

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**Larissa Caroline Fialho**

Análise da expressão do gene *CaPox* que codifica uma peroxidase de classe III envolvida na interação do cafeeiro com nematóides.

BOTUCATU

2010

**Larissa Caroline Fialho**

Análise da expressão do gene *CaPox* que codifica uma peroxidase de classe III envolvida na interação do cafeeiro com nematóides.

Monografia apresentada junto ao curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, na área de concentração: Genética, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ivan de Godoy Maia

**BOTUCATU- SP**

**2010**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais,  
Atilde e Andrea

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Professor Dr. Ivan de Godoy Maia, pelos ensinamentos, pela paciência e principalmente pelo acolhimento em momentos decisivos.

Ao Doutorando Fábio Eduardo Severino pela grande sabedoria com a qual me guiou durante a realização desse trabalho, assim como pela amizade e paciência.

A Pós- Doutoranda Juliana Bravo pelos conselhos e ensinamentos em todos os sentidos.

Ao Pós- Doutorando Flávio, Doutorando Rodrigo, Doutorandas Alessandra Tenório e Alessandra e mestrandas Carolina, alunas de Iniciação Científica Layra e Marcela pela ajuda constante e momentos de descontração.

A todos os amigos e funcionários do Departamento de Genética.

*“Não se pode esperar resultados diferentes fazendo as coisas da mesma forma.”*

**Albert Einstein**

## RESUMO

A caracterização e isolamento do gene com expressão específica em raiz de café (*Coffea arabica*) que codifica uma peroxidase (*CaPOX*) e suas respectivas regiões promotoras, permitiu realizar a caracterização da expressão desse gene em resposta a estresse biótico (infecção por nematóides) assim como a análise funcional do seu promotor. Promotores tecido-específicos responsáveis pela regulação de genes responsivos a estresses bióticos tornam-se fundamentais em programas biotecnológicos que visam o aumento da resistência e tolerância vegetal. Partindo desse princípio, realizou-se a quantificação da expressão relativa do gene *CaPOX* em raízes de café utilizando plantas de *Coffea arabica* de um cultivar susceptível (Mundo Novo) e de outro cultivar resistente (IAC 388-17-1) a nematóides, respectivamente. Em paralelo utilizou-se plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) contendo a versão completa do promotor do gene *CaPOX* em fusão transcricional ao gene repórter *uidA* (que codifica a  $\beta$ -glucuronidase; GUS). A partir disso, pode-se observar que o gene *CaPOX* tem sua expressão aumentada em resposta a infecção por nematóides, sendo que a indução observada ocorre nos tempos iniciais pós-inoculação. Da mesma maneira, o promotor do gene *CaPOX* é responsivo a infecção por nematóides, sendo ativado nos tempos iniciais pós-inoculação.

## Lista de Ilustrações

Figura 1- Valores de Ct obtidos durante a amplificação do gene *CaPOX* em raízes de café resistente em diferentes tempos amostrais.....22

Figura 2: Valores de Ct obtidos durante a amplificação do gene *CaPOX* em raízes de café susceptível em diferentes tempos amostrais.....22

Figura 3: Valores de Ct obtidos durante a amplificação do gene repórter GUS em raízes de tabaco transgênico em diferentes tempos amostrais.....24

## **Lista de tabelas**

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho.....	20
--	----

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Histórico.....	11
1.2. Importância médica.....	12
1.3. Características Biológicas.....	12
1.4 Nematóides e parasitismo.....	13
1.5 Biotecnologia e Controle de Nematóides.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Material vegetal.....	15
3.2 Experimento de Infecção vegetal por nematóides e coleta do material.....	15
3.3. Extração de RNA total e quantificação.....	16
3.4 Síntese e quantificação de cDNA.....	17
3.5 Quantificação da expressão relativa por RT-qPCR.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Quantificação da expressão do gene <i>CaPOX</i> .....	20
4.2 Quantificação da expressão do gene <i>GUS</i> .....	23

5.CONCLUSÃO.....24

6.REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS.....24

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico

O café foi descoberto por volta do ano 800 provavelmente entre as regiões do sudoeste da Etiópia, do sudeste do Sudão e do norte do Quênia, na África. Atravessou o Mediterrâneo e chegou à Europa no início do século XVII, sendo inicialmente consumido como remédio para vários males, e adotado posteriormente como bebida. Chegou ao Brasil em 1727 trazido pelo sargento-mor Francisco de Mello Palheta, vindo da Guiana Francesa. Foi recebido, de presente, das mãos de Madame d'Orvilliers, esposa do governador de Caiena. As mudas recebidas foram plantadas no Pará, onde floresceram sem dificuldade (Andrade e Jafelice, 2005).

Pertencente à família Rubiaceae, desde sua chegada ao país, o café foi o maior gerador de riquezas e o produto de maior importância na história nacional. A previsão atual para a produção nacional de café beneficiado indica 47,2 milhões de sacas de 60 quilos. O resultado representa um acréscimo de 19,6%, ou seja, 7,73 milhões de sacas, quando comparado com a produção de 39,47 milhões de sacas obtidas na safra 2009 (CONAB). O Café contribui com mais de 2% do valor total das exportações brasileiras, e com mais de um terço da produção mundial, gerando recursos da ordem de 91 bilhões de dólares com o comércio de 115 milhões de sacas que, em média, são produzidas. A atividade envolve, ainda, meio bilhão de pessoas desde a sua produção ao consumo final, representando aproximadamente 8% da população mundial (segundo dados da Embrapa).

## 1.2. Importância médica

Além de todos os benefícios relacionados com a economia do país, na área da saúde, a comunidade médico-científica já considera o café como uma planta funcional que previne doenças e mantém a saúde, diz-se nutracêutica (com valor nutricional e farmacêutico). Há pesquisas que o indicam como possível “medicamento” na luta contra o alcoolismo, a depressão e o suicídio e, ainda, na prevenção de doenças como o mal de Parkinson e o mal de Alzheimer (EMBRAPA).

## 1.3. Características Biológicas

Embora grandes diferenças morfológicas e ecológicas ocorram entre as diferentes espécies de cafeeiro, o grupo compõe-se de plantas dicotiledôneas que possuem porte arbustivo ou arbóreo, caule lenhoso, folhas perenes e flores hermafroditas. A espécie em estudo, *Coffea arabica*, é o único exemplar tetraplóide ( $2n = 4x = 44$ ) formado por hibridização natural entre duas espécies diplóides proximamente relacionadas: *C. canephora* e *C. eugenioides* (Lashermes *et al.*, 1999). É importante ressaltar que apesar da pouca divergência entre os dois genomas constituintes, *C. arabica* apresenta comportamento meiótico como de um diplóide normal (Lashermes *et al.*, 2000 a, b).

Por possuir uma baixa diversidade genética, toda pesquisa científica voltada para identificar traços desejados nessa espécie é de grande valia, sobretudo para aumentar a eficiência produtiva da espécie. Uma importante opção nesse contexto refere-se à obtenção de plantas resistentes a pragas e doenças, sobretudo aos nematóides de galha que são altamente prejudiciais à cultura do café e de difícil controle.

#### 1.4 Nematóides e parasitismo

Nematóides do gênero *Meloidogyne* spp penetram no sistema radicular através do córtex dando início a processos de hiperplasia e hipertrofia do tecido cortical, o que provoca o aparecimento das galhas ou nódulos característicos da doença (Williamson e Hussey, 1996). Além disso, ao mesmo tempo, células parênquimatosas do xilema são selecionadas para ancoragem do nematóide, e por disfunção da maquinaria celular, ocorre à formação de células gigantes multinucleadas em número reduzido. Estas apresentam citoplasma denso e com grande concentração de organelas celulares e pequenos vacúolos. Muitos processos fisiológicos da planta hospedeira como a respiração, fotossíntese, absorção e translocação de água e nutrientes, o balanço hormonal, assim como deformações morfológicas e anatômicas, podem ser afetados direta ou indiretamente pelo parasitismo (Gonçalves e Silvarolla, 2001).

#### 1.5 Biotecnologia e Controle de Nematóides

Nesse cenário, o uso de recursos biotecnológicos pode ser extremamente útil para diminuir o efeito do parasita no vegetal. Por se tratar de *uma doença controlada de forma ineficiente pelos recursos tradicionais (Altpeter et al., 2005)*, baseados essencialmente no controle químico, a produção de plantas modificadas geneticamente se torna uma tentativa de controle mais eficiente para produção em larga escala. Para tal, entretanto, a identificação e caracterização de genes de resistência são imprescindíveis, ou ainda cujo produto apresenta propriedade nematicida ou repelente.

Em um projeto desenvolvido em nosso laboratório que objetivava identificar sequências expressas com padrões de expressão característicos em café, foi identificado um EST codificando uma peroxidase (POX) de classe III com expressão específica em raiz (Brandalise, 2007). Constatou-se que a expressão do gene correspondente (denominado *CaPOX*) foi aumentada em resposta a infecção por nematóides em raízes de café em diferentes tempos pós-infecção. Corroborando um possível papel do gene *CaPOX* na infecção por nematóides em café, a amplificação e caracterização parcial da região regulatória desse gene em plantas transgênicas de tabaco, demonstrou que o seu promotor é capaz de dirigir a expressão de um repórter exclusivamente em galhas de raízes infectadas por nematóides (Brandalise, 2007).

As POXs de classe III estão presentes em diferentes tecidos vegetais, são secretadas para o meio externo ou transportadas para os vacúolos, e agem normalmente na defesa contra patógenos (Chittoor *et al.*, 1997; Egea *et al.*, 2001) e nematóides (Simonetti *et al.*, 2009). O papel das POXs na resposta de defesa da planta é reforçar fisicamente a parede celular com lignina, suberina e outros polissacarídeos, induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que irão servir como catalisadores das modificações da parede celular ou na sinalização, bem como aumentar a produção de fitoalexinas. Assim, a disponibilidade de um gene que codifica uma POX em café induzida pelo ataque de nematóides abre perspectivas interessantes para a obtenção de plantas tolerantes ao ataque de nematóides. Para tal, entretanto, estudos moleculares e funcionais precisam ser empreendidos.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo caracterizar a expressão do gene *CaPOX* por RT-qPCR em raízes de café e de tabaco transgênico inoculadas com nematóide.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Material Vegetal

Para quantificar a expressão relativa do gene *CaPOX* em raízes de café foram utilizadas plantas de *Coffea arabica* de um cultivar susceptível (Mundo Novo) e de outro cultivar resistente (IAC 388-17-1) a nematóides, respectivamente.

Em paralelo foram utilizadas plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) contendo a versão completa do promotor do gene *CaPOX* em fusão transcricional ao gene repórter *uidA* (que codifica a  $\beta$ -glucuronidase; GUS) obtidas por Brandalise (2007). As plantas foram mantidas em casa de vegetação e câmara de crescimento.

### 3.2 Experimento de Infecção vegetal por nematóides e coleta do material

A inoculação das plantas de café foi realizada sob a supervisão da Dra. Mirian Peres Maluf no Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café “Alcides Carvalho”, situado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Foram inoculadas 15 plântulas de café com aproximadamente mil juvenis do nematóide *Meloidogyne exigua* por planta.

Após a inoculação, as raízes foram coletadas nos tempos de 8 horas, 5, 14 e 21 dias, respectivamente. O tempo zero foi coletado antes da inoculação do nematóide. Para cada tempo foram coletadas raízes de três plantas, e em seguida, o pool de raízes foi macerado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C. Foram inoculadas plantas de café nas mesmas condições para servirem como testemunha.

Os experimentos de infecção de tabaco com o nematóide *Meloidogyne javanica* foram realizados sob a supervisão da Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken do Departamento de Produção vegetal - Setor de Defesa Fitossanitária – FCA/UNESP. Foram inoculadas 20 plantas de dois meses de idade com aproximadamente dois mil juvenis de nematóide por planta. As coletas, nesse caso, foram realizadas nos tempos de 8, 16 e 24 horas, respectivamente. O tempo zero foi coletado antes da inoculação do nematóide. Para cada tempo foram coletadas raízes de quatro plantas, e o pool foi então macerado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C. Quatro plantas foram coletadas após quatorze dias para verificação da formação de galhas. Além disso, foram inoculadas plantas de tomate nas mesmas condições para servirem como testemunha.

### 3.3. Extração de RNA total e quantificação.

Amostras de aproximadamente 100 mg de raízes de café maceradas foram coletadas, e em seguida transferidas para tubos de 1,5 ml. O RNA total das amostras foi extraído usando Trizol conforme protocolo descrito pelo fabricante (Invitrogen), e armazenado a -80°C até o momento da síntese de cDNA.

Para a extração de RNA total de tabaco foi utilizado o método CTAB conforme metodologia descrita por Korimbocus *et al.* (2002) (baseado em Chang *et al.*, 1993) com modificações. Para tal, cerca de 100 gramas de tecido vegetal (raízes) macerado em nitrogênio líquido foi solubilizado em 500 µl do tampão de extração CTAB pré-aquecido. Após esse procedimento houve a incubação do material por 30 min a 65°C. Adicionou-se, em seguida, 500 µl de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico - 24:1) e homogeneizou-se a solução com auxílio do vórtex. Centrifugou-se a 10000 rpm por 10 min à 4°C, e coletou-se o sobrenadante, aplicando-se novamente o passo anterior de CIA seguido de uma nova centrifugação. Um volume de cloreto de lítio (LiCl 5M) foi adicionado ao volume de sobrenadante coletado e o RNA total foi precipitado a -20°C durante a noite. Posteriormente centrifugou-se o material a 12000 rpm por 30 min (4°C). O sedimento foi ressuspendido em 200 µl de TE-SDS 1% e adicionado de 100 µl de NaCl 5 M e 300 µl de isopropanol. A amostra foi precipitada durante 30 min a -20°C e centrifugada a 12000 rpm por 20 min (4°C). Logo em seguida foi feita uma lavagem com 1 ml de etanol a 70% seguida de centrifugação a 10000 rpm por 5 min (4°C). Secou-se o sedimento, sendo o mesmo ressuspendido em água DEPC.

O RNA total extraído, de ambas amostras (café e tabaco), foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies).

#### 3.4 Síntese e quantificação de cDNA

Amostras de RNA total (café e tabaco) foram tratadas com a enzima DNase I (Fermentas), a fim de eliminar possível contaminação com DNA genômico durante o

processo de extração. A obtenção de RNA livre de DNA foi feita através da utilização de 1 µg do RNA total, 1 µl de tampão de reação com MgCl<sub>2</sub> (10X; fornecido no kit) e 1 unidade da enzima Deoxyribonuclease I ( 1 U/µl). O volume final da reação foi de 10 µl, completados com água livre de RNase. As amostras foram incubadas em termociclador (PTC 100- Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.) a 37°C por 30 minutos. Após esse período, adicionou-se 1 µl de EDTA 25 mM, a fim de se inibir a reação. As amostras foram então incubadas novamente no termociclador a 65°C por 10 minutos.

A síntese da primeira fita de cDNA, tanto para café como para tabaco, foi realizada empregando-se a enzima Superscript III (Invitrogen) conforme instruções do fabricante, utilizando-se oligo-dT<sub>17</sub>vn (2,5 mM) como iniciador. A quantificação do cDNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies).

### 3.5 Quantificação da expressão relativa por RT-qPCR

Para a quantificação da expressão relativa dos genes- alvo (*CaPox* em café e *Gus* em Tabaco) e dos genes normalizadores [*GAPDH* de café (Barsalobres-Cavallari et al., 2009) e *18S RNA* de tabaco (Levy et al., 2004)] foram utilizados os oligonucleotídeos RTPer, GAPDH, RT Gus e 18S conforme descrito na Tabela 1. Os oligonucleotídeos para *CaPox* e *Gus* foram gerados automaticamente com a utilização do software *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems). Os parâmetros considerados para tal foram: tamanho entre 26 e 30 pb; T<sub>m</sub> ( Temperature of melting) entre 65°C e 70°C; quantidade de CG entre 40 e 60% e tamanho médio dos fragmentos amplificados ente 50 e 105 pb.

Para reação de amplificação foi utilizado o kit Maxima™ SYBR Green /ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas). Adicionou-se ao cDNA das amostras de interesse 6 µl de Maxima™ SYBR Green /ROX qPCR Master Mix (2X); 1,2 µl de cada oligonucleotídeo gene específico (forward e reverse) e água livre de RNase para um volume final de 10 µl de reação. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra e como controle negativo, adicionou-se água livre de RNase ao invés de cDNA, para a garantir ausência de contaminação.

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador óptico (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems). A ciclagem utilizada foi: ciclo inicial de 50°C por 2 minutos para ativação da UDG; 95°C por 2 minutos para desnaturação; seguida de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C. Para quantificação dos dados realizou-se um ciclo suplementar de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C. A análise dos dados foi feita com auxílio do programa 7300 System Software. Ao fim da reação obteve-se a representação gráfica (Amp Plot) e numérica (Ct; Threshold Cycle) que representam o aumento de fluorescência durante os ciclos de amplificação.

O nível de expressão foi calculado com base nos valores de  $\Delta\Delta Ct$  (Livak e Schmittgen, 2001). Tal método baseia-se na reação exponencial da PCR. A expressão  $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que representa o nível da expressão gênica, foi calculada; O valor de  $\Delta\Delta Ct$  representa a diferença entre o  $\Delta Ct$  da amostra de interesse (inoculação num tempo determinado) e o  $\Delta Ct$  da amostra de referência;  $\Delta Ct$  é a diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene controle. É importante ressaltar que o valor Ct representa o ciclo de amplificação exponencial de cada amostra.

Calculou-se a eficiência dos oligonucleotídeos através do programa SAS versão 8e. Para as análises realizadas em café, a eficiência calculada foi de 1,95, e para as análises em tabaco essa eficiência foi igual a 2,0.

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho.

NOME	Sequencia (5'-3')
RTPer	F-GGC ATT AGT TGC CCG TGA TG R-TCG CAT GAT GGT CCC TTA ATC
GAPDH	F-TTG AAG GGC GGT GCA AA R-AAC ATG GGT GCA TCC TTG CT
RT Gus	F- TTG CCA ACG AAC CGG ATA C R-GAG CTG CCT GTA TGT TCC AGT CC
18S	F-AGG AAT TGA ACG GAA GGG CA R-GTG CGG CCC AGA ACA TCT AAG

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 Quantificação da expressão do gene *CaPOX*

A análise da expressão relativa do gene *CaPOX* foi baseada nos valores de delta Ct (Livak e Schmittgen, 2001). Um aumento de 1,1 x na expressão do gene

alvo foi observado em raízes de café do cultivar resistente, inoculadas com nematóide no tempo de 8 horas (Figura 1). No caso do café susceptível, esse aumento na expressão do gene alvo no tempo de 8 horas pós- inoculação foi ainda mais expressivo (2,8 x) (Figura 2). Em contrapartida, em ambos os casos não foi observada variação significativa na expressão do gene *CaPOX* nos tempos amostrais mais tardios (5, 14 e 21 dias pós-inoculação).

Tais dados sugerem que a expressão do gene *CaPOX* não está diretamente envolvida na manifestação da resistência do café a espécie de nematóide empregada. Dessa forma, pode-se inferir que a ativação do referido gene integra-se a uma via metabólica responsiva a infecção que possivelmente envolve outros genes e necessita ser elucidada. Todavia o papel das peroxidases de classe III na resistência das plantas aos nematóides deve ser salientado, já que os estudos realizados por Simonetti et. al. (2009) sugerirem que diferentes peroxidases apoplásticas de trigo, devido à diferente expressão em quantidade e tempo, desempenham diferentes papéis na resposta do trigo à infecção de nematóides.

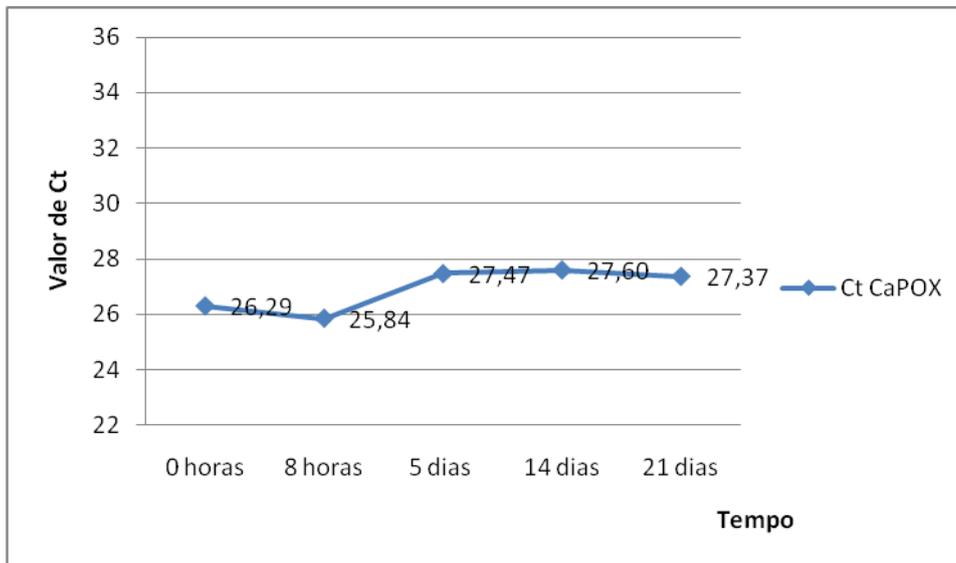


Figura 1: Valores de Ct obtidos durante a amplificação do gene *CaPOX* em raízes inoculadas de café resistente em diferentes tempos amostrais.

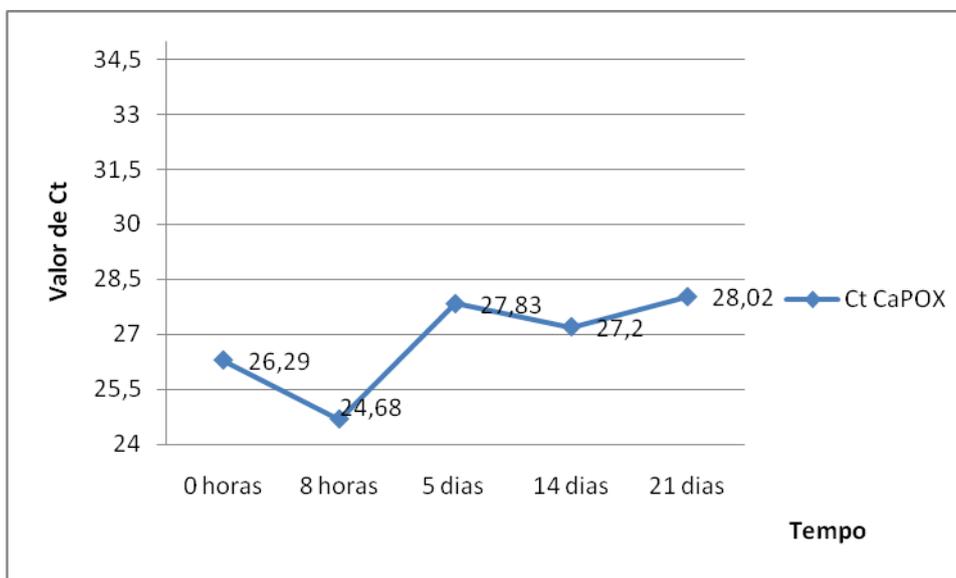


Figura 2: Valores de Ct obtidos durante a amplificação do gene *CaPOX* em raízes inoculadas de café susceptível em diferentes tempos amostrais.

## 4.2 Quantificação da expressão do gene *GUS*

A fim de melhor investigar a regulação da expressão do gene *CaPOX*, optou-se também por utilizar plantas de tabaco transformadas com um cassete de expressão contendo o seu promotor e o gene repórter *GUS*. Nesse caso, a possível ativação do promotor em resposta a inoculação por nematóides foi investigada nos tempos iniciais pós-inoculação, já que em café o pico de expressão é observado no tempo de 8 horas. Os valores de Ct obtidos na amplificação do gene repórter em raízes de tabaco inoculadas indicaram um aumento na expressão de 3,9 x no tempo 16 horas após a inoculação (Figura 3). Por outro lado, no tempo amostral de 24 horas, a expressão do gene alvo foi similar àquela observada no tempo de 8 horas.

Esses dados sugerem que a região promotora clonada e inserida em tabaco é responsiva à infecção pelo nematóide, sendo ativada no início do processo infeccioso. O indicando que o referido promotor contém os elementos regulatórios necessários para ativar a transcrição gênica em resposta ao parasita, o que permite vislumbrar a caracterização funcional destes elementos. Esses dados corroboram ainda a hipótese de que a *CaPox* deve desempenhar um papel na resistência precoce ao nematóide em café, atuando provavelmente em associação com outros genes.

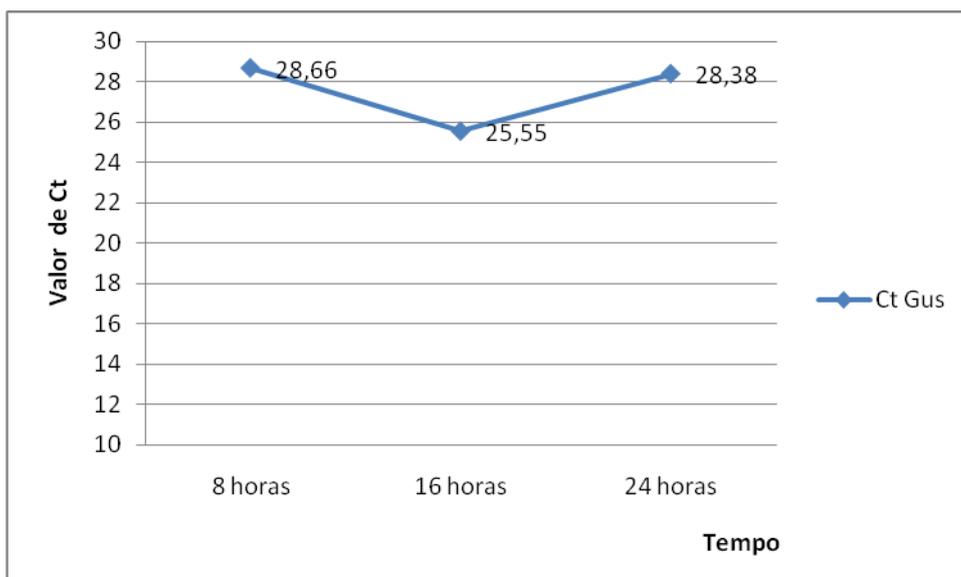


Figura 3: Valores de Ct obtidos durante a amplificação do gene repórter GUS em raízes inoculadas de tabaco transgênico em diferentes tempos amostrais.

## 5. CONCLUSÕES

O gene *CaPOX* tem a sua expressão aumentada em resposta a infecção por nematóides sendo induzido nos tempos iniciais pós-inoculação (8 h).

O promotor do gene *CaPOX* é responsivo a infecção pelo nematóide, sendo induzido nos tempos iniciais pós-inoculação (16 h).

## 6. REFERÊNCIAS

ALTPETER, F., VARSHNEY,A., ABDERHALDEN, O., DOUCHKOV,D., SAUTTER,C., KUMLEHN, J., DUDLER, R., SCHWEIZER,P. Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance. **Plant Molecular Biology**, v.57, p.271–283, 2005.

ANDRADE, A. S.;JAFELICE, R. S. M. A História do Café no Brasil. FAMAT em Revista, Uberlândia, n.4,abr.2005. Disponível em: <<http://www.famat.ufu.br/revista/revistaabril2005/salaaula/EnsinoAdrianoRosana.pdf>>. Acesso em: 06 jul. 2010.

ARAGÃO, F. J. L., SANTOS M. O., MORAIS L. S., ROMANO E. Metodologias para transformação genética de Plantas-Modelo. Circular Técnica 15, ISSN 1516-4349, EMBRAPA, Brasília, DF, 2002.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. ; SEVERINO F. E. ; MALUF M. P. ; MAIA I. G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology** , London, v. 10, p. 1-11,2009.

BRANDALISE, M. Isolamento e caracterização de promotores tecido específico de raiz e folha de *Coffea arabica*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Genética), **Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, SP, p. 141, 2007.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Report**, v. 11, p. 113-116, 1993.

CHITTOOR, J.M.; LEACH, J.E.; WHITE, F.F. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.10, p.861-871, 1997.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO Disponível em:  
<<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/90a470414b206e2314513e20522278aa..pdf>>. Acesso em 03 nov. 2010.

EGEA, C.; AHMED, A.S.; CANDELA, M. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. **J. Plant Physiol.**, v.158, p.151-158, 2001.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Livro do café. Disponível em:<[http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/arq\\_Relat\\_Gestao/Hist%F3rico.pdf](http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/arq_Relat_Gestao/Hist%F3rico.pdf)>. Acesso em: 06 de jul. 2010.

GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B. Nematóides parasitos do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Viçosa, MG: UFV, p.199-268, 2001.

HORSCH R.B., FRY J.E., HOFFMANN N.L., EICHHOLTZ D., ROGERS S.G., FRALEY R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* v.227, p. 1229-1231, 1985.

KORIMBOCUS, J.; COATES, D.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Improved detection of Sugarcane yellow leafvirus using a real-time fluorescent (TaqMan) RTPCR assay. *J. Virol. Methods*, v.103, p.109-120, 2002.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J. *et al.* Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol. Gen. Genet.**, v.261, p.259-266, 1999.

LASHERMES, P.; PACZEK, V.; TROUSLOT, P. *et al.* Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* × *C. canephora*. **J. Hered.**, v.91, p.81-85, 2000.

LEVY, M.; EDELBAUM, O.; SELA, I. Tobacco mosaic virus regulates the expression of its own resistance gene N. **Plant Physiology**, v. 135, p. 2392-2397, 2004.

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SIMONETTI, E.; PASQUA, V.; MELILLO, M.T. *et al.* Analysis of Class III Peroxidase Genes Expressed in Roots of Resistant and Susceptible Wheat Lines Infected by *Heterodera avenae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, p.1081-1092, 2009.

WILLIAMSON, V. M.; HUSSEY, H. R. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 8, p. 1735-1745, 1996.