*/number of ESTs) to correct for multiple tests. The intensity of duplicate DNA spots was averaged and used to calculate the expression ratios between treatments. Selected ESTs were assembled using a hierarchical clusterization method [18] according to their expression profiles.

## 2.7. RNA blot

Ten micrograms of total RNA was incubated in denaturing RNA buffer [19] for 15 min at 56 °C, fractionated in 1% agarose gel containing formaldehyde, and blotted onto a Hybond-N+ filter (ApBiotech, USA). The blots were hybridized at 42 °C with the cDNA inserts labeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP [19]. The filters were washed under high stringency conditions and then exposed to imaging plates. Digitalized images of the RNA blot signals were quantified using Image Gauge software (Fujifilm, Japan).

## 2.8. DNA sequencing and sequence analysis

cDNA clones displaying differential expression were sequenced in an ABI Prism 3700 sequencer (Applied Biosystems, USA). Virtual translations of the cDNA clone sequences were analyzed by BLASTX [20] to identify similarities in the GenBank database. *E*-values higher than  $1.0E-5$  were not considered statistically significant (no significant match). For conserved domain analysis of virtual translations, the Pfam [21] and SMART [22] databases were used. The accession numbers of the coffee ESTs (Expressed Sequence Tags) cited in this manuscript are available in GenBank: (CK484622–CK484627; CV998038–CV998046; CV998048–CV99050; CX068758–CX068760). The array data described in this manuscript have been submitted to Gene Expression Omnibus (GEO), under the accession numbers GPL1730 (platform), GSM37179 and GSM37206 to GSM37210 (samples), and GSE2045 (series).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Evaluation of leaf miner resistant phenotypes

Four hundred plants from the fifth backcross generation of H14954-29 progeny were evaluated. One leaf from each plant was detached and incubated in a rearing cage containing leaf miner moths. Two weeks after egg hatching, four types of phenotypes were found (Fig. 2). In the first, leaves showed occasional dead eggs, with small lesions below them. In the second phenotype, the leaf miner had managed to eclose, but died within thin, irregular, filiform mines. Since these leaf miners had not completed their life cycle, we considered that these phenotypes were derived from highly resistant and moderately resistant plants, respectively. In the third phenotype, the leaves contained mines with large irregular shapes in which the caterpillar managed to pupate; such plants were considered as moderately susceptible. In the fourth phenotype, leaves with a very similar phenotype to that found in susceptible *C. arabica* control cultivars were considered as being derived from highly susceptible plants. A second infestation experiment produced the same pattern of plant phenotypes found in the first experiment.

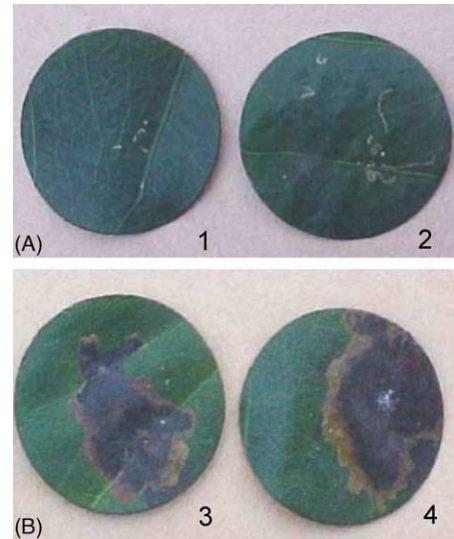


Fig. 2. Evaluation of the resistance of coffee leaves infested by *Leucoptera coffeella*; (A) infested leaves showing total (1) or moderate (2) resistance to coffee leaf miner; (B) infested leaves showing moderate (3) or total (4) susceptibility to coffee leaf miner.

### 3.2. *Leucoptera coffeella* infestation and construction of cDNA subtracted libraries

After assessing the resistance to leaf miners, highly resistant (R) and highly susceptible (S) coffee plants were chosen for further experiments. Based on stipulated treatments (see Section 2), leaf discs from the area surrounding the site of leaf miner oviposition or leaf damage were collected and frozen in liquid nitrogen. The RNAs were assembled into two pools to construct cDNA-subtracted libraries enriched in genes preferentially up-regulated in resistant plants following infestation by *L. coffeella*. Thus, the tester pool contained RNA from Ro and Re, and the driver pool contained RNA from Rc, So and Se (see Section 2).

### 3.3. Macroarray hybridization and selection of up-regulated genes

Two sets of high-density nylon filters were constructed, one with ESTs derived from the RDA library and one with ESTs from the SSH library. Each filter contained 768 ESTs that were spotted at two positions on the filters to verify spotting reproducibility. The high-density filters were hybridized with a [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP labeled probe corresponding to the plasmid vector. Replicate spots that varied in intensity by more than two-fold were discarded. A 0.9 correlation coefficient between the signals of replicate spots from different filters was obtained, indicating that most of the replicate spots had little variation in the amount of DNA of applied. In most studies, the median of the spot intensities is used as a factor for normalization. However, in subtracted cDNA libraries, some treatments will produce intensities

Table 1  
Sequence similarities and normalized intensities of coffee ESTs up-regulated during *L. coffeella* infestation

ESTs	Expression <sup>b</sup>						Best Blast hit <sup>c</sup>	E-value	Categorization
	Rc	Ro	Re	Sc	So	Se			
Group 1 <sup>a</sup>									
In Ro and So									
SSH101B04 (CK484622) <sup>d</sup>	12.20	44.44	8.53	8.51	18.60	3.40	Tumor-related protein Miraculin-like <i>Nicotiana tabacum</i> (T03803)	3.00E-11	Defense and stress
SSH104G04 (CK484625)	11.81	37.13	7.48	5.40	15.73	3.07	Putative potassium-dependent sodium calcium exchanger -like protein <i>Oryza sativa</i> (XP_470536)	2.00E-18	Membrane exchanger
SSH202A01 (CV998043)	14.64	36.49	7.88	4.52	17.63	3.43	Cytochrome b6 <i>Psilotum nudum</i> (NP_569658)	3.00E-25	Photosynthesis
SSH201D05 (CX068758)	40.65	84.42	25.42	5.72	72.32	20.44	No protein match	–	Unknown function
In Ro									
SSH101H05 (CX068759)	17.16	67.71	11.37	15.58	20.90	2.63	No protein match	–	Unknown function
SSH201D09 (CK484624)	34.82	125.33	17.15	26.60	41.11	4.03	Probable microsomal signal peptidase 25 kDa subunit <i>Arabidopsis thaliana</i> (P58684)	4.00E-13	Protein regulation
SSH202H06 (CK484626)	42.59	144.85	21.79	35.05	51.97	4.66	Photosystem I psaH precursor <i>Nicotiana glauca</i> (T16958)	1.00E-12	Photosynthesis
SSH203H02 (CV998044)	45.22	146.11	32.72	35.30	56.99	20.05	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase <i>Arabidopsis thaliana</i> (AAF61714)	8.00E-38	Secondary metabolism
In So									
DP201C11 (CX068760)	14.75	11.04	9.33	2.20	5.58	3.22	Putative glycine rich protein <i>Arabidopsis thaliana</i> (BAC42653)	1.00E-14	Defense and stress
DP201D12 (CV998046)	5.87	10.85	3.89	0.87	5.58	3.15	Acid phosphatase <i>Glycine Max</i> (CAA11075)	4.00E-06	Defense and stress
SSH202C10 (CK484627)	4.60	5.18	3.90	5.57	16.05	3.75	BEL1-related homeotic protein 29 <i>Solanum tuberosum</i> (AAN03626)	2.00E-74	Nuclear factor
SSH202G10 (CV998045)	1.82	1.70	1.96	1.08	5.02	1.09	Expressed protein <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_568392)	4.00E-29	Unknown function
SSH202G11 (CV998048)	8.70	11.71	11.83	3.20	16.63	3.81	RRS1 Ribosome biogenesis regulatory protein homolog <i>Arabidopsis thaliana</i> (AAD32772)	5.00E-47	Protein regulation
Group 2									
In Se and So									
DP103H03 (CV998049)	2.70	3.06	1.79	0.35	2.94	3.28	Putative nodule membrane protein <i>Medicago sativa</i> (AAL57201)	4.00E-31	Unknown function
DP104C02 (CV998041)	9.97	13.21	9.45	2.05	8.86	25.03	Lipoxygenase LOX-3 <i>Solanum tuberosum</i> (T07775)	4.00E-43	Defense and stress
DP301B04 (CV998038)	4.37	5.99	3.68	0.90	3.60	11.14	Lea1P <i>Daucus carota</i> (AAG24641)	2.00E-21	Defense and stress
DP302A12 (CV998050)	1.70	2.57	1.33	0.22	3.10	3.37	Lipid transfer/trypsin inhibitor/seed storage protein <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_190966)	6.00E-18	Defense and stress
In Se									
SSH101G06 (CV998039)	16.94	28.65	20.32	10.34	13.84	61.18	Phospholipase D <i>Lycopersicon esculentum</i> (AAG48162)	2.00E-54	Defense and stress
SSH201B02 (CV998040)	15.44	22.37	13.44	7.27	13.84	46.96	Putative transcriptional regulator FACT-like <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_192809)	7.00E-29	Nuclear factor
In Se, Ro and So									
DP302B11 (CK484623)	4.92	19.08	7.02	1.58	5.52	23.01	Class III chitinase <i>Lupinus albus</i> (CAA76203)	1.00E-30	Defense and stress

<sup>a</sup> ESTs groups refer to hierarchical clustering of ESTs according to their induction ratio. group 1: (Ro, So) > (Rc, Re, Se); group 2: (Se) > (Rc, Ro, Re, So).

<sup>b</sup> Expression is the ratio between the average of the intensity of replica spots and the median of the membrane background. ESTs were considered up-regulated when the ratio between the expression values in the treatments and control in resistant or susceptible plants (Ro/Rc, Re/Rc, So/Sc, Se/Sc) was >2.0 in at least one treatment.

<sup>c</sup> Indicates the best BLAST hit of each EST sequence obtained using the BLASTX algorithm.

<sup>d</sup> Refers to accession numbers in Genbank.

much higher than the others because the genes were not randomly selected. Therefore, the median of the background intensities of each membrane was used to normalize the spot intensities [23].

In selecting of differentially expressed genes, we used  $\log_2$  transformed normalized signal intensities assessed by ANOVA. Using this approach, 157 ESTs (around 10% of the subtracted libraries ESTs; 12.3% of RDA ESTs and 7.5% of SSH ESTs) were assumed to be differentially expressed in at least one treatment. Additionally, we selected ESTs for which the ratio between the average of the normalized intensity of these genes in each treatment and the respective intensities in the resistant control (Ro or Re/Rc) or susceptible control (So or Se/Sc) was  $>2.0$ . These ESTs were assembled by hierarchical clustering, according to their expression profiles (data not shown). Two groups contained ESTs that had interesting patterns of expression: group 1 contained ESTs up-regulated in Ro and So, whereas group 2 contained ESTs preferentially induced in Se. Finally, these ESTs were sequenced and analyzed by BLASTX. As a result, 13 ESTs from group 1 and 8 ESTs from group 2 were selected as differentially expressed, with 2 of them (EST SSH201D05 and EST SSH101H05) having no matches in GenBank (Table 1).

Surprisingly, many ESTs were induced in the susceptible genotype, which could indicate that our subtraction was not accurate. However, our results may reflect the ineffectiveness of RDA and SSH in profiling subtle differences in gene expression [16,24]. Other reports that have used the strategy of complex tester/driver subtraction have also documented this inefficacy [23,25].

### 3.4. Genes modulated by coffee leaf miner infestation

Based on BLASTX and protein domain analyses, the selected ESTs were divided into eight functional categories: defense and stress, membrane exchanger, protein regulation, nuclear factors, photosynthesis, secondary metabolism and unknown function. To validate the macroarray data, selected ESTs were used as probes in RNA blot analysis, with RNA from an independent replicate experiment (Fig. 3). One EST was similar to a gene previously described as defense-stress up-regulated (Class III chitinase), and four ESTs were similar to genes not previously described to be stress-induced (*CAX9*, *SPC25*, *BEL*, and *psaH*). Comparison of the expression patterns obtained using macroarrays and RNA blot analysis yielded a good correlation (Fig. 3), which confirmed the efficiency of macroarray analysis in identifying differentially expressed genes. We also assessed the expression pattern of these genes induced during coffee leaf miner infestation in different organs of plants from *C. arabica* cultivar Mundo Novo (Fig. 4), which is used as a parental genotype in the selection of many Brazilian cultivars; including Catuaí, the cultivar that originated the plants of the progeny analyzed in this work [4]. Since the genetic variability of *C. arabica* plants is extremely reduced

[26], we believe that the information obtained with the RNA from Mundo Novo plants can be informative on the gene expression pattern in *Coffea* plants.

EST DP302B11 encoded a polypeptide similar to PR-8 proteins, which are class III chitinases. Other reports have shown the up-regulation of PR-8 proteins by fungi [27,28], and SA and wounding [28]. Fig. 3 shows the up-regulation of EST DP302B11 in Ro and Se. This gene was most expressed in leaves, green and white flower buds, and only slightly in roots (Fig. 4A). Additionally, it was constitutively expressed throughout fruit development (Fig. 4B). As well as being important proteins in plant defense, chitinases are also involved in embryonic development [29].

A protein similar to *Arabidopsis* 25 kDa subunit of a probable microsomal signal peptidase complex SPC25 was encoded by EST SSH201D09. This protein complex cleaves the signal peptides of secretory proteins within the co-translational translocation pathway [30]. Coffee SPC25 was up-regulated in Ro and almost maintained a steady-state level in So (Fig. 3). Curiously, polypeptides derived from defense genes up-regulated in Ro, EST DP302B11 and EST SSH101B04 (PR-8 and miraculin), contain signal peptides [28,31]. In addition, SPC25 was expressed in young organs like green flower buds and green fruits (Fig. 4A and B).

EST SSH202H06 was up-regulated after oviposition in resistant plants (Fig. 3) and was similar to the *psaH* gene, whose product stabilizes the photosystem I (PSI) complex during electron transport [32]. *psaH* was expressed in leaves, green and white flower buds, and in early green fruits (Fig. 4A and B). The presence of a transcript in white flower buds may be related with the presence of photosystem proteins in mature flower buds [33]. EST SSH202H06 transcripts were detected only in early green fruits, which agrees with the restricted expression of photosynthetic genes in immature tomato fruits [34].

EST SSH104G04 EST was similar to a rice putative  $K^+$ -dependent  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger-like gene and to *A. thaliana* putative cation exchanger *CAX9* gene. The four *Arabidopsis* CAX proteins characterized so far (CAX 1–4) drive the efflux of  $Ca^{2+}$  from the cytoplasm [35,36]. On the other hand, *CAX 7–11* genes are more similar to animal and fungal  $Na^2+/Ca^{2+}$  exchangers, which can drive  $Ca^{2+}$  into cells [37]. In fact,  $Ca^{2+}$  acts as a secondary messenger in plant signal transduction responses to biotic stress [38]. *CAX9* EST was predominantly expressed in leaves and slightly expressed in early green fruits (Fig. 4A and B).

We also identified EST SSH202C10, that was similar to the potato homeotic nuclear factor *BEL1*, which is an important component in determining the fate of leaf cells [39]. This EST was induced in the So treatment (Fig. 3). EST SSH202C10 was expressed with higher levels in white flower buds (Fig. 4A) and in early green, yellow-red and red fruits (Fig. 4B). This result agrees with the role of *BEL* genes during flower [40] and fruit development [41,42].

Apart from EST DP302B11, which encoded a class III chitinase, five other ESTs identified by DNA array analysis

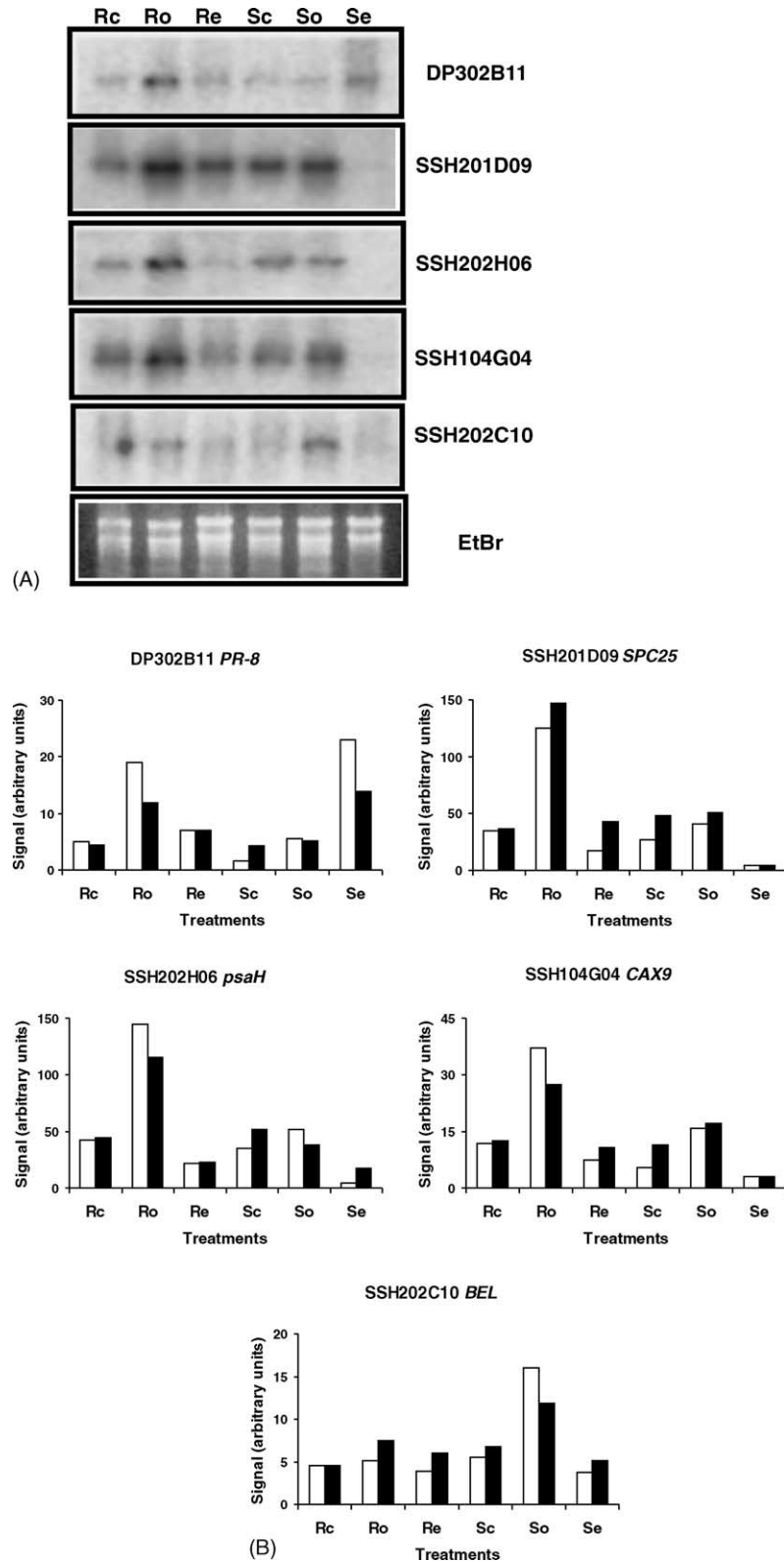


Fig. 3. Expression profiles of genes induced by leaf miner infestation; (A) RNA blot analysis of selected genes containing RNAs from the second *L. coffeella* infestation experiment; The membrane was hybridized with the probes indicated at the right of the panel. Ethidium bromide-stained rRNA (EtBr) was visualized as a control for RNA loading; (B) comparison of the expression patterns between DNA arrays (white columns) and RNA blots from the second infestation experiment (black columns). The bars represent signals detected (arbitrary units) in the hybridizations. Rc, resistant plants not infested; Ro, resistant plants after oviposition; Re, resistant plants after larval eclosion; Sc, susceptible plants not infested; So, susceptible plants after oviposition; Se, susceptible plants after larval eclosion.

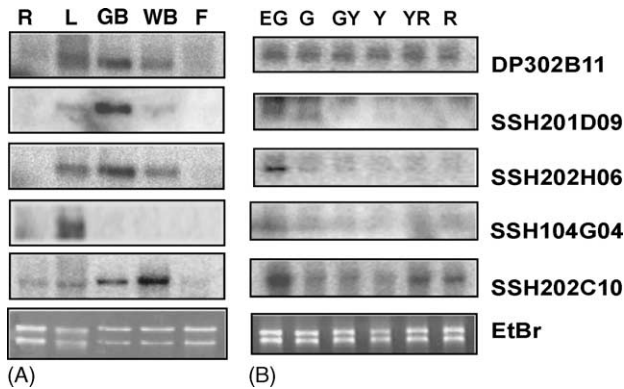


Fig. 4. Expression profiles of genes induced by leaf miner infestation in different organs of *Coffea arabica*; (A) RNA blot analysis of selected genes containing RNAs from roots (R), leaves (L), green flower buds (GB), white flower buds (WB) and open flowers (F); (B) RNA blot analysis of selected genes containing RNAs from different stages of coffee fruit development: early green (EG), green (G), green-yellow (GY), yellow (Y), yellow-red (YR) and red (R). Ethidium bromide-stained rRNA (EtBr) was visualized as a control for RNA loading.

as up-regulated during *L. coffeella* infestation, have previously been related to plant defense and biotic stress: EST SSH101G06 (similar to phospholipase D) [43], EST DP104C02 (similar to lipoxygenase LOX3) [44], EST DP301B04 (similar to LEA1) [45,46], EST DP201D12 (similar to acid phosphatase VSP) [47,48], EST DP302A12 (similar to proteins containing lipid transfer protein/trypsin inhibitor/seed storage domain) [49], EST SSH101B04 (similar to putative serine protease inhibitor miraculin) [50], and EST DP201C11 (similar to a putative GRP) [51,52].

The regulation of protein synthesis and degradation is crucial during plant stress. In addition to EST SSH201D09 (similar to signal peptidase subunit SPC25), we identified two other ESTs related to protein turnover: EST DP104G07, which was similar to tobacco  $\alpha 6$  20S proteasome subunit gene  $\alpha$ -din6 [53] and EST SSH202G11 that was similar to the *Arabidopsis* ribosome regulator synthesis gene *RRS1* [54].

Besides isolating EST SSH202C10 (*BEL1*), we identified another nuclear factor not previously associated with biotic stress. ESTs SSH201B02 was similar to *Arabidopsis* nuclear factor FACT, involved in chromatin rearrangement [55].

Apart from *psaH* (EST SSH202H06), another photosynthetic gene was up-regulated after *L. coffeella* oviposition in resistant and susceptible plants and down-regulated during leaf miner herbivory (Re and Se) (Table 1). EST SSH202A01 product was similar to cytochrome b6-f [56]. Interestingly, photosynthetic genes are down-regulated by JA/herbivory and up-regulated by SA [57,58].

Additionally, we isolated EST SSH203H02 that is similar to 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase (plant ispD), an enzyme of the deoxyxylulose phosphate pathway that produces terpenoids, which are secondary metabolites used in defense [59]. Finally, we identified two ESTs whose products were similar to proteins of unknown function: EST SSH202G10 that is similar to an *Arabidopsis*

protein that has no domain listed in the PFAM or SMART databanks, and EST DP103H03 that is similar to a *Medicago sativa* protein that contains a START-domain, which allows proteins to attach to lipids [60].

### 3.5. A hypothesis to coffee leaf miner resistance

The expression profiles of the genes included in the groups chosen suggest a possible defense mechanism triggered by the *L. coffeella* attack in coffee plants. Group 1 contained ESTs up-regulated by oviposition treatments. Some of these ESTs (*psaH* and *SPC25*, for example) were only up-regulated in resistant plants after oviposition (Ro) and may provide a genotype-specific resistance after oviposition by *L. coffeella*. Curiously, no ESTs were induced in resistant plants after eclosion (Re), which reinforces the possible importance of genes induced during oviposition in arresting the development of *L. coffeella* larvae in resistant plants. On the other hand, some ESTs from group 1 (*BEL* i.e.) were up-regulated in susceptible plants after oviposition (So) (Table 1). This intriguing expression profile suggests that susceptible plants may activate a hypothetical “lack of resistance” signal after moth oviposition. Group 2 contained ESTs that were more induced in susceptible plants after larval eclosion and leaf miner herbivory (Se) (*PR-8* i.e.). Most of group 2 ESTs were also up-regulated in susceptible plants after oviposition (So) (Table 1). These results suggest that although susceptible plants activate defense genes after oviposition, this signaling is insufficient to arrest larval development.

The majority of ESTs selected had a higher steady-state level in non-infested resistant plants (Rc) than in non-infested susceptible plants (Sc) (Table 1). These ESTs were more expressed in resistant plants after oviposition (Ro) than in susceptible plants after oviposition (So) (Table 1). The higher rate of *L. coffeella* egg antibiosis seen in resistant plants may be resulted from the up-regulation of defense genes (*PR-8* i.e.) after oviposition, combined with a higher basal expression of stress-related genes in this genotype.

In conclusion, using a combination of subtracted cDNA libraries and DNA arrays we have identified 21 ESTs that are differentially expressed during the infestation of coffee plants by coffee leaf miners. Our results provide a starting point in the research of molecular mechanisms of *Coffea* resistance against the coffee leaf miner. Further studies are needed to unravel the signaling pathways involved in the resistance of coffee plants to *L. coffeella* oviposition.

### Acknowledgements

We thank Edna Santos, the Plant Genomics Laboratory staff and Christian Colin for excellent technical assistance. J.M.C.M., M.H.B., J.M.F. and M.P.D. were recipients of fellowships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). R.D.D. and D.R. were recipients of

fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Consórcio Nacional do Café (CNC), respectively. This work was supported by Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP): project no. 040504, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Pró Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo (PRP-USP).

## References

- [1] A.E. Paulini, P.R. Andrade, J.B. Matiello, Z. Mansk, A.J. Paulino, Eficiência do controle do bicho mineiro do café (*Perileucoptera coffeella*, Guer-Men, 1842) e sua relação com a produtividade. In: Resumos do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 3 Curitiba, IBC/GERCA, Rio de Janeiro (1975) p. 1.
- [2] A. Carvalho, L.C. Mônico, Relaciones genéticas de espécies selecionadas de *Coffea*, *Café* 9 (1968) 1–19.
- [3] H.P. Medina Filho, A.P. Carvalho, L.C. Mônico, Melhoramento do cafeeiro. XXXVII. Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro, *Bragantia* 36 (1977) 131–137.
- [4] O. Guerreiro, M.B. Silvarolla, A.B. Eskes, Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*, *Euphytica* 105 (1999) 7–15.
- [5] B.J. Feys, J.E. Parker, Interplay of signaling pathways in plant disease resistance, *Trends Genet.* 16 (2000) 449–455.
- [6] K. Maleck, R.A. Dietrich, Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4 (1999) 215–219.
- [7] L.L. Walling, The myriad plant responses to herbivores, *J. Plant Growth Regul.* 19 (2000) 195–216.
- [8] T. Desprez, J. Amselem, M. Caboche, H. Hofte, Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays, *Plant J.* 14 (1998) 643–652.
- [9] M. Tamaoki, N. Nakajima, A. Kubo, M. Aono, T. Matsuyama, H. Saji, Transcriptome analysis of O<sub>3</sub>-exposed *Arabidopsis* reveals that multiple signal pathways act mutually antagonistically to induce gene expression, *Plant Mol. Biol.* 53 (2003) 443–456.
- [10] L. Diatchenko, Y.F.C. Lau, A.P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E.D. Sverdlov, P.D. Siebert, Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 6025–6030.
- [11] M. Hubank, D.G. Schatz, Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 5640–5648.
- [12] M. Matvienko, M.J. Torres, J.I. Yoder, Transcriptional responses in the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor* to host plant signals, *Plant Physiol.* 127 (2001) 272–282.
- [13] L. Xiong, M.W. Lee, M. Qi, Y. Yang, Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening, *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 (2001) 685–692.
- [14] J. Zheng, J. Zhao, Y. Tao, J. Wang, Y. Liu, J. Fu, Y. Jin, P. Gao, J. Zhang, Y. Bai, G. Wang, Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray, *Plant Mol. Biol.* 55 (2004) 807–823.
- [15] J. Logemann, J. Schell, L. Willmitzer, Improved method for the isolation of RNA from plant tissues, *Anal. Biochem.* 163 (1987) 16–20.
- [16] M. Hubank, D.G. Schatz, Representational difference analysis of cDNA, in: S.P. Hunt, R. Levesey (Eds.), *Functional Genomics: A Practical Approach*, Oxford University Press, 2000, pp. 46–80.
- [17] M. Schummer, V.L.V. Ng, R.E. Baumgarner, P.S. Nelson, B. Schummer, D.W. Bednarski, L. Hassell, R.L. Baldwin, B.Y. Karlan, L. Hood, Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas, *Gene* 238 (1999) 375–385.
- [18] M.B. Eisen, P.T. Spellman, P.O. Brown, D. Botstein, Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 14863–14868.
- [19] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [20] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [21] A. Bateman, E. Birney, R. Durbin, S.R. Eddy, K.L. Howe, E.L. Sonnhammer, The Pfam protein families database, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 263–266.
- [22] J. Schultz, R.R. Copley, T. Doerks, C.P. Ponting, P. Bork, SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 231–234.
- [23] M. Frohme, B. Scharm, H. Delius, R. Knecht, J.D. Hoheisel, Use of representational difference analysis and cDNA arrays for transcriptional profiling of tumor tissue, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 910 (2000) 85–104.
- [24] W. Ji, M.B. Wright, L. Cai, A. Flament, K. Lindpaintner, Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes, *BMC Genomics* 3 (2002) 12.
- [25] K. Schroeyers, C. Chaparro, S. Goormachtig, M. Holsters, Nodulation-enhanced sequences from the water stress-tolerant tropical legume *Sesbania rostrata*, *Plant Sci.* 167 (2004) 207–216.
- [26] P. Lashermes, M.C. Combes, J. Robert, P. Trouslot, A. D'Hont, F. Anthony, A. Charrier, Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome, *Mol. Gen. Genet.* 261 (1999) 259–266.
- [27] K.K. Nielsen, J.D. Mikkelsen, K.M. Kragh, K. Bojsen, An acidic class III chitinase in sugar beet: induction by *Cercospora beticola*, characterization, and expression in transgenic tobacco plants, *Mol. Plant Microbe Interact.* 6 (1993) 495–506.
- [28] A.P. Regalado, C. Pinheiro, S. Vidal, I. Chaves, C.P. Ricardo, C. Rodrigues-Pousada, The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds, *Planta* 210 (2000) 543–550.
- [29] A.J. van Hengel, F. Guzzo, A. van Kammen, S.C. de Vries, Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds, *Plant Physiol.* 117 (1998) 43–53.
- [30] M. Paetzl, A. Karla, N.C. Strynadka, R.E. Dalbey, Signal peptidases, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4549–4580.
- [31] E.D. Brenner, K.N. Lambert, I. Kaloshian, V.M. Williamson, Characterization of *LeMir*, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root, *Plant Physiol.* 118 (1998) 237–247.
- [32] H.V. Scheller, P.E. Jensen, A. Haldrup, C. Lunde, J. Knoetzel, Role of subunits in eukaryotic photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta* 1507 (2001) 41–60.
- [33] Y. Yamamoto, H. Tsuji, J. Obokata, Structure and expression of a nuclear gene for the PSI-D subunit of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*, *Plant Mol. Biol.* 22 (1993) 985–994.
- [34] M. Sugita, W. Gruissem, Developmental, organ-specific, and light-dependent expression of the tomato ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 7104–7108.
- [35] T. Shigaki, K. Hirschi, Characterization of CAX-like genes in plants: implications for functional diversity, *Gene* 257 (2000) 291–298.
- [36] N.H. Cheng, J.K. Pittman, T. Shigaki, K.D. Hirschi, Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H(+)/cation antiporter, *Plant Physiol.* 128 (2002) 1245–1254.
- [37] K.D. Philipson, D.A. Nicoll, Sodium-calcium exchange: a molecular perspective, *Ann. Rev. Physiol.* 62 (2000) 111–133.
- [38] D. Sanders, J. Pelloux, C. Brownlee, J.F. Harper, Calcium at the crossroads of signaling, *Plant Cell* 14 (2002) 401–417.

- [39] H. Chen, F.M. Rosin, S. Prat, D.J. Hannapel, Interacting transcription factors from the three-amino acid loop extension superclass regulate tuber formation, *Plant Physiol.* 132 (2003) 1391–1404.
- [40] L. Reiser, Z. Modrusan, L. Margossian, A. Samach, N. Ohad, G.W. Haughn, R.L. Fischer, The *BELL1* gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the *Arabidopsis* ovule primordium, *Cell* 83 (1995) 735–742.
- [41] Y.H. Dong, J.L. Yao, R.G. Atkinson, J.J. Putterill, B.A. Morris, R.C. Gardner, *MDH1*: an apple homeobox gene belonging to the BEL1 family, *Plant Mol. Biol.* 42 (2000) 623–633.
- [42] A.H. Roeder, C. Ferrandiz, M.F. Yanofsky, The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit, *Curr. Biol.* 13 (2003) 1630–1635.
- [43] X. Wang, Phospholipase D in hormonal and stress signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 (2002) 408–414.
- [44] G.A. Howe, A.L. Schillmiller, Oxylinipin metabolism in response to stress, *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 (2002) 230–236.
- [45] L.M. Weaver, S. Gan, B. Quirino, R.M. Amasino, A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment, *Plant Mol. Biol.* 37 (1998) 455–469.
- [46] S.E. Keates, T.A. Kostman, J.D. Anderson, B.A. Bailey, Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis, *Plant Physiol.* 132 (2003) 1610–1622.
- [47] S. Berger, T. Mitchell-Olds, H.U. Stotz, Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*, *Physiol. Plant.* 114 (2002) 85–91.
- [48] H.S. Mason, D.B. DeWald, R.A. Creelman, J.E. Mullet, Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars, *Plant Physiol.* 98 (1992) 859–867.
- [49] J.P. Blein, P. Coutos-Thevenot, D. Marion, M. Ponchet, From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms, *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 293–296.
- [50] S. Theerasilp, Y. Kurihara, Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 11536–11539.
- [51] A. Molina, M. Mena, P. Carbonero, F. Garcia-Olmedo, Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley, *Plant Mol. Biol.* 33 (1997) 803–810.
- [52] E. Yasuda, H. Ebinuma, H. Wabiko, A novel glycine-rich/hydrophobic 16 kDa polypeptide gene from tobacco: similarity to proline-rich protein genes and its wound-inducible and developmentally regulated expression, *Plant Mol. Biol.* 33 (1997) 667–678.
- [53] J. Dahan, P. Etienne, A.S. Petitot, V. Houot, J.P. Blein, L. Suty, Cryptogein affects expression of alpha3, alpha6 and beta1 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco, *J. Exp. Bot.* 52 (2001) 1947–1948.
- [54] A. Tsuno, K. Miyoshi, R. Tsujii, T. Miyakawa, K. Mizuta, *RRS1*, a conserved essential gene, encodes a novel regulatory protein required for ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 2066–2074.
- [55] R. Belotserkovskaya, D. Reinberg, Facts about FACT and transcript elongation through chromatin, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14 (2004) 139–146.
- [56] M. Hervas, J.A. Navarro, M.A. De La Rosa, Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis, *Acc. Chem. Res.* 36 (2003) 798–805.
- [57] P.M. Schenk, K. Kazan, I. Wilson, J.P. Anderson, T. Richmond, S.C. Somerville, J.M. Manners, Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 11655–11660.
- [58] D. Hermsmeier, U. Schittko, I.T. Baldwin, Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs, *Plant Physiol.* 125 (2001) 683–700.
- [59] W. Eisenreich, F. Rohdich, A. Bacher, Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids, *Trends Plant Sci.* 6 (2001) 78–84.
- [60] K. Schrick, D. Nguyen, W.M. Karlowski, K.F. Mayer, START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors, *Genome Biol.* 5 (2004) R41.



## Capítulo II

***CoMir*, a coffee Kunitz STI protease inhibitor gene, is induced by coffee leaf miner oviposition and is regulated during coffee development**

**Jorge Maurício Costa Mondego, Melina Pasini Duarte,  
Sandra Maria Carmello Guerreiro, Oliveiro Guerreiro-Filho e Marcelo Menossi**

**CoMir, a coffee Kunitz STI protease inhibitor gene, is induced by coffee leaf miner oviposition and is regulated during coffee development**

Jorge Maurício Costa Mondego<sup>1,2</sup>, Melina Pasini Duarte<sup>1,2</sup>, Sandra Maria Carmello Guerreiro<sup>3</sup>, Oliveira Guerreiro-Filho<sup>4</sup> and Marcelo Menossi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – Laboratório de Genoma Funcional – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010, 13083-875, Campinas, SP, [Brazil](#)

<sup>2</sup> Departamento de Genética e Evolução – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – CP 6109, 13084-971, Campinas, SP, [Brazil](#),

<sup>3</sup> Departamento de Botânica – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – CP 6109, 13084-971, Campinas, SP, [Brazil](#),

<sup>4</sup> Centro de Café Alcides Carvalho – Instituto Agrônomo de Campinas - 13020-902, Campinas, SP, [Brazil](#)

\* Author for correspondence: [menossi@unicamp.br](mailto:menossi@unicamp.br)

Address for correspondence: Laboratório de Genoma Funcional, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – CP 6010, 13083-875, Campinas, SP, [Brazil](#)

Key words: Coffee, Kunitz STI, Miraculin, Protease inhibitor, Xylem, Insect oviposition, Biotic stress, Plant-insect interactions

## Abstract

A gene similar to Kunitz STI protease inhibitors was isolated from subtracted cDNA libraries of *Coffea sp.* plants infested with coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*). This gene has high identity with *Richadella dulcifica* taste-modifying protein miraculin and with tomato protein *LeMir*, being named as *CoMir* (Coffea Miraculin). *CoMir* was up-regulated after *L. coffeella* oviposition in resistant plants of a progeny derived from crosses between *C. racemosa* (resistant) and *C. arabica* (susceptible). Gene expression was also observed in leaves, flower buds and early green fruits. *In situ* hybridization revealed that *CoMir* transcripts accumulate in anther tapetum, endothecium and stomium, and in metaxylem vessels of petals, stigma and leaves. According to our results *CoMir* may act in proteolytic regulation during coffee development and in the defense against *L. coffeella*. The similarity of *CoMir* with other Kunitz STI proteins and the role of this gene in plant development and plant stress are discussed.

## Introduction

Plants have developed defense mechanisms against diverse organisms that impair plant growth and development. One of these mechanisms is the induced defense, which consists in the activation of gene transcription after the onset of biotic stress (Walling, 2000). Proteins involved in defense response may act in the transduction of defense signals, reinforcement of plant cell wall, metabolism adjustment during stress and in the inhibition predation and colonization effected by the aggressor organism.

Herbivorous arthropods, like free-living caterpillars, are animals that chew great portions of leaves causing extensive damages to plants. Many studies concerning with the defense molecular mechanisms between plants and free-living caterpillars have been reported (Hermsmeier *et al.*, 2001; Reymond *et al.*, 2000). On the other hand, data on plant response to the colonization of sedentary herbivores, like galling insects, mites and leaf miners, are much more scarce.

The lepidoteran insect *Leucoptera coffeella* (Guérin Meneville) is the most important pest in Brazilian coffee plantations (Paulini *et al.*, 1975). *L. coffeella* moth deposits its eggs on the adaxial leaf surface, and then larvae eclodes towards mesophyl, feeding on palisade parenchyma during approximately 10 days. Thereafter, larvae leave the mines and empupe on the abaxial leaf surface. In resistant coffee plants, like *C. racemosa*, larvae dies inside the mines or do not manage to penetrate into parenchyma (Medina-Filho *et al.*, 1977; Guerreiro-Filho *et al.*, 1991). To understand the mechanisms of resistance against *L. coffeella*, plants of a hybrid progeny derived from crosses between *C. arabica* and *C. racemosa* were infested, and RNA from different treatments were used to construct a subtracted cDNA library enriched in genes induced during leaf miner attack (Mondego *et al.*, 2005). Twenty-

one cDNA clones were differentially expressed during infestation. One of them, SSH101B04, was similar to a gene encoding miraculin, a protein derived from an African native shrub, *Richadella dulcifica*. This protein is member of the Kunitz STI family of protease inhibitors (MEROPS proteinase inhibitor family I3), which contain a conserved signature in N-terminal region [(L/I/V/M)-x-D-x-(E/D/N/T/Y)-(D/G)-(R/K/H/D/E/N/Q)-x-(L/I/V/M)-x-(5)-Y-(L/I/V/M)], four conserved cysteine residues (cys) and a reactive site between the first two cys. Kunitz STI proteins were classified as serine protease inhibitors (Laskowski and Kato, 1980). However, members of this family inhibit cysteine and aspartic proteases, which can be due to the low conservation of reactive sites (Rawlings *et al.*, 2004a).

Protease inhibitors (PIs) are ubiquitous proteins that bind to proteases, blocking proteolysis of a target substrate (Laskowski and Kato, 1980). Plants produce these proteins in response to insect feeding (Haruta *et al.*, 2001). In fact, protease inhibitors have shown to arrest the development of herbivorous insects by inhibiting digestive proteases (Johnson *et al.*, 1989, Rodrigues-Macedo *et al.*, 2003), key proteins for growth and reproductive success of arthropods (Murdock and Shade, 2002). PIs are also up-regulated during fungi infection and symbiotic interactions (Cordero *et al.*, 1994; Grunwald *et al.*, 2004) and are also considered seed storage proteins (Spencer and Hodge, 1991).

On the other hand, proteases are implicated in many plant developmental mechanisms, such as programmed cell death (PCD) during xylogenesis (Groover and Jones, 1999), proteolysis of storage proteins during seed germination (Liu *et al.*, 2001) and flower and leaf senescence (Bhalerao *et al.*, 2003; Wagstaff *et al.*, 2002). Thus, besides acting in plant defense, PIs seem to be involved in plant homeostasis by regulating protease activity.

In the present report, we describe the cloning of the full-length cDNA containing the SSH101B04 clone. This gene was named *CoMir* and we have characterized its expression during coffee leaf miner infestation and coffee development, and also the subcellular localization of *CoMir* protein. Possible functions of *CoMir* in plant development and plant stress response are discussed.

## **Material and Methods**

### ***Insect rearing, plant material and coffee leaf miner infestation***

*Leucoptera coffeella* moths were reared according to Guerreiro *et al.*, (1991). Coffee plants were obtained from the Agronomic Institute of Campinas (IAC). Plants from progeny H14954-29 from the fifth backcross generation of the (*C. racemosa* x *C. arabica*) X *C. arabica* breeding program were used in leaf miner infestation (Mondego *et al.*, 2005) and in Southern blot experiments. Ten year-old *C. arabica* cultivar Mundo Novo plants were used to assess organ-specific expression of *CoMir*. First pair of leaves, roots, different phases of flower development (green flower bud, white flower bud and open flower) and coffee fruits in different stages of development (early green, green, green-yellow, yellow, yellow-red and red) were collected and frozen in liquid nitrogen for RNA blot analysis (see below). Leaf discs from infested and non-infested leaves, green flower buds and white flower buds were collected and incubated in tissue fixative solution for *in situ* hybridization (see below).

### ***RACE-PCR and cloning of CoMir***

The DNA sequences of clones SSH101B04 (Mondego *et al.*, 2005) and SSH104C02 (which overlaps with SSH101B04) were used to design primers. 5' RACE

amplifications were performed with 5' RACE System Version 2.0 (Invitrogen, USA) using *CoMir* 3'NTR as gene-specific primer: 5' CTCCTTATTGTGCTTGCTTAA 3'. cDNA was synthesized with RNA extracted from resistant plants after coffee leaf miner oviposition (Mondego *et al.*, 2005). Platinum HiFi *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, EUA) was used according to manufacturer's instructions. The single RACE product was isolated from agarose gel using GFX purification kit (APbiotech, USA) and cloned into the plasmid pGEM T-Easy (Promega, USA), which was sequenced to verify the existence of an open reading frame. For further cloning events, this construction was used as template in PCR using the following primers: 5' CCATGGCAATGAAGAAATTACTTCTCTTCCTTT3' and 5' GGATCCCAAAGTAGAGGTAACGGACTTGAGAA 3'. (Underlined sequences correspond to *Nco*I and *Bam*HI sites, respectively). The single PCR band was cloned in pGEM T-easy, originating the pGEMCoMir construct.

### ***RNA extraction and RNA Blot***

RNA extraction was performed as described elsewhere (Mondego *et al.*, 2005). Ten micrograms of total RNA was incubated in denaturing RNA buffer for 15 min at 56°C, and were electrophoresed in a 1% (w/v) agarose gel containing formaldehyde. Subsequently, the gel was blotted onto a Hybond-N+ filter (ApBiotech, USA). Filters were hybridized at 42°C with *CoMir* insert labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Sambrook *et al.*, 1989) and washed in a solution containing 0.2X SSC and 0.1% SDS at room temperature for 20 min, and in 0.2 X SSC and 0.1% SDS at 42°C for 20 min.

### **DNA extraction**

Leaves were ground in liquid nitrogen and 0.2 g of tissue were resuspended in 1.5 mL of lysis buffer (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0; 50 mM EDTA pH 8.0; 1,5%  $\beta$ -Mercaptoetanol v/v). The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 370  $\mu$ l of lysis buffer, 520  $\mu$ l of extraction buffer (0.2 M de Tris-HCl pH 8.0; 50 mM EDTA pH 8.0; 2 M NaCl; 2% CTAB w/v) and 110  $\mu$ l of 10% SDS. The tubes were incubated for 40 min at 65°C in a water bath, mixing each 10 min. After 10 min at room temperature, chloroform/isoamyl-alcohol (24:1) was added and the sample was centrifuged. The aqueous phase was recovered and DNA was precipitated with 3 M sodium acetate pH 5.2 (0.1 v) and cooled isopropanol (1 v) at –20 °C for 2 h. After centrifugation, pellet was resuspended in 200  $\mu$ l of water and treated with 200  $\mu$ g/ml of RNase A (Calbiochem, USA) for 30 min at 37 °C. Afterwards, 800  $\mu$ l of water and 1 ml of phenol:chloroform:isoamyl-alcohol (25:24:1) were added to the sample. Tubes were centrifuged, the aqueous phase was recovered, and DNA was precipitated with 3M sodium acetate pH 5.2 (0.15 v) and cooled isopropanol (0.8 v) at –20 °C for 16 h. After centrifugation, the supernatant was discarded. Pellets were then washed in 70% ethanol and resuspended in water.

### **Southern Blot**

Ten micrograms of DNA were digested with 50 units of different restriction enzymes at 37°C for 16 h. Digested DNA was loaded in 1.2 % (w/v) agarose gel. Subsequently, the gel was treated with 0.25 M HCl for 10 min, NaOH 0.4 M and NaCl 0.6 M for 1 h, and NaCl 1.5 M and Tris-HCl 1 M pH 7.5 for 1 h. After being rinsed in water, the gel was transferred to a Hybond-N+ filter (ApBiotec, USA). Membrane was hybridized at 42°C with *CoMir* insert labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Sambrook *et al.*, 1989)



and washed two times for 10 min in a solution containing 1X SSC and 0.1% SDS at 42 °C, and subsequently washed two times for 10 min in 0.1 X SSC and 0.1% SDS at 42 °C.

### ***Radioactive signal detection***

Membranes from Southern blot and RNA blot were sealed in plastic and exposed to imaging plates (Fujifilm, Japan). Digitalized images were quantified using Image Gauge Software (Fujifilm, Japan).

### ***Subcellular localization of CoMir***

pGEMCoMir was digested with *NcoI* and *SpeI* (Invitrogen, USA) and the insert was ligated into pCAMBIA 1302 (Cambia, Australia) downstream of the CaMV 35S promoter and fused in frame upstream of the green fluorescent protein (mGFP5) reporter gene (Haseloff, 1999). Onion (*Allium cepa*) epidermal cells were transiently transformed with *CoMir::mGFP5* construct, using a helium biolistic gene transformation system (Bio-Rad, USA). Five micrograms of plasmid DNA dialyzed against water was precipitated using 1.6 mm gold particles (Bio-Rad, USA), 2.5 M CaCl<sub>2</sub> and 0.1 M spermidine. Inner epidermal cells layers were peeled from onion, placed on MS solid medium (Murashige and Skoog, 1962), and bombarded with ethanol resuspended DNA-coated particles at 1300 psi. Subsequently, the tissues were incubated for 24 h in the dark at 22°C. The fusion construct was detected by GFP fluorescence at 508 nm using a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon, Japan). Bright field and fluorescence images were photographed and digitalized using Image Pro Plus program (Media Cybernetics, USA).

### ***In situ hybridization***

The pGEMCoMir plasmid was linearized with appropriate enzymes and used as template for *in vitro* transcription, according to the Digoxigenin RNA labelling Kit (Roche, Germany). Riboprobes were then sheared by alkaline hydrolysis to an average size of 250 bp.

Plant material was vacuum infiltrated with FAA solution (4% paraformaldehyde, 50 % ethanol, 5% acetic acid). Tissue was dehydrated in ethanol and xylene graded series and embedded in paraffin (Histosec®, Merck, Germany). For hybridization, 10 µm-thick sections were positioned in Probe On Plus™ slides (Fisher Scientific, USA), hydrated, and treated with 20 µg/mL of proteinase K (Invitrogen, USA) for 15 min at 37°C. Slides were incubated in PBS (16 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 84 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 M NaCl) for 2 min, 0.2 % glycine in PBS for 2 min, and 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Thereafter, slides were equilibrated in a solution containing 0.1 M triethalonamine pH 8.0 and 0.1% acetic anhydride for 10 min, washed in PBS and gradually dehydrated. Hybridization with riboprobes was conducted at 50°C for 16 h in 50% formamide, 5X SSC, 5% SDS, 100 µg/mL tRNA, 100 µg/mL poli-A and 500 ng of riboprobe per slide. Slides were washed in a solution containing 0.2X SSC and 0.2% SDS for 5 min, incubated in 2X SSC for 2 min, treated with RNase A (10 µg/mL) in 2X SSC for 20 min and equilibrated in TBS (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.4 M NaCl) for 5 min. Hybrids were detected using the Digoxigenin Nucleic Acid Detection kit according to manufacturer's instructions (Roche, Germany). After signal visualization, slides were dehydrated and mounted in Permount (Fisher Scientific, USA). Photomicrographs were taken on a BX51 microscope (Olympus, Japan) with a bright-field condenser.

## ***Nucleotide and protein analysis***

Sequencing was done in an ABI Prism 3700 sequencer (Applied Biosystems, USA). Database searches were performed using BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Protein prediction and analysis were done using PROSITE (Falquet *et al.*, 2002), PFAM (Bateman *et al.*, 2000) and PSORT (Nakai and Horton, 1999). Protease inhibitors classification described herein are based in the MEROPS database (Rawlings *et al.*, 2004b). Sequence alignment was carried out using CLUSTAL W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994) and edited with the GeneDoc platform (Nicholas and Nicholas Jr., 1997). An unrooted tree of Kunitz STI protease inhibitors was inferred by using the MEGA3 program (Kumar *et al.*, 2004).

## **Results**

### ***The CoMir gene***

Based on macroarray analysis of subtracted cDNA libraries enriched in genes preferentially induced during coffee leaf miner infestation (Mondego *et al.*, 2005), we identified a clone (SSH101B04) four-fold up-regulated after oviposition in coffee resistant plants. The deduced protein was similar to the tumor-related protein NF34 from tobacco (Karrer *et al.*, 1998). The virtual translation of another clone from our library (SSH104C02) contained similarity with the C-terminal of the same protein. We utilized the SSH104C02 sequence to construct primers for a 5'RACE amplification strategy. A single RACE product of 642 bp was cloned and sequenced, giving rise to an open reading frame containing 214 amino acids (Fig 1A). This protein was significantly similar to the root-knot nematode-induced tomato gene *LeMir* (E-value 1e

- 36; 46% similarity; Brenner *et al.*, 1998), to the taste-modifying protein miraculin (E-value  $2e - 31$ ; 41% similarity; Theerasilp and Kurihara, 1988), to the tumor-related protein NF34 (E-value  $2e - 40$ ; 48% similarity), to the protein PtdTI4 from *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* hybrids (E-value  $1e - 36$ ; 46% similarity; Miranda *et al.* unpublished), to the 21 kDa cocoa seed albumin precursor (E-value  $5e - 33$ ; 39% similarity; Spencer and Hodge, 1991) and to the miraculin-like protein from *Solanum brevidens* (E-value  $2e - 36$ ; 48% similarity; Seo *et al.* unpublished). Since our full-length sequence had similarity with *LeMir* and *miraculin* genes, we named it *CoMir* (Coffee *Miraculin*-like). We also searched for *CoMir* similar sequences in EST databanks. EST CA-H12\_02\_A12 is highly similar to *CoMir* gene (E-value  $1e - 131$ ; 93% similarity) covering its last 519 bp (fig 1B). The virtual translation of EST CA-H12\_02\_A12 has 91% of similarity to *CoMir* (fig 1B). Interestingly, CA-H12\_02\_A12 was up-regulated in an incompatible reaction between *C. arabica* and coffee rust fungus (*Hemileia vastatrix*) (Fernandez *et al.*, 2004).

The Alignment of *CoMir* with Kunitz Soybean Trypsin inhibitor (Kunitz STI) family proteins showed that *CoMir*, *LeMir* and *miraculin* are indeed members of this family, but contain a higher number (six to seven) of cysteines than the Kunitz STI archetype 1AVU (Fig 2A). An un-rooted phylogentic tree containing proteins more similar to *CoMir* and another members of Kunitz STI family was generated (Fig 2B). The resulting tree indicated that *CoMir* is a member of a clade of proteins that are similar to *miraculin* from *Richadella dulcifica*.

### ***CoMir* pattern of expression**

*CoMir* cDNA was used as a probe in a blot containing RNA from a replicate experiment of leaf miner infestation to confirm the gene expression profile. *CoMir* was

up-regulated in resistant plants after oviposition (Ro) and its expression decreased abruptly during herbivory (Re). In susceptible plants, *CoMir* was only slightly induced after oviposition (So) and no transcripts were detected after larvae eclosion (Se) (Fig 3).

In order to evaluate whether the difference of expression between resistant (R) and susceptible (S) plants was associated to polymorphisms, Southern blots containing genomic DNA from R and S were hybridized with the full length *CoMir* cDNA probe (Fig 4). We have not identified any fragment length polymorphism between these two genotypes using the enzymes shown in figure 4. Other three restriction enzymes (*Mbol*, *HindIII* and *HincII*) also failed to detect polymorphisms (data not shown). We have also hybridized these membranes with SSH104C02 EST, which covers the 3'NTR of *CoMir* (Fig 1A). Using the same stringent hybridization and wash conditions, we have not detected any difference between SSH104C02 and the full length *CoMir* (data not shown).

To determine *CoMir* organ specificity, the *CoMir* cDNA probe was hybridized to RNA blots containing RNA from different organs of coffee plants (Fig 5). *CoMir* was expressed in leaves, down-regulated throughout flower development (Fig 5A) and highly expressed in early green fruits (Fig 5B).

*In situ* hybridization was used to localize *CoMir* transcript accumulation (Fig 6). Higher levels of *CoMir* transcripts were detected in the metaxylem vessels of leaves of resistant plants infested after oviposition (Fig 6A). The same spatial pattern of expression was observed in control resistant plants (data not shown). In flower buds of non-infested susceptible plants, *CoMir* was expressed in the metaxylem vessels of petals (Fig 6C) and stigma (Fig 6G), and in vascular bundles, endothecium, tapetum and stomium of anthers (Fig 6E).

### **CoMir subcellular localization**

The PSORT program (Nakai and Horton, 1999) was used to evaluate the putative subcellular localization of CoMir protein. PSORT analysis indicated that CoMir contained a putative extracellular signal peptide. To test whether this protein was localized in the apoplast, a plasmid containing a *CoMir::GFP* fusion was transiently expressed in onion epidermal cells using particle bombardment. CoMir subcellular pattern was a combination of apoplast and cytoplasmic localization (Fig 7A) that was distinct from the localization of control GFP detected in nucleus and cytoplasmic strands (Fig 7B).

Figure 2B

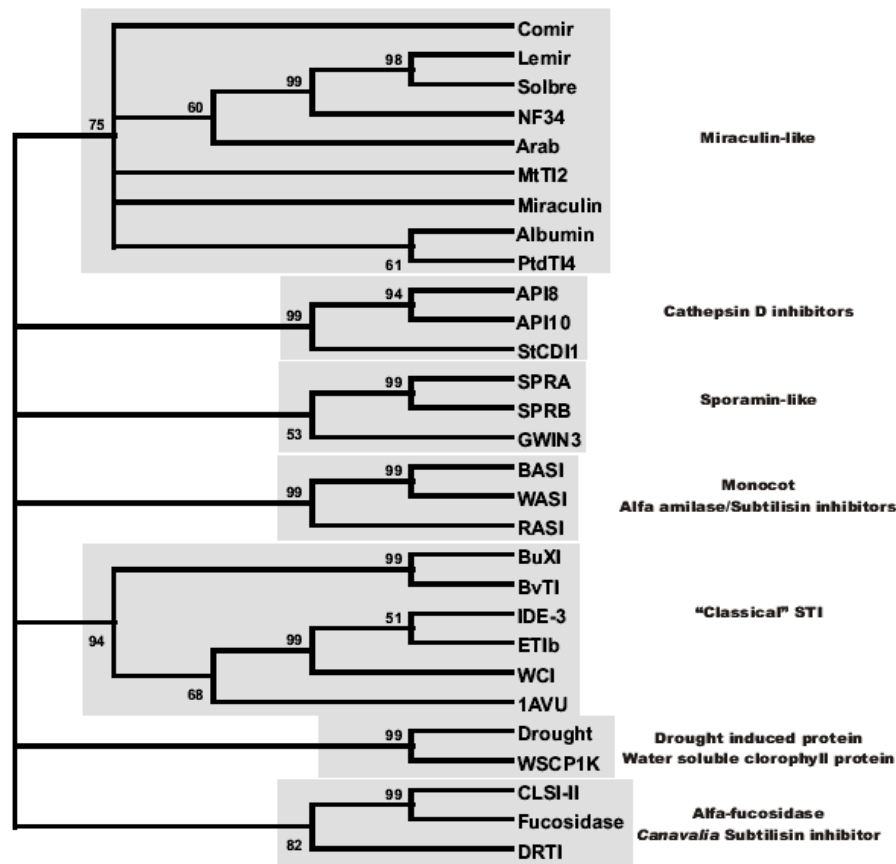


Figure 2B: Phylogenetic un-rooted tree of members of Kunitz STI family. The tree was constructed as a consensus of 5000 bootstrap replicates by Neighbor-Joining and P-distance parameters. Only bootstrap values > 50 are indicated. Lemir: (*Lycopersicon esculentum*) - gi: 2654440; Solbre: Miraculin-like protein (*Solanum brevidens*) - gi: 37625527; NF34: tumor-related protein (*Nicotiana tabacum*) gi: 7438249; Arab: putative lem ir (miraculin) protein (*Arabidopsis thaliana*) - gi: 12083240 ; Mtt12: pathogen-inducible trypsin- inhibitor-like protein (*Medicago truncatula*) - gi: 48526375; Miraculin: miraculin precursor (*Richadella dulcifica*) - gi: 6166552; Albumin: 21 kDa seed protein precursor (*Theobroma cacao*) - gi: 228316; PtdT14: Kunitz trypsin inhibitor 4 (*Populus balsamifera* subsp. trichocarpa x *Populus deltoides*) - gi: 35187106; API8 Aspartic protease inhibitor 8 precursor (*Solanum tuberosum*) - gi: 124012; API10: Aspartic protease inhibitor 10 precursor (*Solanum tuberosum*) - gi: 729802; StCD11: cathepsin D inhibitor (*S. tuberosum*) - gi: 24745611; SPRA: sporamin A precursor (*Ipomea batatas*) - gi: 168278; SPRB: Sporamin B precursor (*I. batatas*) - gi: 134844; GWIN3: Wound responsive GWIN3 protein precursor (*Populus* sp.) - gi: 139700; BASI: 1AVA|C Chain C, Amy2BASI (*Hordeum vulgare*) - gi: 4699833; WASI: Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor (WASI) (*Triticum aestivum*) - gi: 123975; RASI : bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor (*Oryza sativa*) - gi: 17402591; BuXI: Factor Xa inhibitor BuXI (*Bauhinia unguolata*) - gi: 32363179; BvTI: ITRY\_BAUVA Trypsin inhibitor BvTI (*Bauhinia variegata*) - gi: 32363181; IDE3: Trypsin inhibitor DE-3 (*Erythrina caffra*) - gi: 124154; ET1b: trypsin inhibitor ET1b precursor (*Erythrina variegata*) - gi: 7438247; WCI-x: chymotrypsin inhibitor (Kunitz) precursor - winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) - gi: 81981; 1AVU: Trypsin Inhibitor From Soybean (Sti) - gi: 3891584; Drought-induced : Drought-induced protein (*Raphanus sativus*) - gi: 33772288; WSCP1K: Water soluble chlorophyll protein precursor (*Lepidium virginicum*) - gi: 18146718; CLSI-II : Subtilisin inhibitor CLSI-II (*Canavalia lineata*) - gi: 27734409; Fucosinh: alpha fucosidase precursor (*Pisum sativum*) - gi: 2129874; DRTI: Kunitz-type serine protease inhibitor DrTI (*Delonix regia*) - gi: 47115660.

## Figure 3

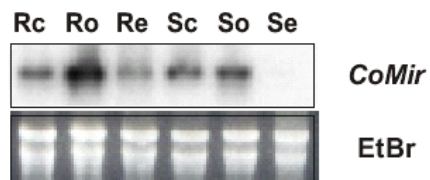


Figure 3: Expression profile of *CoMir* during coffee leaf miner infestation. RNA blot containing RNAs from different treatments: Rc, resistant plants not infested; Ro, resistant plants after oviposition; Re, resistant plants after larval eclosion; Sc, susceptible plants not infested; So, susceptible plants after oviposition; Se, susceptible plants after larval eclosion. Ethidium bromide-stained rRNA (EtBr) was visualized as a control for RNA loading.



Figure 4

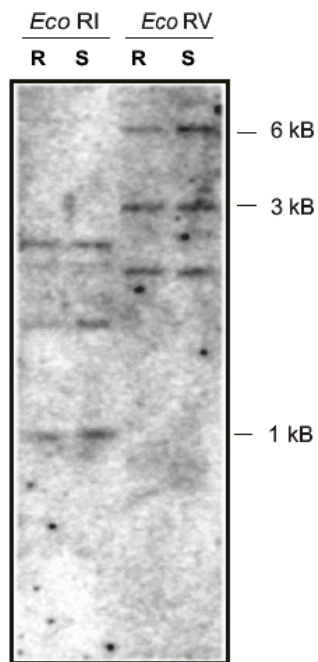


Figure 4: Southern blot analysis of *CoMir*. Ten micrograms of genomic DNA were digested with enzymes indicated in the panel. Numbers in the right indicate the length of DNA fragments. R: resistant plants. S: susceptible plants.

## Figure 5

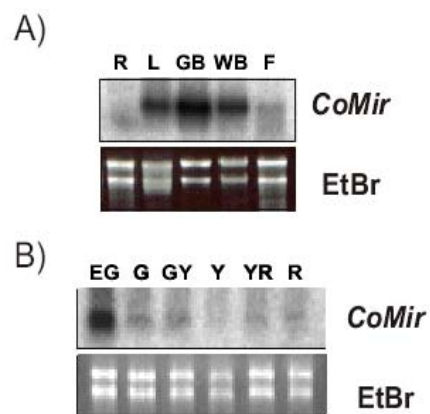


Figure 5: Expression profile of *CoMir* in different organs of coffee plants. A) RNA blot containing RNAs from roots (R), leaves (L), green flower buds (GB), white flower buds (WB) and open flowers (F). B) RNA blot containing RNAs from different phases of coffee fruit development: early green (EG), green (G), green-yellow (GY), yellow (Y), yellow-red (YR) and red (R). Ethidium bromide-stained rRNA (EtBr) was visualized as a control for RNA loading.

Figure 6

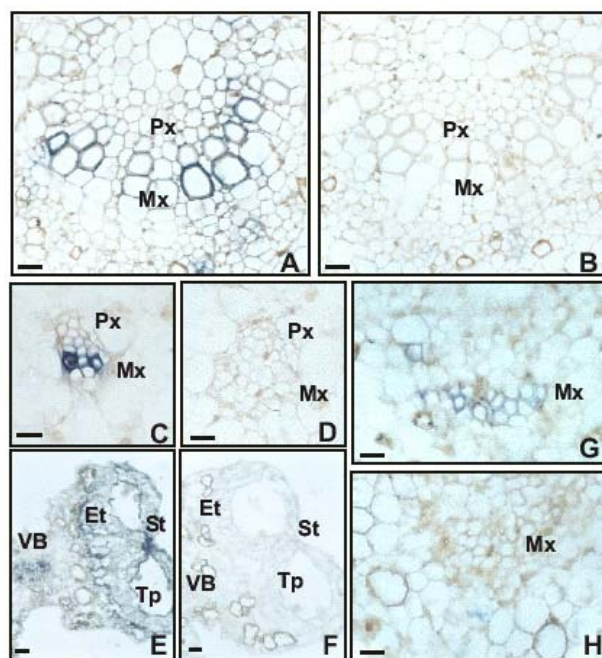


Figure 6: *In situ* localization of *CoMir* transcripts. Transversal sections (10  $\mu$ M) of coffee tissues were hybridized with *CoMir* antisense RNA (A, C, E and G) or sense RNA (B, D, F and H). Resistant leaves after *L. coffeella* oviposition (A-B), white flower bud petal (C-D), anther (E-F) and stigma (G,H) from susceptible plants. Px: protoxylem; Mx: metaxylem; VB: vascular bundles; St: stomium; Tp: tapetum; Et: endothecium. Bars = 30  $\mu$ M.

## Figure 7

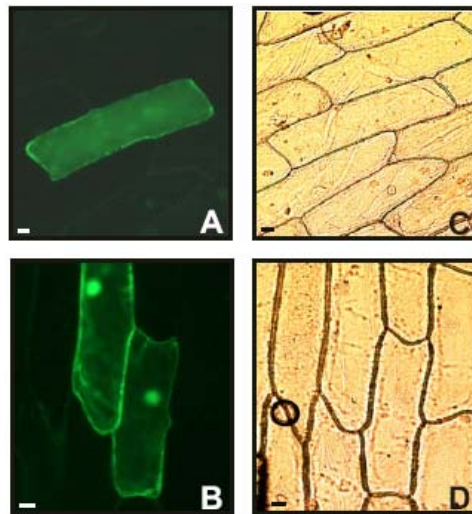


Figure 7: Subcellular localization of CoMir. Onion epidermal cells were bombarded with constructs containing GFP fusions. Left panel: (A) CoMir::mGFP5 expression and (B) mGFP5 expression in dark field fluorescence. Right panel: Bright field images of CoMir::mGFP5 (C) and mGFP5 (D). Bars = 100  $\mu$ M.

## Discussion

### ***CoMir is member of a clade of Kunitz STI family of protease inhibitors***

Database searches revealed that *CoMir* is similar to proteins that belong to Kunitz STI family of protease inhibitors. Among them are LeMir from tomato (Brenner *et al.*, 1998), miraculin from *R. dulcifica* (Theerasilp and Kurihara, 1988), tumor related protein NF34 from tobacco (Karrer *et al.*, 1999), protein PtdTI4 from *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* hybrids (Miranda *et al.*, unpublished), 21 kDa cocoa seed albumin precursor (Spence and Hodge, 1991) and miraculin-like protein from *Solanum brevidens* (Seo *et al.*, unpublished).

Our phylogenetic analysis was in agreement with that on Svensson *et al.*, (2004). Additionally, it indicated that *CoMir* makes part of a clade of Kunitz STI proteins similar to miraculin from *R. dulcifica*. Even though we cannot assure the time of divergence between these proteins, our results suggest that miraculin-like proteins may have a common ancestor protein.

The alignment of Kunitz STI proteins demonstrated that the members of this family have variability in the cys content, which is more prominent in a region near the C-terminal end (Fig 2A, box III). The majority of miraculin-like proteins contain two cys residues in this region, except MtTi2 (the two cys are located near the N-terminal end) and *CoMir* (Fig 2A, one cys in box III and another cys in position 140, gray arrow). Therefore, miraculin-like proteins contain six cys residues, except Miraculin from *R. dulcifica*, that contains an additional cys implicated in intrachain disulfide linkage (Igeta *et al.*, 1991). Probably, position and content of cys may be important features distinguishing Kunitz STI clades in structure and function.

Protease inhibitors bind to the active site of proteases through a peptide-bond (denominated P1-P1') that serves as substrate for proteolytic activity. Basic amino acid residues (lys and arg) are characteristic for trypsin activity, while chymotrypsin prefers substrates containing hydrophobic residues (i.e, Leu and Phe) at P1 site. Until now, none of miraculin-like proteins mentioned herein have been experimentally characterized as protease inhibitors. For instance, even though LeMir contains a Lys residue in P1 site, Brenner *et al.* (1998) have not detected protease-inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin using a *Pichia pastoris*-expressed LeMir protein. CoMir has a Glu-Glu bond in P1-P1' (Fig 2A, black arrow). Two examples of proteases that have preference for Glu residues are the soybean C1 subtilisin-like (subtilase) protein, which initiates the breakdown of the  $\alpha$ -subunit of the storage protein  $\beta$ -conglycinin (Boyd *et al.*, 2002), and the digestive carboxypeptidase HaCA42 from *Helicoverpa armigera*, a maize lepidopteran pest (Bown and Gatehouse, 2004).

Transient expression of CoMir-GFP fused protein demonstrated that CoMir is secreted to the apoplast (Fig 7), a trait of many Kunitz STI proteins (Fig 2A, box SP). However, the diffused fluorescence in the cytoplasm indicates that CoMir-GFP was not totally secreted. This fluorescence pattern was similar to that found by Suzuki *et al.*, (2004), which analyzed the secreted protein CDR-1. Nevertheless, we cannot rule out that CoMir-GFP partial targeting to cytoplasm may be due to uncorrected folding or uncorrected signal peptide proteolysis of the protein fusion.

Southern blot revealed that *CoMir* hybridized with three fragments. Since plants of progeny H14954-29 are tetraploid, maybe these plants contain three copies of *CoMir*. In such case, one progenitor could be homozygous for *CoMir*, and the other one heterozygous. Further studies are necessary to unravel genealogy of *CoMir* gene.

### **CoMir and coffee development**

*CoMir* was preferentially expressed in young tissues. This pattern of expression was in accordance with previous reports showing that protease inhibitors are expressed in immature tissues (Shatters Jr. *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2000). Conversely, proteases are found to be up-regulated during flower senescence and fruit maturation (Wagstaff *et al.*, 2002; Xu and Chye, 1999). In fact, Shatters *et al.* (2004) identified three proteins down-regulated during fruit development that are similar to miraculin-like proteins. In spite of the fact that *CoMir* expression decays in mature fruits, *CoMir* protein might also accumulate in fruit at late stages. Unfortunately, coffee fruits were recalcitrant to *in situ* fixation, which disabled us to characterize the tissue-specific expression of *CoMir* during coffee fruit/seed maturation.

*In situ* hybridization revealed that *CoMir* is expressed in the anther endothecium, tapetum and stomium. These three tissues have programmed cell death (PCD) that is essential for microspore maturation and release (for a review see Wu and Cheun, 2000). De Guzman and Riggs (2000) demonstrated that proteolysis increases during anther development and is temporally correlated with PCD of anther tissues preceding pollen liberation. Together with RNA blot results, which showed that *CoMir* is down-regulated in open flowers, *in situ* results indicate that this gene may be a proteolytic inhibitor during early microsporogenesis, which is repressed as anther development proceeds.

We verified the expression of *CoMir* in the xylem, more precisely in the metaxylem vessels. This result is in agreement with the facts that *CoMir* contains a signal peptide to apoplasm, and that xylem is part of apoplasm space (Sattelmacher, 2001). Xylem vessels suffer autolysis at the end of their differentiation when PCD takes place (Kozela and Regan, 2003; Dahiya, 2003). Conversely to early mature

protoxylem, metaxylem differentiates later, after the complete organ elongation. Mature xylem vessels transport water, minerals, sugar, amino acids, organic acids and recent reports have described the presence of defense proteins and proteases in the xylem sap (Rep *et al.*, 2002; Buhtz *et al.*, 2004; Kehr *et al.*, 2005). Moreau *et al.* (2005) identified subtilases and cysteine proteases specifically expressed in *Populus* fiber-cell death cDNAs libraries. Additionally, other reports have described the importance of proteases in stimulating the cell death of tracheary elements (Ye and Varner *et al.*, 1996; Groover and Jones, 1999). Two *Arabidopsis* genes encoding subtilases were expressed in the leaf protoxylem and phloem (Golldack *et al.*, 2003). Strikingly, a zinc binding protein isolated from xylem vessels of *Citrus jambhiri* contained identity with Kunitz STI proteins like miraculin, and inhibited the activity of cysteine protease papain (Taylor *et al.*, 2002; Ellis and Taylor, 2004). These data indicate that CoMir may act as regulator of proteolytic events during xylogenesis.

### **CoMir and resistance against *L. coffeella***

Kunitz STI proteins are deterrent to lepidoteran development (Zavala *et al.*, 2004). Therefore, is tempting to suggest that CoMir is an inhibitor of *L. coffeella* growth. Surprisingly, this putative protease inhibitor gene was repressed in Se treatment, during intense larvae herbivory, a stress that up-regulates Kunitz STI genes (Haruta *et al.*, 2001; Tamayo *et al.*, 2000). Thus, *CoMir* seems to be induced by an herbivory-independent defense mechanism. This gene was up-regulated before larvae eclosion in resistant plants (Ro), which indicates that *L. coffeella* oviposition may trigger a signal transduction that leads to *CoMir* induction. In this sense, the amount of CoMir in resistant plants prior to egg hatching would inhibit *L. coffeella* caterpillar eclosion or its development inside leaf mines. Interestingly, it was found that plant



defense are activated by a peptide or a compound bound to a peptide present in *Dipiron pini* fluid oviposition (Hilker *et al.*, 2005), and bruchin, a long-chain diol present in the egg fluids of the pea pod pest *Bruchus pisorum* (Doss *et al.*, 2000).

Small punctiform lesions located in the oviposition site were observed after the eclosion of *L. coffeella* larvae in highly resistant coffee plants (Medina-Filho *et al.*, 1977; Guerreiro-Filho *et al.*, 1991; Mondego *et al.*, 2005). Interestingly, a similar phenotype was detected in the interaction between the hymenopteran leaf miner *Fenusa pusilla* and *Betula* species (Hoch *et al.*, 2000). In *B. davurica*, leaf miner eggs failed to hatch and became surrounded by a necrotic tissue. This high level of resistance was classified as a hypersensitive response (HR)-like phenotype (Hoch *et al.*, 2000). Curiously, miraculin-like protein tumor-related protein NF34 elicited HR in tobacco mosaic virus (TMV)-susceptible tobacco plants when overexpressed by a TMV expression vector (Karrer *et al.*, 1998). Furthermore, a *C. arabica* EST highly similar to *CoMir* was up-regulated during a HR to coffee rust fungus (Fernandez *et al.*, 2004). These data let us to hypothesize that *CoMir* acts in a defense mechanism against *L. coffeella* that may have similarities to a HR.

Miraculin like-protein MtTi2, and SrPi1, a Kunitz STI similar to *CoMir*, were up-regulated during symbiotic interactions (Wulf *et al.*, 2003; Lievens *et al.*, 2004). In both reports it was suggested that these proteins might control the development of the symbiotic invader inside the plant by regulating host serine proteases induced during colonization (Ribeiro *et al.*, 1995). Following this scenario, although coffee – *L. coffeella* interaction does not fit into symbiosis, *CoMir* may inhibit the action of a coffee protease that positively influences the leaf miner infestation.

Because *L. coffeella* only feeds on palisade parenchyma, it was expected that this gene would be expressed in this tissue or in epidermis. However, *CoMir* transcript

accumulation was observed only in the leaf metaxylem vessels in both oviposition and control treatments. Since CoMir contains an apoplastic signal peptide, maybe CoMir could be translocated from xylem vessels to the apoplasm of parenchymatic tissues after oviposition signaling. The inhibition of coffee leaf miner in resistant plants is striking. Hence, it is possible that CoMir is a protein involved in coffee development, which after *L. coffeella* stress signaling is mobilized to act in the defense against coffee leaf miner.

### **Acknowledgements**

The authors thank Daniel Alves Ramiro and Silvia Chebabi Mathiessen for insect rearing, Sandra Rodrigues Camargo for aid during bombardment and GFP analysis experiments, and Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin for the use of the fluorescence microscope. J.M.C.M. and M.P.D. were recipients of fellowships from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). M.M. received a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This research was supported by FAEPEX (Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa e à Extensão - project n° 040504) and Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café.

### **References**

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-410.
- Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL, Sonnhammer EL. 2000. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 28, 263- 266.
- Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, Erlandsson R, Bjorkbacka H, Birve SJ, Karlsson J, Gardstrom P, Gustafsson P, Lundeberg J, Jansson S. 2003. Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiol.* 131, 430-242.

- Bown DP, Gatehouse JA. 2004. Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues. *Eur J Biochem* 271, 2000-2011.
- Boyd PM, Barnaby N, Tan-Wilson A, Wilson KA. 2002. Cleavage specificity of the subtilisin-like protease C1 from soybean. *Biochim Biophys Acta* 1596, 269-282
- Brenner ED, Lambert KN, Kaloshian I, Williamson VM. 1998. Characterization of LeMir, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol.* 118, 237-247.
- Buhtz A, Kolasa A, Arlt K, Walz C, Kehr J. 2004. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta.* 219, 610-618.
- Choi D, Park JA, Seo YS, Chun YJ, Kim WT. 2000. Structure and stress-related expression of two cDNAs encoding proteinase inhibitor II of *Nicotiana glutinosa* L. *Biochim Biophys Acta.* 1492, 211-215.
- Cordero MJ, Raventos D, San Segundo B. 1994. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant J.* 6, 141-150.
- Dahiya P. 2003. Role of death in providing lifeline to plants. *Trends Plant Sci.* 8, 462-465.
- DeGuzman R, Riggs CD. 2000. A survey of proteinases active during meiotic development. *Planta.* 210, 921-924.
- Doss RP, Oliver JE, Proebsting WM, Potter SW, Kuy S, Clement SL, Williamson RT, Carney JR, DeVilbiss ED. 2000. Bruchins: insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 6218-6223.
- Ellis DR, Taylor KC. 2004. Cloning of a zinc-binding cysteine proteinase inhibitor in citrus vascular tissue. *J Am Soc Hortic Sci.* 129, 615-623.
- Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A. 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 30, 235-238.
- Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon MC, Petitot AS, Silva MC, Guerra-Guimarães L, Ribeiro A, Argout X, Nicole M. 2004. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Mol Plant Pathol.* 5, 527-536.
- Golldack D, Vera P, Dietz KJ. 2003. Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiol Plant.* 118, 64-73.

- Groover A, Jones AM. 1999. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* 119, 375-84.
- Grunwald U, Nyamsuren O, Tamasloukht M, Lapopin L, Becker A, Mann P, Gianinazzi-Pearson V, Krajinski F, Franken P. 2004. Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscule development-related expression profile. *Plant Mol Biol.* 55, 553-566.
- Guerreiro Filho O, Medina-Filho HP, Carvalho A. 1991. Fontes de resistência ao bicho-mineiro, *Perileucoptera coffeella*, em *Coffea* spp. *Bragantia.* 50, 45-55.
- Haruta M, Major IT, Christopher ME, Patton JJ, Constabel CP. 2001. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Mol Biol.* 46, 347-359.
- Haseloff J. 1999. GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods Cell Biol* 58, 139-151.
- Hermesmeier D, Schittko U, Baldwin IT. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol.* 125, 683-700.
- Hilker M, Stein C, Schroder R, Varama M, Mumm R. 2005. Insect egg deposition induces defence responses in *Pinus sylvestris*: characterisation of the elicitor. *J Exp Biol.* 208, 1849-1854.
- Hoch WA, Zeldin EL, McCown BH. 2000. Resistance to the birch leafminer *Fenusa pusilla* (Hymenoptera: Tenthredinidae) within the genus *Betula*. *J Econ Entomol.* 93, 1810-1813.
- Igeta H, Tamura Y, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y. 1991. Determination of disulfide array and subunit structure of taste-modifying protein, miraculin. *Biochim Biophys Acta.* 1079, 303-307.
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan C. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86, 9871-9875.
- Karrer EE, Beachy RN, Holt CA. 1998. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Mol Biol.* 36, 681-690.
- Kehr J, Buhtz A, Giavalisco P. 2005. Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. *BMC Plant Biol.* 21, 5: 11.
- Kozela C, Regan S. 2003. How plants make tubes. *Trends Plant Sci.* 8, 159-164.

- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150-163.
- Laskowski M Jr, Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* 49, 593-626.
- Lievens S, Goormachtig S, Holsters M. 2004. Nodule-enhanced protease inhibitor gene: emerging patterns of gene expression in nodule development on *Sesbania rostrata*. *J Exp Bot.* 55, 89-97.
- Liu XW, Zhang Z, Barnaby N, Wilson KA, Tan-Wilson A. 2001. Soybean subtilisin-like protease involved in initiating storage protein degradation. *Seed Sci Res* 11, 55-68
- Medina Filho HP, Carvalho AP, Mônico LC. 1977. Melhoramento do cafeeiro. XXXVII - Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro. *Bragantia* 36, 131-137.
- Mondego JMC, Guerreiro-Filho O, Bengtson MH, Drummond RD, Felix JM, Duarte MP, Ramiro D, Maluf MP, Sogayar MC, Menossi M. 2005. Isolation and characterization of *Coffea* genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation. *Plant Sci.* 169, 351-360.
- Moreau C, Aksenov N, Lorenzo MG, Segerman B, Funk C, Nilsson P, Jansson S, Tuominen H. 2005. A genomic approach to investigate developmental cell death in woody tissues of *Populus* trees. *Genome Biol.* 6 (4), R34
- Murashige T, Skoog F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol Plant* 15. 471-497.
- Murdock LL, Shade RE. 2002. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J Agric Food Chem.* 50, 6605-6611.
- Nakai K and Horton P. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* 24, 34-35.
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr, 1997. Gene doc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. Available from <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>
- Paulini AE, Andrade PR, Matiello JB, Mansk Z, Paulino AJ, 1975. Eficiência do controle do bicho mineiro do café (*Perileucoptera coffeella* – Guer-Men, 1842) e sua relação com a produtividade. In: Resumos do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 3. Curitiba, IBC/GERCA, Rio de Janeiro, pp. 1.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J.* 378, 705-716.

- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. 2004. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 1; 32 (Database issue), D160-164.
- Rep M, Dekker HL, Vossen JH, de Boer AD, Houterman PM, Speijer D, Back JW, de Koster CG, Cornelissen BJ. 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol.* 130, 904-917.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 12, 707-720.
- Ribeiro A, Akkermans AD, van Kammen A, Bisseling T, Pawlowski K. 1995. A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell.* 7, 785-794.
- Rodrigues Macedo ML, Machado Freire MG, Cabrini EC, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S. 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochim Biophys Acta.* 1621, 170-182.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sattelmacher B. 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol.* 149, 167-192.
- Shatters RG Jr, Bausher MG, Hunter WB, Chaparro JX, Dang PM, Niedz RP, Mayer RT, McCollum TG, Sinisterra X. 2004. Putative protease inhibitor gene discovery and transcript profiling during fruit development and leaf damage in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Gene.* 326, 77-86.
- Spencer ME, Hodge R. 1991. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao*. *Planta.* 183: 528-535.
- Suzuki H, Xia Y, Cameron R, Shadle G, Blount J, Lamb C, Dixon RA. 2004. Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J Exp Bot.* 55, 169-179.
- Svensson B, Fukuda K, Nielsen PK, Bonsager BC. 2004. Proteinaceous alpha-amylase inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 1696, 145-156.
- Tamayo MC, Rufat M, Bravo JM, San Segundo B. 2000. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta.* 211, 62-71.
- Taylor KC, Ellis DR, Paiva L. 2002. Purification of a zinc binding protein from xylem of *Citrus jambhiri*. *J Am Soc Hort Sci* 127, 718-723.

- Theerasilp S, Kurihara Y. 1988. Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit. *J Biol Chem.* 263, 11536-11539.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Wagstaff C, Leverentz MK, Griffiths G, Thomas B, Chanasut U, Stead AD, Rogers HJ. 2002. Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. *J Exp Bot.* 53, 233-240.
- Walling LL. 2000. The Myriad Plant Responses to Herbivores. *J Plant Growth Regul.* 19, 195-216.
- Wu HM, Cheun AY. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol Biol.* 44, 267-281.
- Wulf A, Manthey K, Doll J, Perlick AM, Linke B, Bekel T, Meyer F, Franken P, Kuster H, Krajinski F. 2003. Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact.* 16, 306-314.
- Xu FX, Chye ML. 1999. Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. *Plant J.* 17, 321-327.
- Ye ZH, Varner JE. 1996. Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant Mol Biol.* 30, 1233-1246.
- Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Hui D, Baldwin IT. 2004. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiol.* 134, 1181-1190.

## DISCUSSÃO

Nesse tópico será feita uma discussão geral na qual se abordará a contribuição dos trabalhos descritos nos capítulos anteriores para o entendimento dos mecanismos de resistência do cafeeiro ao bicho mineiro e do desenvolvimento do cafeeiro.

### 1 – Identificação de genes induzidos durante a infestação do bicho mineiro

Como apresentado no capítulo I, utilizamos a combinação das técnicas de biblioteca de subtração e macroarranjos de DNA para identificarmos genes induzidos durante a infestação do bicho mineiro em plantas da quinta geração de retrocruzamentos entre *C. arabica* e *C. racemosa* do programa de melhoramento do IAC (vide tabela I, introdução). Para tal, infestamos folhas de plantas suscetíveis e resistentes da progênie em estudo, extraímos RNA e fizemos *pools* das amostras Ro e Re (*tester*), e Rc, So e Se (*driver*) (vide capítulo I) a fim de construirmos bibliotecas de subtração. Mil quinhentos e trinta e seis ESTs (768 da biblioteca de RDA e 768 da biblioteca de SSH) foram depositados em membranas de náilon e hibridados com cDNAs derivados de plantas infestadas e não infestadas. Após a normalização dos dados pela mediana do *background*, os valores de intensidade foram convertidos a escala logarítmica, já que dessa forma os dados tendem a ficar mais ajustados a uma distribuição normal, o que aumenta a confiança nos resultados obtidos (Zar, 1999). Após análise de variância (ANOVA), em torno de 10% dos ESTs foram considerados diferencialmente expressos. Esse valor corrobora com outros estudos que demonstraram que essa é a percentagem média de ESTs diferencialmente expressos identificados por bibliotecas de subtração (Xiong *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2004). Entretanto, após a análise de nossos dados, verificamos que vários ESTs foram



induzidos em plantas suscetíveis. Esse resultado foi inesperado, já que em nossas bibliotecas só deveriam constar genes induzidos em plantas resistentes pós-infestação. A partir desse fato, cabe uma breve discussão sobre a nossa estratégia de subtração e sobre algumas limitações do uso de bibliotecas de subtração na detecção de genes diferencialmente expressos.

Nossa estratégia de subtração ( $R_o+R_e - S_c+S_o+S_e$ ) teve como intuito o isolamento de genes preferencialmente induzidos em plantas resistentes após a infestação pelo bicho mineiro. Se fossem utilizadas espécies diferentes (p.e., *C. racemosa* e *C. arabica*) na construção da biblioteca de subtração, genes não diretamente relacionados com a resistência ao bicho mineiro, mas com outras características intrínsecas de cada espécie, seriam isolados na biblioteca. Logo, o uso de plantas de uma progênie segregante para uma dada característica (no caso, a resistência ao bicho mineiro) na confecção de bibliotecas de subtração facilitaria o isolamento de genes relacionados com a característica segregante. Entretanto, após a construção de nossas bibliotecas foi publicado o trabalho de Ji *et al.* (2002). Esses autores demonstraram que o enriquecimento de um gene numa biblioteca de subtração do tipo SSH é determinado pela razão de concentração (R) desse gene entre *tester* e *driver*. Genes diferencialmente expressos com um grande valor de R (genes comumente chamados de “tudo ou nada”), tendem a ser enriquecidos. Segundo esses autores, o SSH deve ser preferencialmente aplicado na detecção de mudanças dramáticas de expressão gênica como infecções virais, transições de desenvolvimento em eucariontes dimórficos (Marques *et al.*, 2004) ou em comparações entre diferentes tecidos. Por outro lado, o uso do SSH em *time-courses* experimentais ou na comparação entre um mesmo tecido normal e doente pode ser ineficiente, exatamente pela presença de diferenças sutis de expressão gênica entre

essas duas condições. Outra constatação desse trabalho é que para que ocorra o enriquecimento de genes diferencialmente expressos, faz-se necessário que o R de um gene alvo seja igual ou maior que 5. Ji *et al.* (2002) ressaltam que a presença de genes não diferencialmente expressos em bibliotecas de subtração pode não ser resultante de um erro experimental, mas da falta de genes significativamente diferencialmente expressos entre *driver* e *tester*. Com relação ao RDA, uma das premissas da técnica é que genes cujo R entre *tester* e *driver* seja menor que 10, tendem a ser eliminados da biblioteca. Caso o contrário, o número de falsos positivos tende a aumentar na biblioteca (Hubank e Scahtz, 2000). Avaliando nosso modelo experimental (*background* genético praticamente idêntico entre *tester* e *driver*; *time-course* experimental comparando plantas infestadas e não infestadas) e nossos resultados (nenhum EST apresentou  $R \geq 5$ , capítulo 1, tabela 1), e assumindo que não ocorreu nenhum erro experimental durante a confecção das bibliotecas, acreditamos que a presença de ESTs induzidos em plantas suscetíveis em nossas bibliotecas seja derivada de características do perfil de expressão gênica das plantas utilizadas antes e depois da infestação do bicho mineiro.

Apesar de nossas bibliotecas não apresentarem níveis ideais de subtração, os perfis de expressão dos genes selecionados como diferencialmente expressos durante a infestação do bicho mineiro indicam possíveis mecanismos de defesa ativados pelo cafeeiro contra esse inseto. Pelos dados apresentados na tabela 1 do capítulo 1 verificamos que vários genes relacionados com defesa/estresse (*PLD*, *LOX-3*, *GRP*, *VSP*, *LEA*, *LTP*, *PR-8*) são mais expressos em plantas resistentes não infestadas do que nas plantas suscetíveis não infestadas. Esse resultado sugere que plantas resistentes apresentam níveis de defesa basal mais acentuados do que plantas suscetíveis. Também verificamos que vários genes ativados pela via de

defesa relacionada a jasmonato (JA)/ ferida/ herbivoria (*PLD*, *LOX-3*, *LEA*, *LTP*, *PR-8*) foram induzidos após a eclosão da lagarta de *L. coffeella* (tratamento Se). Esse dado indica que apesar das plantas suscetíveis ativarem um mecanismo de defesa contra a lagarta, essa sinalização não é capaz de bloquear o desenvolvimento da larva do bicho mineiro. Além disso, a partir da tabela 1 é possível verificar a indução de genes após a oviposição da mariposa de *L. coffeella* somente em plantas suscetíveis (So - *BEL1*, etc.), em plantas resistentes (Ro - *SPC25*, *ISPD*, *psaH*, etc.) e em plantas resistentes e suscetíveis (Ro e So - *CAX9*, *Miraculin-like*, *PR-8* etc.). A indução desses genes nessa etapa do ciclo de infestação sugere que a oviposição pode desencadear uma cascata de sinalização que ativa a expressão gênica.

Dentre os genes induzidos após a oviposição do bicho mineiro em plantas resistentes, destacamos *PR-8* (quitinase classe III) e *Miraculin-like* (inibidor de protease). Esses dois genes codificam proteínas caracterizadas como inibidoras do crescimento de insetos e patógenos (Ding *et al.*, 1998; Fung *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2004). Devido à inibição do desenvolvimento da lagarta em plantas resistentes, a indução desses genes relacionados ao combate de organismos agressores sugere sua ação no bloqueio do crescimento da larva de *L. coffeella*. Por essa hipótese, logo ao eclodir do ovo, a lagarta neonata encontraria uma quantidade de proteínas nocivas ao seu crescimento e morreria. Essa hipótese é corroborada pelos dados apresentados por Li *et al.* (2004), mostrando que larvas neonatas teriam menor capacidade de se adaptarem a ação de inibidores de protease do que larvas adultas.

Nesse contexto, cabe discutir qual seria a função dos genes *Lm1* e *Lm2*, determinantes da resistência de *C. racemosa* ao bicho mineiro (Guerreiro *et al.*, 1999), dentro do nosso modelo de defesa. *Lm1* e *Lm2* poderiam codificar proteínas reguladoras da defesa contra o bicho mineiro, estimulando a transcrição de genes que

confeririam maior resistência basal em plantas resistentes. Um dos exemplos de proteínas reguladoras de defesa basal é a proteína de função desconhecida de *Arabidopsis* RPW8 que confere resistência a fungos do gênero *Erysiphe* (Xiao *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2005). Assim sendo, *Lm1* e *Lm2* poderiam ser ativados em alguma etapa do desenvolvimento do cafeeiro resistente ao bicho-mineiro e estimulariam a transcrição de genes de defesa antes da infestação por *L. coffeella*. Outra possibilidade é que *Lm1* e *Lm2* seriam proteínas responsáveis pelo reconhecimento e/ou sinalização do ataque de *L. coffeella*. Seguindo essa hipótese, *Lm1* e *Lm2* poderiam codificar receptores, como por exemplo proteínas do tipo NBS-LRR que são bastante caracterizadas como reguladoras da resistência genótipo-específica em interações planta-patógeno (Dangl *et al.*, 2001). Apesar da grande maioria dos eventos de defesa envolvendo resistência genótipo-específica serem documentados em interações planta-patógeno, esse tipo de mecanismo de defesa vegetal vem sendo observado em interações de vegetais com afídios (van der Westhuizen *et al.*, 1998; Sauge *et al.*, 2002), dípteros como a mosca de Hess (Dweikat *et al.*, 1997) e bruquídeos como o caruncho da ervilha (Doss *et al.*, 2000). No trabalho de van der Westhuizen *et al.* (1998) foi descrita uma indução maior e mais rápida de proteínas PR em plantas de trigo resistentes a afídios do que em plantas de trigo suscetíveis. Esse resultado se assemelha ao observado em café, onde genes de defesa (*PR-8*, *miraculina*) são mais induzidos logo após a oviposição do bicho mineiro e mais expressos em plantas resistentes que suscetíveis. Além disso, todos os três grupos de insetos citados (afídios, mosca de hess e bruchídeos) podem ser considerados insetos sedentários segundo a classificação de Walling (2000), sendo que nos dois últimos casos o fenótipo de resistência é disparado após a oviposição do inseto.

Trabalhos recentes demonstraram que existem moléculas eliciadoras de defesa vegetal no fluido de oviposição de artrópodos. Como mencionado anteriormente, Hilker *et al.* (2005) verificaram que um peptídeo, ou um composto ligado a um peptídeo, presente no oviduto secretor das fêmeas do himenóptero *Dipiron pini* é capaz de induzir a emissão de voláteis de *Pinus sylvestris* que são responsáveis pela defesa indireta contra o inseto agressor. Além disso, Doss e colaboradores verificaram que compostos conhecidos como bruchinas presentes no fluido de oviposição de *Bruchus pisorum* são capazes de ativar a produção de neoplasmas inibidores do desenvolvimento de larvas desse inseto (Doss *et al.*, 2000), e que a bruchina do tipo B incentiva a expressão de genes que codificam uma isoflavona sintase (Cooper *et al.*, 2005) e uma proteína relacionada com senescência e nodulação (Doss, 2005).

Recentemente, Bernet *et al.* (2005) estudaram a susceptibilidade/resistência de uma progênie híbrida entre duas espécies de citros (*Citrus aurantium* e *Poncirus trifoliata*) ao inseto minador *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae). O ciclo de vida desse minador é muito semelhante ao de *L. coffeella*: oviposição na epiderme superior, formação de minas no mesófilo e formação de pupa na folha; diferindo apenas quanto ao sítio de alimentação, que no caso de *P. citrella* é a epiderme e não o parênquima paliçádico. Assim como no caso do bicho mineiro, as lagartas do minador não conseguem terminar o seu desenvolvimento nas plantas resistentes, morrendo dentro das minas. Nesse trabalho foram identificados 6 QTLs (*Quantitative trait loci*) associados à antixenose (número de folhas infestadas) e 2 QTLs associados à antibiose (número de pupas por folhas). Um dos marcadores QTL de antibiose é similar a genes de resistência do tipo NBS-LRR, indicando a participação dessas proteínas na resistência a minadores.

A partir da união de dados prévios relacionados ao nosso modelo biológico de estudo (resistência genótipo-específica governada por dois genes de resistência *Lm1* e *Lm2*), e de nossos resultados (defesa basal maior em plantas resistentes e indução de genes de defesa logo após a oviposição) aos dados da literatura referentes a modelos semelhantes ao nosso (presença de eliciadores em fluidos de oviposição, resistência genótipo-específica disparada por oviposição, expressão gênica disparada por oviposição e QTLs de antibiose a minadores similares a genes de resistência), acreditamos que existam indícios de um mecanismo de antibiose ao ovo do bicho mineiro que desencadearia uma defesa contra a lagarta de *L. coffeella*. Esse mecanismo seria mais eficiente em plantas resistentes, já que nesses genótipos as larvas não conseguem completar seu desenvolvimento. Os maiores níveis de antibiose em plantas resistentes seriam derivados de uma combinação entre resistência basal mais acentuada e da indução de genes de defesa após a oviposição. O mecanismo de sinalização de defesa poderia ser derivado da interação entre eliciadores presentes no ovo de *L. coffeella* com proteínas reguladas por *Lm1* e *Lm2*, ou com as próprias *Lm1* e *Lm2*. Para a confirmação de nossa hipótese, outros experimentos são necessários como um estudo microscópico da interação ovo/planta, isolamento de moléculas derivadas do ovo de *L. coffeella* a fim de se verificar seu efeito eliciador de defesa e mapeamento e caracterização dos genes *Lm1* e *Lm2*.

## **2 – Caracterização de um gene que codifica uma proteína similar à miraculina induzido durante a infestação do bicho mineiro**

Um dos genes caracterizados como induzidos durante a infestação de *L. coffeella* é similar a proteínas da família de inibidores de proteinase Kunitz STI (*Soybean trypsin inhibitor*). Mais especificamente, esse gene possui maior identidade

com genes que codificam proteínas similares a miraculina. Dentre eles estão *LeMir* (Brenner *et al.*, 1998), o gene que codifica a proteína modificadora de sabor miraculina (Theerasilp and Kurihara, 1988), e o gene que codifica a proteína relacionada a tumor em tabaco e eliciadora da HR contra TMV em tabaco (Fujita *et al.*, 1994; Karrer *et al.*, 1998).

A principal característica das proteínas Kunitz STI é a presença de uma região conservada na porção amino-terminal [(L/I/V/M)-x-D-x-(E/D/N/T/Y)-(D/G)-(R/K/H/D/E/N/Q)-x-(L/I/V/M)-x-(5)-Y-(L/I/V/M)]. Além disso, proteínas dessa família possuem 4 resíduos de cisteína conservados, um sítio reativo presente entre as duas primeiras cisteínas, e em sua maioria, têm atividade inibitória contra proteases serínicas. Entretanto, Rawlings *et al.* (2004) verificaram que proteínas dessa família - apresentavam atividade contra proteases cisteínicas e aspárticas e que não continham um padrão tão definido de quantidade de cisteínas como proposto por Laskowski e Kato (1980). A partir de alinhamento usando seqüências de proteínas Kunitz STI verificamos que existe uma variação na quantidade de cisteínas presente numa região próxima do C-terminal dessas proteínas, e que a maioria das proteínas similares a miraculina possuem 4 cisteínas nessa região (capítulo II, figura 2A, dados não mostrados). A variação da quantidade de cisteínas pode ser importante como fator de variação estrutural funcional entre proteínas Kunitz STI de diferentes clados (capítulo II, figura 2B). As proteínas Kunitz STI, em sua maioria, possuem um sítio de direcionamento para o apoplasto. CoMir também possui um sítio de exportação para o meio extracelular. A partir da análise da proteína de fusão CoMir-GFP verificamos a presença de fluorescência no apoplasto, mas também um padrão difuso de fluorescência ao longo do citoplasma (capítulo II, figura 7). Isso indica que CoMir

possa não ter sido processada corretamente. Suzuki *et al.* (2004) também verificaram padrões semelhantes de fluorescência com a proteína de fusão CDR-GFP.

*CoMir* foi induzido fortemente em plantas resistentes pós-oviposição (Ro) e teve uma pequena indução em plantas suscetíveis pós-oviposição (So). Acreditamos que o padrão de expressão de *CoMir* durante o experimento de infestação de folhas de cafeeiro resistentes e suscetíveis (capítulo II, figura 3), indica que esse gene possa estar relacionado com a resistência ao bicho mineiro. Diversas proteínas Kunitz STI foram caracterizadas como inibidoras de crescimento de insetos (Murdock e Shade, 2002; Rodrigues-Macedo *et al.*, 2003; Zavala *et al.*, 2004). Genes que codificam proteínas similares a miraculina foram induzidos durante eventos de interação entre planta-micorriza (Wulf *et al.*, 2004), planta-nematódeo (Brenner *et al.*, 1998) e planta-rizóbio (Lievens *et al.*, 2004) e na ativação de HR contra TMV em tabaco (Karrer *et al.*, 1998). Além disso, um EST de *C. arabica* similar a *CoMir* foi identificado como induzido durante a HR a ferrugem do café (Fernandez *et al.*, 2004). A partir dos dados correlacionando proteínas similares a miraculina a eventos de estresse biótico, especulamos que *CoMir* agiria como inibidora do desenvolvimento larvar do bicho mineiro.

A partir do uso da técnica de hibridação *in situ* verificamos que *CoMir* é expresso no metaxilema de folhas infestadas e não infestadas pelo ovo do bicho mineiro (Figura 6, capítulo II). Apesar da marcação do sistema de hibridação *in situ* não ser quantitativa, detectamos visualmente um sinal mais intenso nas plantas resistentes pós-oviposição (Ro) do que nas planta controle (Rc) (dados não mostrados). A presença de *CoMir* no tecido vascular e não na epiderme ou parênquima paliçádico, sítios de contato do ovo e da lagarta de *L. coffella* na folha do cafeeiro, foi surpreendente. Entretanto, dados da literatura indicam uma possível



correlação entre a expressão de *CoMir* no tecido vascular e sua possível função como proteína de defesa.

De acordo com Sattelmacher, (2001) todos os compartimentos do vegetal que não o plasmalema (conteúdo intercelular) constituem o apoplasto (p.e., os espaços interfibrilares da parede celular, o xilema). As bordas do apoplasto seriam a cutícula e a rizosfera (Sattelmacher, 2001). Recentemente, vários trabalhos demonstraram a presença de proteínas de defesa no fluido xilemático (Rep *et al.*, 2002; Buhtz *et al.*, 2004; Kehr *et al.*, 2005) e de sua expressão em tecidos de madeira contendo vasos xilemáticos em processo de morte celular programada (Moreau *et al.*, 2005). Rep *et al.* (2002) verificaram que o padrão de expressão de proteínas do xilema foi alterado após a infestação de patógenos e que houve um aumento da expressão de proteínas de defesa. Assim sendo, supomos que *CoMir* possa ser expressa nas células do xilema, secretada para a cavidade xilemática e translocada até o apoplasma adjacente às células parenquimáticas. Dessa forma, ao ingerir o mesofilo, a lagarta entraria em contato com *CoMir* e teria seu desenvolvimento bloqueado.

Durante o curso de sua diferenciação, os vasos xilemáticos adquirem lignificações em sua parede secundária e subseqüentemente autolisam seu conteúdo celular. Essas células têm um programa de morte celular no qual ocorre a degradação de organelas e do DNA cromossômico, evidenciando um evento de morte celular programada (PCD) (Dahiya, 2003). O xilema pode ser dividido em protoxilema e metaxilema. As células do protoxilema se diferenciam precocemente e têm diâmetro menor que as células do metaxilema que se diferencia depois. O protoxilema diferenciado ocorre em órgãos jovens que estão em desenvolvimento. Por outro lado, as células do metaxilema só completam sua maturação após o alongamento do órgão ter cessado. Logo, pode-se inferir que as células do metaxilema sofrem autólise

completa mais tardiamente que células protoxilemáticas. Diversos trabalhos demonstram o papel essencial de proteases na ativação da PCD de tecidos xilemáticos (Ye e Varner, 1996; Groover e Jones, 1999). Solomon *et al.* (1999) verificaram que a PCD ativada por estresse oxidativo em células de tabaco induziu a expressão de proteinases cisteínicas, e que a expressão ectópica do inibidor de proteinase cistatina inibiu a atividade de proteinases cisteínicas e bloqueou a PCD. A expressão de *CoMir* no xilema, mais precisamente em células do metaxilema, indica que *CoMir* possa participar do processo de xilogênese, regulando a atividade de proteases ativadoras de PCD.

Outros resultados que sugerem que *CoMir* possa ser uma proteína reguladora de proteases relacionadas à morte celular são a repressão de *CoMir* ao longo do desenvolvimento floral (capítulo II, figura 5A) e sua expressão em tecidos da antera que sofrem morte celular programada (capítulo II, figura 6E). Ao longo do desenvolvimento floral, diversos tecidos como pétalas, estigma e antera, sofrem degradação. Vários estudos indicam a ação de proteases nos eventos de morte celular floral (De Guzman e Riggs, 2000; Xu e Chye, 1999), assim como o aumento de sua expressão ao longo de desenvolvimento de pétalas (Wagstaff *et al.*, 2002) e a repressão de inibidores de proteases no desenvolvimento floral (Sin e Chye, 2004).

A liberação dos grãos de polen maduros requer a ruptura das células do estômio, estrutura localizada nas laterais das anteras. Antes da deiscência da antera, o endotécio, que se localiza entre a epiderme e o tapete, degenera-se (Wu e Cheun, 2000). O tapete é um tecido que circunda o lóculo da antera, onde se localizam os grãos de pólen. Na etapa tardia da microsporogênese, o tapete sofre PCD (Wang *et al.*, 1999) e seu conteúdo celular é despejado no lóculo, alojando-se na camada mais externa da parede do grão de pólen (Wu e Cheun, 2000). Assim sendo, *CoMir* poderia

regular a atividade de proteases durante os estágios iniciais da microsporogênese do cafeeiro. Com o avanço da maturação dos micrósporos, a expressão de *CoMir* decairia, deixando livre a ação de proteases envolvidas em morte celular. Outra hipótese é que a expressão de *CoMir* no tapete esteja relacionada com a defesa do grão de pólen. *CoMir* então seria despejada no lóculo, com outras proteínas do tapete, e se alojaria na parede do grão de pólen, atuando como inibidora do ataque de predadores.

Outro dado interessante é a intensa expressão de *CoMir* nos estágios iniciais do desenvolvimento do fruto do café e sua repressão durante o amadurecimento desse órgão (capítulo II, figura 5B). Proteínas de estocagem em sementes são depositados em vacúolos de estocagem protéica como fonte de nitrogênio para o crescimento após a germinação das sementes (Muntz, 1998). Verificou-se que as proteínas de reserva 11S são as mais abundantes no fruto do café, e se acumulam no endosperma durante o desenvolvimento dos frutos (Marraccini *et al.*, 1999). Após a chegada nos vacúolos, as proteínas de reserva são convertidas à sua forma matura por proteólise em sítios específicos (Shimada *et al.*, 2003). A prevenção da degradação total das proteínas de estocagem durante a maturação da semente pode ser assegurada pela regulação da atividade das proteases (Shyu *et al.*, 2004). Seguindo essa hipótese, *CoMir* poderia atuar como reguladora de proteases durante o amadurecimento do fruto/semente do café.

Os artigos de Taylor *et al.* (2002) e Ellis e Taylor (2004) trazem evidências que reforçam nossos dados sobre o gene *CoMir*. Nesses artigos, foi descrito o isolamento de uma proteína de *Citrus jambhiri* que se liga a zinco (CVZBP) presente no xilema e sua identificação como similar a inibidores de protease Kunitz STI. Ellis e Taylor (2004) detectaram que CVZBP inibiu a atividade da protease cisteínica papaína,

demonstrando que proteínas Kunitz STI inibem outras proteases que não as serínicas. Apesar de nossos esforços, ainda não conseguimos caracterizar qual protease poderia ser inibida por CoMir (dados não mostrados). CoMir foi expressa em *Escherichia coli* num sistema heterólogo de expressão de proteínas, utilizando o vetor pET32a (Novagen, EUA). Até o momento, CoMir foi testada contra as proteases serínicas comerciais tripsina, quimiotripsina e subtilisina. Em nenhum dos três casos detectamos inibição de proteólise (dados não mostrados). Brenner *et al.*, (1998) testaram LeMir produzida na levedura *Pichia pastoris* contra tripsina e quimiotripsina, e também não verificaram atividade da proteína. Esses resultados podem ser derivados do uso de uma protease pela qual o inibidor não tem afinidade ou de uma conformação incorreta da proteína durante a expressão heteróloga, impedindo sua ação contra a protease. Curiosamente, o sítio ativo hipotético de CoMir possui dois ácidos glutâmicos (capítulo II, figura 2A), o que é incomum entre as proteínas Kunitz STI. Em breve, realizaremos experimentos de inibição de proteólise utilizando proteases cisteínicas e aspárticas a fim de tentarmos detectar a atividade da proteína CoMir.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na presente tese de doutoramento, podemos concluir que:

1) A combinação entre macroarranjos de DNA e bibliotecas de subtração mostrou-se eficiente no isolamento de genes diferencialmente expresso durante a infestação do bicho mineiro, apesar de nossas bibliotecas não apresentarem níveis ideais de subtração;

2) Plantas resistentes ao bicho mineiro possuem maiores níveis de expressão basal de genes relacionados a estresse e defesa quando comparadas com plantas suscetíveis;

3) Apesar da expressão de genes de defesa em plantas suscetíveis após a eclosão da lagarta, não houve bloqueio do desenvolvimento da larva. Esse resultado sugere algum mecanismo de resistência da lagarta do bicho mineiro à defesa do cafeeiro;

4) Os genes *PR-8* (quitinase classe III), *CAX9* (transportador de cálcio hipotético), *SPC25* (subunidade hipotética de peptidase sinal), *psaH* (proteína de fotossistema I) e *BEL* (proteína homeótica BEL) são induzidos durante a infestação do bicho mineiro;

5) A proteína codificada pelo gene *CoMir* faz parte da família Kunitz STI de inibidores de protease e nossas análises filogenéticas indicam que *CoMir* pertence a um clado de proteínas similares a miraculina de *Richadella dulcifica*;

6) O gene *CoMir* é expresso no metaxilema de folhas, pétalas e estigmas e no endotécio, tapete, estômio e feixes vasculares de antera. Esses dados sugerem sua participação na regulação de proteólise relacionada ao processo de morte celular programada que ocorre durante a xilogênese e na deiscência da antera;

7) O gene *CoMir* é induzido durante a oviposição do bicho mineiro. Esse resultado sugere que esse inibidor de protease possa mediar ou ser responsável pelo bloqueio do desenvolvimento da lagarta durante a infestação em plantas resistentes.

## PERSPECTIVAS

1) A expressão da proteína recombinante CoMir e sua utilização em diversos experimentos (testes de atividade contra proteases comerciais e purificadas de insetos, ensaios biológicos de inibição de crescimento de fungos e insetos, produção de anticorpos para experimentos de imunolocalização, cristalização, espectrometria de massa, espectroscopia por dicroísmo circular, ressonância magnética nuclear, etc.) poderiam ajudar a elucidar os mecanismos de ação dessa proteína;

2) Plantas geneticamente modificadas, superexpressando ou silenciando o gene *CoMir* poderiam ser utilizadas em ensaios biológicos, a fim de verificarmos sua ação contra insetos de interesse comercial;

3) Estudos mais detalhados sobre os mecanismos de resistência do cafeeiro ao bicho mineiro certamente contribuirão para a compreensão dessa interação. Como exemplo podemos citar: análise microscópica da interação entre ovo e folha do cafeeiro, isolamento e caracterização de possíveis eliciadores de defesa presentes nos ovos do bicho mineiro, medição da quantidade de fitohormônios (etileno, ácido abscísico) e de moléculas sinalizadoras de defesa (ácido jasmônico, ácido salicílico) durante o processo de infestação, mapeamento e caracterização dos genes *Lm1* e *Lm2*, etc.

## REFERÊNCIAS

- Alborn HT, Jones TH, Stenhagen GS, Tumlinson JH. Identification and synthesis of volicitin and related components from beet armyworm oral secretions. *J Chem Ecol.* 26: 203-220. 2000.
- Almeida PR. O "bicho mineiro do cafeeiro" *Perileucoptera coffeella* (Guérin -Méneville) como fator de restrição na produção do cafeeiro. In:Reunião Anual da Sociedade Entomológica do Brasil 1, 3. Viçosa. 1973.
- Amirhusin B, Shade RE, Koiwa H, Hasegawa PM, Bressan RA, Murdock LL, Zhu-Salzman K. Soyacystatin N inhibits proteolysis of wheat alpha-amylase inhibitor and potentiates toxicity against cowpea weevil. *J Econ Entomol.* 97: 2095-2100. 2004.
- Anderson JP, Badruzsafari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16: 3460-3479. 2004.
- Arimura G, Tashiro K, Kuhara S , Nishioka T, Ozawa R, Takabayashi J. Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 305-310. 2000a.
- Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature.* 406: 512-515. 2000b.
- Avrova AO, Stewart HE, De Jong WD, Heilbronn J, Lyon GD, Birch PR. A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact.* 12: 1114-1119. 1999.
- Baldwin IT, Halitschke R, Kessler A, Schittko U. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 351-358. 2001.
- Belenghi B, Acconcia F, Trovato M, Perazzolli M, Bocedi A, Polticelli F, Ascenzi P, Delledonne M. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *Eur J Biochem.* 270: 2593-2604. 2003.
- Bentur JS, Kalode MB. Hypersensitive reaction and induced resistance in rice against the Asian rice gall midge *Orseolia oryzae*. *Entomol. Exp. Applic.* 78: 77-81. 1996.
- Berger D, Altmann T. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 14: 1119-1131. 2000.
- Bernet GP, Margaix C, Jacas J, Carbonell EA, Asins MJ. Genetic analysis of citrus leafminer susceptibility. *Theor Appl Genet.* 110: 1393-1400. 2005.



- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*. 9:1573-1584. 1997.
- Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem Mol Biol*. 27: 625-638. 1997.
- Brenner ED, Lambert KN, Kaloshian I, Williamson VM. Characterization of *LeMir*, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol*. 118, 237-247. 1998.
- Broadway RM, Duffey SS. The Effect of plant Protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol*. 34: 1111-1117. 1988.
- Bronner R, Westphal E, Dreger F. Enhanced Peroxidase-Activity Associated with the Hypersensitive response of *Solanum dulcamara* to the gall mite *Aceria cladophthirus* (Acari, Eriophyoidea). *Can J Bot*. 69: 2192-2196. 1991.
- Buhtz A, Kolasa A, Arlt K, Walz C, Kehr J. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta*. 219: 610-618. 2004.
- Carrera E, Prat S. Expression of the *Arabidopsis* *abi1-1* mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. *Plant J*. 15: 765-771. 1998.
- Chao WS, Gu YQ, Pautot V V, Bray EA, Walling LL. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiol*. 120: 979-992. 1999.
- Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D, Winkler J, Lockhart DJ, Morris MS, Fodor SP. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*. 274: 610-614. 1996.
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 129: 661-677. 2002.
- Chichkova NV, Kim SH, Titova ES, Kalkum M, Morozov VS, Rubtsov YP, Kalinina NO, Taliansky ME, Vartapetian AB. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* 16: 157-171. 2004.
- Christopher ME, Miranda M, Major IT, Constabel CP. Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar. *Planta*. 219 :936-947. 2004.
- Cloutier C, Jean C, Fournier M, Yelle S, Michaud D. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-

- transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. *Arch Insect Biochem Physiol.* 44: 69-81. 2000.
- Coffeen WC, Wolpert TJ. Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell.* 16: 857-873. 2004.
- Colazza S, Fucarino A, Peri E, Salerno G, Conti E, Bin F. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *J Exp Biol.* 207: 47-53. 2004.
- Cooper LD, Doss RP, Price R, Peterson K, Oliver JE. Application of Bruchin B to pea pods results in the up-regulation of *CYP93C18*, a putative isoflavone synthase gene, and an increase in the level of pisatin, an isoflavone phytoalexin. *J Exp Bot.* 56: 1229-1237. 2005.
- Corre-Menguy F, Cejudo FJ, Mazubert C, Vidal J, Lelandais-Briere C, Torres G, Rode A, Hartmann C. Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development. *Plant Mol Biol.* 50: 687-698. 2002.
- Crowe TJ. Coffee leaf miners in Kenya. II - Causes of Outbreaks. *Kenya Coffee.* 29, 223-231. 1964.
- Dahiya P. Role of death in providing lifeline to plants. *Trends Plant Sci.* 8: 462-465. 2003.
- Dangl JL, Jones JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 411: 826-833. 2001.
- Daviron, B, Fosse W. La compétitivité des cafés africains. Collection Rapport d'étude. 1993.
- De Leo F, Bonade-Bottino M, Ceci LR, Gallerani R, Jouanin L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochem Mol Biol.* 31: 593-602. 2001.
- De Rosa Jr. VE, Nogueira FTS, Menossi M, Ulian E, Arruda P. Identification of methyl jasmonate-responsive genes in sugarcane using cDNA arrays. *Braz J Plant Physiol.* 17: 173-180. 2005.
- DeGuzman R, Riggs CD. A survey of proteinases active during meiotic development. *Planta.* 210: 921-924. 2000.
- Desprez T, Amselem J, Caboche M, Hofte H. Differential gene expression in Arabidopsis monitored using cDNA arrays. *Plant J.* 14, 643-652. 1998.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 6025-6030. 1996.

- Ding X, Gopalakrishnan B, Johnson LB, White FF, Wang X, Morgan TD, Kramer KJ, Muthukrishnan S. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res.* 7: 77-84. 1998.
- Dong Q, Roy L; Freeling M, Walbot V, Brendel, V. ZmDB, an integrated database for maize genome research. *Nucleic Acids Res.* 31. 244–247, 2003.
- Doss RP, Oliver JE, Proebsting WM, Potter SW, Kuy S, Clement SL, Williamson RT, Carney JR, DeVilbiss ED. Bruchins: insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 6218-6223. 2000.
- Doss RP. Treatment of pea pods with Bruchin B results in up-regulation of a gene similar to *MtN19*. *Plant Physiol Biochem.* 43: 225-231. 2005.
- Dweikat I, Ohm H, Patterson F, Cambron S. Identification of RAPD markers for 11 Hessian fly resistance genes in wheat. *Theor Appl Genet* 94: 419-423.1997.
- Ellis C, Karafyllidis I, Turner JG. Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 1025-1030. 2002.
- Ellis DR, Taylor KC. Cloning of a zinc-binding cysteine proteinase inhibitor in citrus vascular tissue. *J Am Soc Hortic Sci.* 129: 615-623. 2004.
- Farmer EE, Ryan CA. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell.* 4: 129-134. 1992.
- Felix JM, Drummond RD, Nogueira FTS, de Rosa Jr VE, Jorge RA, Arruda P, Menossi M. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 24: 60-67. 2002.
- Ferry N, Edwards MG, Gatehouse JA, Gatehouse AM. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Curr Opin Biotechnol.* 15: 155-161. 2004.
- Feys BJ, Parker JE. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16: 449-455. 2000.
- Finkenst WR, Laskoski M Jr. Peptide bond cleavage on trypsin-trypsin inhibitor complex formation. *J Biol Chem.* 24. 962-& 1965.
- Flor HH. Current satus of gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol.* 9: 275. 1971.
- Franco OL, Dias SC, Magalhaes CP, Monteiro ACS, Bloch C, Melo FR, Oliveira-Neto OB, Monnerat RG, Grossi-de-Sa MF. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry.* 65: 81-89. 2004.

- Fujita T, Kouchi H, Ichikawa T, Syono K. Cloning of cDNAs for genes that are specifically or preferentially expressed during the development of tobacco genetic tumors. *Plant J.* 5: 645-654. 1994.
- Fung KL, Zhao KJ, He ZM, Chye ML. Tobacco-expressed *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 shows antifungal activity in vitro. *Plant Mol Biol.* 50: 283-294. 2002.
- Garcia VA, Freire MG, Novello JC, Marangoni S, Macedo ML. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. *Protein J.* 23: 343-350. 2004.
- Glazebrook J. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 43: 9.1 - 9.23. 2005.
- Golldack D, Vera P, Dietz KJ. 2003. Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiol Plant.* 118, 64-73.
- Graner EA, Godoy-Junior C. Histórico. In: Manual do cafeicultor. Graner, E. A.; Godoy-Junior., C. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, pp. 8-16. 1967.
- Grover P. Hypersensitive response to Hessian fly. *Entomol. Exp. Applic.* 74: 283-294. 1995.
- Groover A, Jones AM. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* 119: 375-84. 1999.
- Guerreiro Filho O, Medina Filho HP, Carvalho A. Fontes de resistência ao bicho mineiro, *Perileucoptera coffeella* em *Coffea* spp. *Bragantia*, 50 (1): 45-55. 1991.
- Guerreiro Filho O, Silvarolla M.B, Eskes A.B. Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Euphytica* 105: 7-15. 1999.
- Guerreiro O, Mazzafera P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *J Chem Ecol* 26 (6) 1447-1464. 2000.
- Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem.* 240: 90-97. 1996.
- Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ, Gomez-Lim MA. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotech.* 17: 1223-1226. 1999.
- Halitschke R, Baldwin IT. Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *J Plant Growth Regul.* 23: 238-245. 2004.

- Hammond-Kosack KE, Jones JD. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*. 8: 1773-1791. 1996.
- Haruta M, Major IT, Christopher ME, Patton JJ, Constabel CP. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Mol Biol*. 46: 347-359. 2001.
- Hermesmeier D, Schittko U, Baldwin IT. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol*. 125: 683-700. 2001.
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RF, Boulter D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. 330: 160-163. 1987.
- Hildmann T, Ebner M, Pena-Cortes H, Sanchez-Serrano JJ, Willmitzer L, Prat S. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell*. 4: 1157-70. 1992.
- Hilker M, Stein C, Schroder R, Varama M, Mumm R. Insect egg deposition induces defence responses in *Pinus sylvestris*: characterisation of the elicitor. *J Exp Biol*. 208: 1849-54. 2005.
- Hoch WA, Zeldin EL, McCown BH. Resistance to the birch leafminer *Fenusa pusilla* (Hymenoptera: Tenthredinidae) within the genus *Betula*. *J Econ Entomol*. 93: 1810-1813. 2000.
- Hubank M, Schatz DG. Representational Difference Analysis of cDNA. 46-80. In: Functional Genomics. A practical approach. Eds: Stephen P. Hunt e Rick Levesey. Oxford University Press. 2000.
- Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*. 22: 5640-5648. 1994.
- Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, Kobayashi S, Davis C, Dai H, He YD, Stephanians SB, Cavet G, Walker WL, West A, Coffey E, Shoemaker DD, Stoughton R, Blanchard AP, Friend SH, Linsley PS. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*. 19: 342-347. 2001.
- Igeta H, Tamura Y, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y. Determination of disulfide array and subunit structure of taste modifying protein miraculin. *Biochim Biophys Acta* 1079: 303-307. 1991.
- Ishikawa A, Ohta S, Matsuoka K, Hattori T, Nakamura K. A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors – Structural comparison and differential expression. *Plant Cell Physiol*. 35: 303-312. 1994.

- Jacobsen SE, Olszewski NE. Gibberellins regulate the abundance of RNAs with sequence similarity to proteinase inhibitors, dioxygenases and dehydrogenases. *Planta*. 198: 78-86. 1996.
- Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics*. 2002: 3: 12. 2002.
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 9871-9875. 1989.
- Joly AB, Hermógenes FLF. As principais culturas brasileiras. Botânica econômica. Editora da USP, SP. 1979.
- Jongsma MA, Bolter C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol*. 43: 885-895. 1997.
- Karrer EE, Beachy RN, Holt CA. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Mol Biol*. 36: 681-690. 1998.
- Kehr J, Buhtz A, Giavalisco P. Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. *BMC Plant Biol*. 21: 5 11. 2005.
- Kessler A, Baldwin IT. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*. 291: 2141-2144. 2001.
- Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J*. 37: 370-378. 2004.
- Korth KL, Dixon RA. Evidence for Chewing Insect-Specific Molecular Events Distinct from a General Wound Response in Leaves. *Plant Physiol*. 115: 1299-1305. 1997.
- Kortt AA, Strike PM, De Jersey J. Amino acid sequence of a crystalline seed albumin (winged bean albumin-1) from *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. Sequence similarity with Kunitz-type seed inhibitors and 7S storage globulins. *Eur J Biochem*. 181: 403-408. 1989.
- Lashermes P, Combes MC, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F, Charrier A. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet*. 261 :259-266. 1999.
- Laskowski M Jr, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*. 49, 593-626. 1980.
- Laudert D, Weiler EW. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J*. 15: 675-684. 1998.

- Lawrence PK, Koundal KR. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron J Biotech.* 5: 2002.
- Lawrence SD, Novak NG. A rapid method for the production and characterization of recombinant insecticidal proteins in plants. *Mol Breed.* 8: 139-146. 2001.
- Lawrence SD, Novak NG. Maize genes induced by herbivory and volicitin. *J Chem Ecol.* 30: 2543-57. 2004.
- Lecardonnell A, Chauvin L, Jouanin L, Beaujean A, Prevost G, Sangwan-Norreel B. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci.* 140: 71-79. 1999.
- Lee SI, Lee SH, Koo JC, Chun HJ, Lim CO, Mun JH, Song YH, Cho MJ. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in transgenic rice. *Mol Breed.* 5: 1-9. 1999.
- Leon J, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ. Wound signalling in plants. *J Exp Bot.* 52: 1-9. 2001.
- Leroy T, Henry AM, Royer M, Altosaar I, Frutos R, Duris D, Philippe R. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.* 19, 382-389. 2000.
- Li HY, Guo ZF, Zhu YX. Molecular cloning and analysis of a pea cDNA that is expressed in darkness and very rapidly induced by gibberellic acid. *Mol Gen Genet.* 259: 393-397. 1998.
- Li J, Brader G, Palva ET. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.* 16: 319-331. 2004.
- Li J, Lease KA, Tax FE, Walker JC. BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 98: 5916-5921. 2001.
- Lievens S, Goormachtig S, Holsters M. Nodule-enhanced protease inhibitor gene: emerging patterns of gene expression in nodule development on *Sesbania rostrata*. *J Exp Bot.* 55: 89-97. 2004.
- Ling JQ, Kojima T, Shiraiwa M, Takahara H. Cloning of two cysteine proteinase genes, *CysP1* and *CysP2*, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis. *Biochim Biophys Acta.* 1627: 129-139. 2003.
- Liu Y, Salzman RA, Pankiw T, Zhu-Salzman K. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. *Insect Biochem Mol Biol.* 34: 1069-77. 2004.
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different

- jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16: 1938-1950. 2004.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*. 5: 165-178. 2003.
- Ma H, Schulze S, Lee S, Yang M, Mirkov E, Irvine J, Moore P, Paterson A, An EST survey of the sugarcane transcriptome. *Theor Appl Gen*. 108, 851-863, 2003.
- Magalhães ACN. Efeito da redução da superfície foliar sobre o desenvolvimento de cafeeiros. *Bragantia* 23, 337-342. 1964.
- Maidment JM, Moore D, Murphy GP, Murphy G, Clark IM. Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana* - Expression and activity. *J Biol Chem*. 274: 34706-34710. 1999.
- Marraccini P, Deshayes A, Pétiard V, Rogers W. Molecular cloning of complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol Biochem*. 37: 273-282. 1999.
- Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH. *Mol Genet Genomics*. 271: 667-77. 2004.
- Martinez M, Lopez-Solanilla E, Rodriguez-Palenzuela P, Carbonero P, Diaz I. Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (gene *Icy*) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties. *Mol Plant Microbe Interact*. 16 (10): 876-883. 2003.
- Masuda Y, Nirasawa S, Nakaya K, Kurihara Y. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste modifying protein, miraculin. *Gene*. 161: 175-177. 1995.
- Mattiacci L, Dicke M, Posthumus MA. beta-Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 2036-2040. 1995.
- Matvienko M, Torres MJ, Yoder JI. Transcriptional responses in the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor* to host plant signals. *Plant Physiol*. 127: 272-282. 2001.
- Mazumdar-Leighton S, Broadway RM. Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol*. 31: 633-644. 2001.
- Medina-Filho, H.P , Carvalho A e Medina D. Melhoramento do cafeeiro. XLIII-XLVI – Germoplasma de *C. racemosa* e seu potencial no melhoramento do cafeeiro. *Bragantia* . 1977a.



- Medina-Filho, H.P , Carvalho A e Medina D. Melhoramento do cafeeiro. XXXVII - Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro. *Bragantia* 36, 131-137. 1977b.
- Moran PJ, Cheng YF, Cassell JL, Thompson GA. Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Arch Insect Biochem Physiol.* 51: 182-203. 2002.
- Moreau C, Aksenov N, Lorenzo MG, Segerman B, Funk C, Nilsson P, Jansson S, Tuominen H. A genomic approach to investigate developmental cell death in woody tissues of *Populus* trees. *Genome Biol.* 6 (4), R 34. 2005.
- Moran PJ, Thompson GA. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiol.* 125: 1074-85. 2001.
- Moura DS, Ryan CA. Wound-inducible proteinase inhibitors in pepper. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 126: 289-98. 2001.
- Moy P, Qutob D, Chapman BP, Atkinson I, Gijzen M. Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:1051-1062. 2004.
- Mumm R, Schrank K, Wegener R, Schulz S, Hilker M. Chemical analysis of volatiles emitted by *Pinus sylvestris* after induction by insect oviposition. *J Chem Ecol.* 29: 1235-52. 2003.
- Muntz K. Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol.* 38: 77-99. 1998.
- Murdock LL, Shade RE. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J Agric Food Chem.* 50: 6605-6611. 2002.
- Nogueira FT, De Rosa VE Jr, Menossi M, Ulian EC, Arruda P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol.* 132 :1811-1824. 2003.
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* 198:249-66. 2004.
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ. Ethylene as a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science.* 274: 1914-1917. 1996.
- Ollerstam O, Larsson S. Salicylic acid mediates resistance in the willow *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *J Chem Ecol.* 29: 163-74. 2003.
- Ollerstam O, Rohfritsch O, Hoglund S, Larsson S. A rapid hypersensitive response associated with resistance in the willow *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *Entomol Exp Applic.* 102: 153-162. 2002.

- Parra JRP. Bioecologia de *Perileucoptera coffeella* (Guérin Méneville, 1842) (Lepidoptera Lyonetiidae) em condições de campo. 114p. Piracicaba, ESALQ. 1975.
- Parra JRP, Batista GC de, Zucchi RA. Pragas do cafeeiro. In: *Curso de entomologia aplicada à agricultura*. Piracicaba: FEALQ, 760p. 1992.
- Paulini AE et al. Eficiência do controle do bicho mineiro do café *P. coffeella* – (G.M., 1842) e sua relação com a produtividade. In: Resumos do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras 3. Curitiba. 1975.
- Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 5022-5026. 1994.
- Pieterse CM, van Wees SC, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, van Loon LC. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10: 1571-1580. 1998.
- Ponting CP, Russell RB. Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J Mol Biol*. 302: 1041-1047. 2000.
- Ramiro DA, Guerreiro-Filho O, Queiroz-Voltan RB, Matthiesen SC. Anatomical characterization of leaves from coffee plants resistant and susceptible to leaf miner. *Bragantia*. 63. 363-372. 2004.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 1: 32. D160-164. 2004.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J*. 378, 705-716. 2004.
- Reis PR, Souza JC de. Pragas do cafeeiro. In *Cultura do cafeeiro: Fatores que afetam a produtividade*. Eds: Rena AB, Malavolta. E, Rocha M, Yamada T. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. p. 347-356. 1986.
- Rep M, Dekker HL, Vossen JH, de Boer AD, Houterman PM, Speijer D, Back JW, de Koster CG, Cornelissen BJ. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol*. 130: 904-917. 2002.
- Reymond P, Bodenhausen N, Van Poecke RM, Krishnamurthy V, Dicke M, Farmer EE. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell*. 16: 3132-3147. 2004.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 12: 707-719. 2000.

- Ribeiro A, Akkermans AD, van Kammen A, Bisseling T, Pawlowski K. A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell*. 7: 785-794. 1995.
- Richter S, Lamppa GK. A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 7463-7468. 1998.
- Rodrigues Macedo ML, Machado Freire MG, Cabrini EC, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochim Biophys Acta*. 1621, 170-182. 2003.
- Rojó E, León J, Sánchez-Serrano JJ. Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 20: 135-142. 1999.
- Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, Williamson VM. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 9750-9754. 1998.
- Ryan CA. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*. 1477: 112-121. 2000.
- Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Tabata S. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res*. 8:153-161. 2001.
- Sattelmacher B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol*. 149: 167-192. 2001.
- Sauge MH, Lacroze JP, Poessel JL, Pascal T, Kervella J. Induced resistance by *Myzus persicae* in the peach cultivar 'Rubira'. *Entomol. Exp. Applic.* 102: 29-37. 2002.
- Schaller A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*. 220: 183-197. 2004.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 11655-11660. 2000.
- Schroder R, Forstreuter M, Hilker M. A plant notices insect egg deposition and changes its rate of photosynthesis. *Plant Physiol*. 138: 470-477. 2005.
- Schulze Gronover C, Schorn C, Tudzynski B. Identification of *Botrytis cinerea* genes up-regulated during infection and controlled by the Galpha subunit BCG1 using suppression subtractive hybridization (SSH). *Mol Plant Microbe Interact*. 17: 537-546. 2004.

- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics*. 2: 282-291. 2002.
- Shah J. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol*. 6: 365-371. 2003.
- Shimada T, Yamada K, Kataoka M, Nakaune S, Koumoto Y, Kuroyanagi M, Tabata S, Kato T, Shinozaki K, Seki M, Kobayashi M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 278: 32292-32299. 2003.
- Shyu DJ, Chou WM, Yiu TJ, Lin CP, Tzen JT. Cloning, functional expression, and characterization of cystatin in sesame seed. *J Agric Food Chem*. 52: 1350-1356. 2004.
- Simões I, Faro C. Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur J Biochem*. 271: 2067-2075. 2004.
- Sin SF, Chye ML. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta*. 219: 1010-1022. 2004.
- Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique-Silva F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochim Biophys Res Commun*. 296: 1194-1199. 2002.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*. 11: 431-443. 1999.
- Spencer ME, Hodge R. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao*. *Planta*. 183: 528-535. 1991.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*. 15: 760-770. 2003.
- Staswick PE, Tiryaki I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16: 2117-2127. 2004.
- Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*. 75: 687-706. 1993.
- Sugawara H, Shibuya K, Yoshioka T, Hashiba T, Satoh S. Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers? *J Exp Bot*. 53: 407-413. 2002.

- Suzuki H, Xia Y, Cameron R, Shadle G, Blount J, Lamb C, Dixon RA. Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J Exp Bot.* 55: 169-179. 2004.
- Takahashi S, Seki M, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Narusaka M, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in *Arabidopsis* cell culture using a full-length cDNA microarray. *Plant Mol Biol.* 56: 29-55. 2004
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C, Machida Y. A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development.* 128: 4681-4689. 2001.
- Taylor AA, Horsch A, Rzepczyk A, Hasenkampf CA, Riggs CD. Maturation and secretion of a serine proteinase is associated with events of late microsporogenesis. *Plant J.* 12: 1261-1271. 1997.
- Taylor KC, Ellis DR, Paiva L. Purification of a zinc binding protein from xylem of *Citrus jambhiri*. *J Am Soc Hortic Sci* 127: 718-723. 2002.
- Theerasilp S, Hitotsuya H, Nakajo S, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. *J Biol Chem.* 264: 6655-6659. 1989.
- Theerasilp S, Kurihara Y. Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit. *J Biol Chem.* 263: 11536-11539. 1988.
- Thomaziello RA; Fazuoli LC; Pezzopane JRM, Fahl, JI, Carelli MLC. Café Arábica: Cultura e Técnicas de Produção. Boletim Técnico 187. Instituto Agrônômico de Campinas. Campinas, SP. 2000.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 15107-15111. 1998.
- Tian MY, Huitema E, da Cunha L, Torto-Alalibo T, Kamoun S. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem.* 279: 26370-26377. 2004.
- Tornero P, Conejero V, Vera P. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J Biol Chem* 272: 14412-14419. 1997.
- Tornero P, Conejero V, Vera P. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 6332-6337. 1996.

- Tornero P, Mayda E, Gomez MD, Canas L, Conejero V, Vera P. Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. *Plant J.* 10: 315-330. 1996.
- Truitt CL, Wei HX, Pare PW. A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell.* 16: 523-32. 2004.
- van der Westhuizen AJ, Qian XM, Botha AM. Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. *Plant Cell Rep.* 18: 132-137. 1998.
- van Wees SC, de Swart EA, van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CM. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 8711-8716. 2000.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 270: 484-487. 1995.
- Verica JA, Maximova SN, Strem MD, Carlson JE, Bailey BA, Guiltinan MJ. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Rep.* 23: 404-13. 2004.
- Vettore, A.L, Da Silva, F.R.; Kemper, E.L.; Arruda, P. The libraries that made SUCEST. *Gen Mol Biol.* 24: 1-7. 2001.
- Vierstra RD. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant. *Trends Plant Sci.* 8: 135-142. 2003.
- Voelckel C, Weisser WW, Baldwin IT. An analysis of plant-aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Mol Ecol.* 13: 3187-3195. 2004.
- Waghorn JJ, del Pozo T, Acevedo EA, Cardemil LA. The role of two isoenzymes of alpha-amylase of *Araucaria araucana* (Araucariaceae) on the digestion of starch granules during germination. *J Exp Bot.* 54: 901-11. 2003.
- Wagstaff C, Leverentz MK, Griffiths G, Thomas B, Chanasut U, Stead AD, Rogers HJ. Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. *J Exp Bot.* 53: 233-240. 2002.
- Walling LL. The myriad plant responses to herbivores. *J Plant Growth Regul.* 19, 195-216. 2000.
- Wang M, Hoekstra S, van Bergen S, Lamers GE, Oppedijk BJ, van der Heijden MW, de Priester W, Schilperoort RA. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol Biol.* 39: 489-501. 1999.

- Wasternack C, Parthier B. Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2: 302-307. 1997.
- Watt DA. Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *J Exp Bot.* 54: 1163-1174. 2003.
- Wu HM, Cheun AY. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol Biol.* 44: 267-281. 2000.
- Wulf A, Manthey K, Doll J, Perlick AM, Linke B, Bekel T, Meyer F, Franken P, Kuster H, Krajinski F. Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact.* 16: 306-314. 2003.
- Xiao S, Calis O, Patrick E, Zhang G, Charoenwattana P, Muskett P, Parker JE, Turner JG. The atypical resistance gene, *RPW8*, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 95-110. 2005.
- Xiao S, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li T, Coleman M, Turner JG. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science.* 291:118-210. 2001
- Xiong LZ, Lee MW, Qi M, Yang YN Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Mol Plant Microbe Interact.* 14: 685-692. 2001.
- Xu FX, Chye ML. Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. *Plant J.* 17: 321-327. 1999.
- Ye ZH, Varner JE. Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant Mol Biol.* 30: 1233-1246. 1996.
- Yuan H, Chen X, Zhu L, He G. Identification of genes responsive to brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal (Homoptera: Delphacidae) feeding in rice. *Planta.* 221: 105-112. 2005.
- Zar JH (eds.) *Biostatistical analysis* (4th ed.) Simon & Schuster, Upper Saddle River, New Jersey, 1999.
- Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Hui D, Baldwin IT. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiol.* 134: 1181-1190. 2004.
- Zhang HY, Xie XZ, Xu YZ, Wu NH. Isolation and functional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene. *Plant Physiol Biochem.* 42: 437-444. 2004.
- Zhao CS, Johnson BJ, Kositsup B, Beers EP. Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiol.* 123: 1185-1196. 2000.

Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang J, Liu Y, Fu J, Jin Y, Gao P, Zhang J, Bai Y, Wang G. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. *Plant Mol Biol.* 55:807-823. 2004.