



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA GIROTTO

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DO PROMOTOR
DO GENE GALACTINOL SINTASE DE *COFFEA* spp.**

LARISSA GIROTTO

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DO PROMOTOR
DO GENE GALACTINOL SINTASE DE *COFFEA* spp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira

Co-orientador: Dr. Tiago B. dos Santos

Londrina
2020

L323 GIROTTI, LARISSA.

Caracterização in silico e in vivo do promotor do gene galactinol sintase de Coffea spp / LARISSA GIROTTI. - Londrina, 2020.
115 f. : il.

Orientador: Luiz Filipe Protasio Pereira Pereira.

Coorientador: Tiago B. dos Santos Santos.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2020.

Inclui bibliografia.

1. café - Tese. 2. promotor - Tese. 3. GolS - Tese. 4. mudanças climáticas - Tese. I. Pereira, Luiz Filipe Protasio Pereira. II. Santos, Tiago B. dos Santos. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

LARISSA GIROTTTO

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DO PROMOTOR
DO GENE GALACTINOL SINTASE DE *COFFEA* spp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira
Embrapa Café

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
Embrapa Agroenergia

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Sandra Maria Bellodi Cação
Tropical Melhoramento e Genética – TMG

Dra. Suzana Tiemi Ivamoto-Suzuki
Universidade Estadual Paulista – Unesp

Londrina, 31 de janeiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Primeiramente, agradeço aos meus irmãos e principalmente aos meus pais, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas, minha opção pela vida em Londrina e pelos momentos de ausência física e emocional. E lá se vão 12 anos. Meu muito obrigada sincero e de coração, Pai (Babi), Mãe (Dadá), Mano (Paulo) e Tatica (Tatiana). E a toda a minha família, cunhada Fer (Fernanda), cunhado Ric (Ricardo) e meus afilhados/sobrinhos Bu (Bruno), Pepe (Pedro), Pá (Paula) e Fefo (Fernando), eu AMO vocês demais!

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pela realização dos experimentos e por toda a infra-estrutura oferecida e à Embrapa Café pelo suporte financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, sendo o presente trabalho realizado com apoio desta agência de fomento, pelo código de Financiamento 001.

Ao meu orientador Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira (Filipe!), pela oportunidade concedida em me orientar, principalmente pelas correções, ensinamentos, força, amizade e por todo o auxílio prestado.

Ao meu co-orientador Dr. Tiago B. dos Santos por todos auxílios prestados ao longo dos 4 anos e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem contribuir com este trabalho.

Aos colegas da LBI (Laboratório de Biotecnologia do Iapar) pela caminhada e ajuda ao longo dos experimentos da tese, as funcionárias: Sueli, Lucinéia e Cícera (Lab. Cultura de Tecidos), e aos colegas: Débora, Mariane, Bruna, Lívia, Dra. Paula, Patrícia e Angelita. Um agradecimento especial a Fernanda Freitas de Oliveira por termos formado o "time da transformação", por toda ajuda ao longo de toda a tese e amizade. A Caroline Aryoshi por estar sempre disponível em ajudar, pelas viagens aos congressos juntas e pela amizade. A Giselly Andrade por sempre

solucionar os problemas e pela amizade. Ao Arthur Cortez por toda a ajuda com a *Arabidopsis*.

A Dra. Suzana Tiemi Ivamoto-Suzuki um agradecimento especial, pela dedicação e ajuda nas análises de RT-qPCR, pelas correções e ajuda imensurável ao longo da tese.

Ao pesquisador do Iapar, Dr. Juarez Pires Tomaz pela concessão das sementes, protocolos e câmara da *Arabidopsis thaliana* para realização desta tese, o meu muito obrigada! E ao Dr. Eduardo Firmino pela concessão da casa de vegetação para o experimento do tabaco.

Ao fotógrafo e amigo Antonio Neto o meu enorme agradecimento, por fazer todas as fotos dos experimentos de *Arabidopsis* com tanto profissionalismo, cuidado, paciência e amizade.

A minha amiga de coração que fiz dentro do LBI, Kelly Pellizzaro, considero minha família em Londrina, que esteve presente nos momentos cruciais desta tese, pelo nosso mate de todos os dias e pelos momentos de força, compreensão, risadas e choros nestes últimos anos.

Agradeço a minhas irmãs de coração de Londrina, Amanda Paiva dos Santos, Noelle Giacomini e Vanessa de Carvalho por serem presentes e fazer a minha vida leve! E as minhas amigas gaúchas em Londrina Ana Paula Fontana Valentini, Mariana Panosso e a japonesa Marcia pela amizade e parceria.

Aos meus colegas do inglês que se tornaram amigos para a vida toda Ana, Fran e Paulo.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida, e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

Por fim, gostaria de agradecer a Deus e ao meu Anjo da guarda por me guiar e iluminar por toda a minha vida.

GIROTTI, Larissa. **Caracterização *in silico* e *in vivo* do promotor do gene galactinol sintase de *Coffea* spp.** 2020. 115 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

RESUMO

O café, é uma das mais importantes *commodities* agrícolas, sendo o Brasil seu maior produtor e exportador. As mudanças climáticas globais têm causado danos a produtividade agrícola cafeeira com impactos econômicos e sociais, incluindo a redução de áreas disponíveis para o plantio de café. Uma das alternativas biotecnológicas para resolver esse problema é produção de cafeeiros geneticamente modificados e tolerantes a estresses abióticos. Diante desse cenário foi investigado o potencial do promotor da galactinol sintase (*GoS*) do gênero *Coffea*, que catalisa a primeira etapa da via de síntese dos oligossacarídeos da família da Rafinose, cujo acúmulo ocorre em resposta a estresses abióticos. Entender a arquitetura dos promotores de café, tornou-se fundamental para modular a regulação da expressão gênica em períodos de estresse abióticos. 10 promotores de *GoS* foram encontrados nos genomas públicos disponíveis de *Coffea* spp. Estes apresentaram 12 diferentes tipos de *cis*-elementos que regulam a resposta gênica e são induzidos por estresses ambientais. Os que mais se destacaram foram *ARE* (indução anaeróbica), *ABRE* e *MYB* (resposta do Ácido abscísico - ABA) e *STRE* (presente nos promotores de genes que são regulados durante o estresse). Após a caracterização dos promotores, um promotor *GoS*, isoforma de *Coffea canephora* (*Cc*), foi selecionado e clonado com o objetivo de verificar a sua expressão em experimentos de estresse abiótico induzido. O promotor *CcGoS3* fusionado ao gene repórter da β -glucuronidase (*GUS*) foi utilizado para transformar *Arabidopsis thaliana*. Para analisar a atividade deste promotor, as plantas transformadas foram submetidas a estresses hídrico, salino e de temperatura. A atividade do gene *GUS* foi analisada histoquimicamente e por RT-qPCR. A coloração histoquímica do gene repórter *GUS* foi verificada em todos os tecidos de *A. thaliana* que possuíam a construção *pCcGoS3::GUS*, provavelmente devido a uma atividade *leaky* do promotor. As análises de RT-qPCR do promotor de *CcGoS3* evidenciou o aumento no número de transcritos de *GUS* em plantas sob estresse hídrico, salino e de frio, mesmo com a presença do *leaky*, comportando-se como um promotor do tipo estresse-induzido e demonstrando o potencial uso do mesmo em projetos futuros de transformação de plantas.

Palavras Chave: café, promotor, *GoS*, mudanças climáticas, bioinformática

GIROTTI, Larissa. **In silico and in vivo characterization of galactinol synthase promoter in *Coffea* spp.** 2020. 115 p. Thesis (PhD in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2020.

ABSTRACT

Coffee is one of the most important agricultural commodities, and Brazil is its largest producer and exporter. Global climate change has damaged coffee agricultural productivity with economic and social impacts, including the reduction of areas available for coffee planting. One of the biotechnological alternatives to reduce this problem is genetically modified coffee to be tolerant to abiotic stress. In this scenario, the potential of the galactinol synthase (*GoIS*) promoter of *Coffea* spp., which catalyzes the first step of raffinose family oligosaccharides biosynthesis, whose accumulation occurs mainly in response to abiotic stresses. Understanding the structure and composition of coffee promoter gene sequences is of fundamental to better understand the genetic mechanisms and processes of gene expression regulation induced in periods of drought and salt stress. We analysed 10 *GoIS* promoters present in the public genomes of *Coffea arabica*, *C. canephora* and *C. eugenioides*. Those promoters presented, 12 *cis*-elements related to gene regulation in response to adverse conditions, including *ARE* (anaerobic induction), *ABRE* and *MYB* (abscisic acid response - ABA) and *STRE* (present in promoters that are regulated during stress). Subsequently *in silico* characterization of *C. canephora* *CcGoIS3* was performed and this promoter was cloned in order to verify its role against abiotic stresses. Plasmids containing the *pCcGoIS3::GUS* construction (β -glucuronidase reporter gene) were used to transform *Arabidopsis thaliana* to analyze *GoIS* promoter activity under stress. Transformed plants were subjected to water deficit, salt and temperature stresses experiment. Activity of *GUS* reporter gene was analyzed histochemically and by RT-qPCR. Histochemical staining of *GUS* reporter gene was verified in all *A. thaliana* tissues in plants containing *pCcGoIS3::GUS* construct, probably due to a leaky activity. RT-qPCR analyzes of *CcGoIS3* promoter showed an increase in the number of *GUS* transcripts in plants under drought, saline and cold stress, even with the leaky effect, demonstrating its potential use as stress-induced promoter for future plant genetic engineering transformation projects.

Key Words: coffee, promoter, *GoIS*, climate change, bioinformatics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura de um promotor gênico e seus elementos.....	25
Figura 2.	Fatores de transcrição envolvidos no estresse hídrico, nos mecanismos ABA dependente e ABA-independente e seus cis-elementos.....	30
Figura 3.	Via biossintética do galactinol, rafinose e estaquiose em plantas.....	31

Capítulo 1.

Figure 1.	Phylogenetic analysis of <i>Go/Ss</i> protein sequences. The tree was built with the MEGA X program using the Neighbor-Joining method, bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates.....	50
Figure 2.	Graphical representation of the number of regulatory motifs predicted in the <i>Go/S</i> promoters regions. Promoters were grouped according to their related functions provided by PlantCARE database.....	51
Figure 3.	<i>Cis</i> -acting elements in the main <i>Go/S</i> promoter. Proximal locations of the transcriptional regulatory elements.....	54
Figure 4.	Venn diagrams showing the similarity of cis-elements observed among <i>Go/S</i> promoter region of <i>Coffea</i> spp. Genomes.....	55
Figure S1.	Sequence of <i>Go/S</i> promoter A - <i>C. arabica</i> (Ca), B – <i>C. canephora</i> (Cc) and C – <i>C. eugenoides</i> (Ce) and its multiple <i>cis</i> -acting regulatory motifs (boxes) identified using the PlantCARE software.....	78

Capítulo 2.

Figura 1.	Representação esquemática do T-DNA do plasmídeo pCAMBIA1381 para transformação das plantas de <i>A. thaliana</i> via <i>A. tumefaciens</i>	82
Figura 2.	Transformação de <i>A. thaliana</i> com o plasmídeo pCcGoIS3::GUS.....	85
Figura 3.	(a) Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão com as enzimas de restrição. (b) Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR obtidos a partir do par de primers GUS.....	92
Figura 4.	Produto amplificado por PCR de plantas de <i>A. thaliana</i> T0 regeneradas <i>in vitro</i> em meio seletivo contendo Higromicina.....	93

Figura 5.	Seleção de plantas T3 em placas com meio MS suplementado com o agente seletivo higromicina (30 mg.L-1).....	94
Figura 6.	Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase (<i>GUS</i>) em plantas de <i>A. thaliana</i>	95
Figura 7.	Expressão de <i>GUS</i> dirigida pelo promotor do gene <i>CcGoIS3</i> de <i>Coffea</i> no experimento de desidratação em temperatura ambiente, sobre um papel filtro	95
Figura 8.	Plantas geneticamente modificadas de <i>A. thaliana</i> com a construção <i>pCcGoIS3::GUS</i> , submetidas à desidratação em temperatura ambiente	96
Figura 9.	Expressão relativa do gene <i>GUS</i> com o promotor <i>CcGoIS3</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> submetidas a desidratação em filtros de papel	97
Figura 10.	Plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> com a construção <i>pCcGoIS3::GUS</i> , em cultivo <i>in vitro</i> e submetidas ao estresse hídrico <i>in vitro</i> (PEG).....	99
Figura 11.	Expressão relativa do gene <i>GUS</i> com o promotor <i>CcGoIS3</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> submetidas a desidratação <i>in vitro</i> com PEG.....	100
Figura 12.	Plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> com a construção <i>pCcGoIS3::GUS</i> , em cultivo <i>in vitro</i> e submetida ao NaCl em diferentes concentrações	101
Figura 13.	Expressão relativa do gene <i>GUS</i> com o promotor <i>CcGoIS3</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> submetidas a estresse salino <i>in vitro</i>	102
Figura 14.	Plantas de <i>A. thaliana</i> , retiradas do cultivo <i>in vitro</i> e submetida à estresse de frio.....	103
Figura 15.	Expressão relativa do gene <i>GUS</i> com o promotor <i>CcGoIS3</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> submetidas a estresse de frio	103
Figura 16.	Plantas de <i>A. thaliana</i> com um mês de idade, retiradas do cultivo <i>in vitro</i> e submetida à aclimação em diferentes temperaturas.....	104
Figura 17.	Expressão relativa do gene <i>GUS</i> com o promotor <i>CcGoIS3</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> submetidas a aclimação a baixas temperaturas	105

Figura suplementar

Figura 1.	Mapa do vetor pCAMBIA1381	115
-----------	---------------------------------	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Galactinol sintase descritas em diferentes espécies de plantas.....32

Capítulo 1.

Table 1. GolS gene protein sequence used for phylogenetic tree. Results highlighted in gray are the genes (promoters) identified in this work49

Table 2. List of cis-elements involved in defense and stress response observed in the promoter regions of Coffea GolS genes.....52

Table 3. Stress related number of cis-elements in Coffea GolS gene promoters53

Table S1. Description of cis-elements presented in coffee GolS promoters and related to defense and stress response.....67

Table S2. Characterization of putative cis-elements identified in *C. canephora*, *C. arabica* and *C. eugenioides* promoters regions by Venny.....71

Table S3. Identification of putative cis-elements present in the *C. canephora*, *C. arabica* and *C. eugenioides* promoters identified by the PlantCARE software.....76

Capítulo 2.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para a PCR83

Tabela 2. Sequências dos primers usados nas análises de RT-qPCR90

Tabela 3. Proporção de segregação dos eventos de *A. thaliana*, na geração T193

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BT	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Controle
<i>C. arabica</i> (Ca)	<i>Coffea arabica</i>
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor
CAREs	<i>Cis-acting regulatory elements</i>
<i>CaSMP</i>	<i>Coffea arabica seed maturation protein gene</i>
<i>C. canéfora</i> (Cc)	<i>Coffea canephora</i>
cDNA	DNA complementar
<i>C. eugenioides</i> (Ce)	<i>Coffea eugenioides</i>
cm	Centrímetro
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
CRE	<i>cis-regulatory elements</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
EtBr	Brometo de etídeo
GA	Giberelina
<i>GalS</i>	Galactinol sintase
<i>GUS</i>	gene repórter β -glucuronidase
ha	Hectares
KB	Kilobase
L	Litro
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MPa	megapascal
MS	Meio Murashige e Skoog
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NOS	Terminador da <i>nopalina sintase</i>

ONU	Organização das Nações Unidas
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PlantCARE	Plant <i>Cis</i> -Actin Regulatory Element
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
RFOs	Oligossacarídeos da família das rafinose
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time
s	Segundo
T-DNA	DNA transferido da <i>Agrobacterium</i> ao vegetal infectado
TF	Fator de transcrição
TRE	Trealose
TSS	<i>Transcription start site</i> (Sítio de início da transcrição)
TUB	Tubulina
UBQ10	Ubiquitina
uL	Microlitro
uM	Micromolar
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
	Objetivo Geral.....	18
	Objetivos Específicos	18
1.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
1.2.1	Histórico E Importância Econômica Do Café.....	19
1.2.2	Características Morfológicas E Genética De Cafeeiros.....	20
1.2.3	Impacto Das Mudanças Climáticas Em Cafeeiros.....	20
1.2.4	Engenharia Genética E A Utilização De Promotores Como Ferramentas Para O Melhoramento Genético De Cafeeiros.....	23
1.2.5	Promotores Constitutivos	25
1.2.6	Promotores Específicos.....	26
1.2.7	Elementos Cis-Regulatórios E Motivos Conservados Presentes Nas Regiões Promotoras Dos Genes.....	29
1.2.8	Galactinol Sintase.....	30
1.3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
2	CAPÍTULO 1: In silico characterization of galactinol synthase promoters in <i>Coffea</i> spp. (submitted to Genetics and Molecular Biology)	43
2.1	INTRODUCTION	44
2.2	MATERIAL AND METHODS.....	46
2.2.1	Gols Genes Annotation Procedures	46
2.2.2	Phylogenetic Analyses Of Coffee <i>Gols</i> Genes	46
2.2.3	<i>Gols</i> Genes And Their Respective Promoters Region Identification In <i>Coffea</i> Spp Databases	47
2.2.4	Characterization Of Coffee <i>Gols</i> Genes Promoters.....	47
2.3	RESULTS.....	48
2.3.1	<i>Gols</i> Genes Identification, Annotation And Phylogenetic Analyses	48
2.3.2	In Silico Investigation Of <i>Cis</i> -Elements In Promoter Regions	50
2.3.3	Conserved Sequence Analysis.....	54
2.4	DISCUSSION	57
2.5	CONCLUSION	59
2.6	REFERENCES	60

3	CAPÍTULO 2. Caracterização <i>in vivo</i> do promotor do gene galactinol sintase de <i>Coffea canéfora</i>	79
3.1	INTRODUÇÃO	80
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	82
3.2.1	Localização Experimental.....	82
3.2.2	Construção Do Vetor Plasmidial E Transformação De <i>E. Coli</i> E <i>A. Tumefaciens</i>	82
3.2.3	Transformação Genética De <i>Arabidopsis Thaliana</i>	83
3.2.4	Seleção Das Sementes Transformadas	85
3.2.5	Caracterizações Moleculares De Eventos Transformados.....	86
3.2.6	Ensaio Histoquímico De Gus.....	86
3.2.7	Experimentos De Simulação De Estresse Abiótico	87
3.2.7.1	Experimento 1 – desidratação	87
3.2.7.1.1	<i>Desidratação in vivo</i>	87
3.2.7.1.2	<i>Desidratação in vitro</i>	87
3.2.7.2	Experimento 2 - estresse salino <i>in vitro</i>	88
3.2.7.3	Experimento 3 – estresse frio	88
3.2.7.4	Experimento 4 - aclimatação a baixas temperaturas.....	88
3.2.8	Extração do RNA e Síntese De cDNA.....	89
3.2.9	PCR Quantitativo Em Tempo Real	90
3.2.10	Análise Estatística	91
3.3	RESULTADOS.....	91
3.3.1	Verificação Dos Plasmídeos.....	91
3.3.2	Transformações De <i>A. Thaliana</i>	92
3.3.3	Ensaio Histoquímico De GUS	94
3.3.4	Resultados Dos Experimentos De Estresses Abióticos.....	96
3.3.4.1	Experimento 1.1 – desidratação <i>in vivo</i>	96
3.3.4.2	Experimento 1.2 – desidratação <i>in vitro</i>	97
3.3.4.3	Experimento 2 - estresse salino <i>in vitro</i>	100
3.3.4.4	Experimento 3 – estresse frio	102
3.3.4.5	Experimento 4 - aclimatação a baixas temperaturas.....	104
3.4	DISCUSSÃO	106
3.5	CONCLUSÕES	109
3.6	REFERÊNCIAS.....	110

1 1 INTRODUÇÃO

2 O café é uma das principais *commodities* agrícolas dos países em
3 desenvolvimento, sendo o Brasil seu maior produtor e exportador. O gênero *Coffea*
4 pertence à família Rubiaceae e inclui 124 espécies (DAVIS; DAVIS; GARDENS,
5 2011), com especial relevância comercial para *C. arabica* e *C. canephora*.

6 O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, a previsão para a
7 safra de 2019 foi estimada em 57,2 a 62,02 milhões de sacas de café beneficiado,
8 onde serão 45,93 milhões de café arábica e 16,04 milhões serão de *Coffea canephora*
9 (CONAB, 2020).

10 Dentre os estresses que mais influenciam no desenvolvimento vegetal, está o
11 estresse hídrico, que exerce uma influência prejudicial para a planta, afetando funções
12 fisiológicas e bioquímicas em todas as fases de crescimento do cafeeiro. No Brasil, a
13 combinação de altas temperaturas e escassez de recursos hídricos poderá diminuir
14 consideravelmente o cultivo nos principais Estados produtores, como Minas Gerais e
15 São Paulo. E também nas novas plantações de café que se estabeleceram no
16 nordeste e norte do Brasil, nos Estados da Bahia (arábica) e Rondônia (robusta).
17 Assim, as secas severas incidentais causam impactos sobre a cafeicultura brasileira
18 (DA MATTA E RAMALHO, 2006; MISHRA; SLATER, 2012; BAUMANN, 2015).

19 Desta forma, as mudanças climáticas globais podem ocasionar a redução em
20 áreas disponíveis para plantio do gênero *Coffea*, diminuir a produtividade agrícola e
21 causar impactos econômicos e sociais (SEMEDO et al., 2018). O relatório do Painel
22 Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas da ONU, revela que um aumento
23 estimado da temperatura média global de 1,8°C maior que a atual, pode reduzir as
24 áreas destinadas ao cultivo do grão, especialmente de *C. arabica*, que responde por
25 65 a 70% da demanda global (IPCC, 2015). Esse impacto de mudanças vai atingir o
26 globo como um todo (DAMATTA et al., 2010; IPCC, 2015; SEMEDO et al., 2018).

27 Diante disso, a transformação genética visando aumentar a tolerância das
28 plantas ao estresse hídrico é uma das estratégias que pode ser empregada frente a
29 esse cenário de mudanças climáticas (HUANG et al., 2019). Para tanto, a descoberta
30 e caracterização de genes e promotores relacionados a resposta aos estresses
31 abióticos é importante, para o sucesso do desenvolvimento destes trabalhos
32 (MUKHERJEE et al., 2019; NAKASHIMA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI,
33 2014).

1 Cada gene nas plantas é regulado por uma região promotora única e é de
2 fundamental interesse a compreensão sobre promotores específicos (PORTO et al.,
3 2014). Os promotores específicos obtidos dentro da mesma família de café, são uma
4 estratégia desejável para direcionar a expressão do transgenes para órgãos e tecidos
5 específicos, e/ou em resposta a estresses bióticos ou abióticos (DEY et al., 2015).

6 Um dos mecanismos de proteção aos estresses abióticos, é o acúmulo dos
7 oligossacarídeos da rafinose (RFOs), no qual a galactinol sintase (*Go/S*), é um dos
8 principais genes envolvidos na biossíntese de RFOs (SENGUPTA et al., 2015).
9 Estudos diversos, apontam para um aumento significativo em resposta a estresses
10 abióticos dos genes *Go/S* (DOS SANTOS et al., 2011; SENGUPTA et al., 2015;
11 IVAMOTO et al., 2017).

12 Neste trabalho, foi realizado a caracterização de 10 promotores do gene *Go/S*,
13 de *Coffea* spp. Foi realizada uma busca *in silico* dos genes *Go/S* em três bancos públicos
14 de *Coffea* (*C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*). A região promotora de cada
15 um dos *Go/S* encontrados foi caracterizada e os seus respectivos *cis*-elementos foram
16 identificados. Os principais *cis*-elementos encontrados nos promotores *Go/S* de
17 *Coffea* spp. envolvidos na regulação da transcrição de genes envolvidos nas
18 respostas de defesa e estresse nas plantas foram analisadas.

19 O promotor *CcGo/S3* foi escolhido e clonado, posteriormente fusionado com o
20 gene *GUS* (*CcGo/S3::GUS*) para testarmos o seu potencial como promotor induzido
21 por estresse abiótico.

22 Em seguida, plantas de *A. thaliana* foram transformadas com a utilização do
23 promotor *CcGo/S3::GUS*, isoforma de *C. canephora*, fusionados ao gene repórter
24 *GUS*. Verificou-se a expressão histoquímica e de atividade transcricional do gene
25 *GUS* nas plantas de *A. thaliana* transformadas e submetidas a experimentos de
26 estresse hídrico, salino e de temperatura, para verificar a atividade do promotor e
27 correlacionar um papel de tolerância desse promotor quando exposto a situações de
28 estresses.

1 1.1 OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

3 Caracterizar *in silico* e *in vivo* os promotores do gene da galactinol sintase em *Coffea*
4 spp.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6 - Analisar *in silico* e caracterizar as sequências dos promotores de *GoIS* identificados
7 no genoma de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides*;

8 - Caracterizar os *cis*-elementos presentes nos promotores dos genes de *GoIS*
9 envolvidos nos mecanismos de resposta das plantas a estresses;

10 - Obter plantas geneticamente modificadas de *A. thaliana* com a construção
11 *CcGoIS3::GUS*;

12 - Caracterizar *in vivo* a expressão histoquímica e a atividade transcricional da
13 construção *CcGoIS3::GUS* em plantas transgênicas de *A. thaliana* submetidas a
14 tratamentos de estresses abióticos.

1 1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 1.2.1 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CAFÉ

3 O cafeeiro tem a Etiópia como o seu centro de origem e diversidade, sendo que
4 o café é uma das bebidas mais apreciadas internacionalmente (TAKAHASHI; TODO,
5 2017). O primeiro uso do café começou há muito tempo pelos aborígenes, na África
6 (TEKETAY, 1999). Primeiramente, foram utilizadas várias partes do cafeeiro como
7 folhas, frutos e sementes (CECAFE, 2018). Como os frutos maduros do café são
8 vermelhos e com polpa doce, contendo o estimulante cafeína, é mais provável que
9 eles tenham atraído a atenção das pessoas como fonte de comida na época
10 (CECAFE, 2018).

11 A história sobre a primeira domesticação do cafeeiro na Etiópia é incerta e não
12 tem uma data esclarecida, mas historiadores alegam que os invasores etíopes
13 levaram o café para a Arábia no século VI (TEKETAY, 1999). Também existem
14 evidências escritas de um cultivo extensivo do café na Península Arábica (Iêmen) por
15 volta do século XII e no Brasil, relatos e registro sobre a planta datam o ano de 1727,
16 no Pará, onde um oficial do exército brasileiro trouxe os frutos provenientes da Guiana
17 Francesa e assim começou a primeira fazenda de café (TEKETAY, 1999). Anos mais
18 tarde, em 1770, começaram as buscas pelo melhor habitat para o cafeeiro no Brasil,
19 desta forma o café chegou aos arredores do município do Rio de Janeiro (TEKETAY,
20 1999; (BAUMANN, 2015).

21 Atualmente, o café é produzido em mais de 80 países tropicais e é apreciado
22 pelo sabor característico, aroma e efeitos estimulantes da cafeína (AERTS; HONNAY,
23 2015; SEMEDO et al., 2018). É uma bebida apreciada e consumida no mundo inteiro
24 como uma das bebidas mais populares (UN; CAO, 2018) e a produção mundial em
25 2019 foi de 29,01 milhões de sacas (MILDS; MILDS, 2020).

26 O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, a previsão para a
27 safra de 2019 foi estimada em 57,2 a 62,02 milhões de sacas de café beneficiado,
28 onde serão 45,93 milhões de café arábica e 16,04 milhões serão de *C. canephora*
29 (CONAB, 2020). Minas Gerais é o estado que concentra a maior área cultivada com
30 café arábica, aproximadamente 1,2 mil hectares (ha), isso corresponde a 70% da área
31 ocupada com esta espécie, em âmbito nacional, com 32,08 milhões de sacas. Em
32 segundo lugar o estado de São Paulo ocupa uma área total com café arábica de 215
33 mil ha, correspondendo a 12% da área ocupada. Em sequência, o estado do Espírito

1 Santo tem área total estimada é de 171,1 mil hectares, na Bahia 87,8 mil ha e no
2 Paraná 40,8 mil ha. Para o *C. canephora*, no Espírito Santo está a maior área, 256,55
3 mil ha, seguido de Rondônia, com 83,34 mil ha e logo após, a Bahia, com 50,1 mil ha
4 (CONAB, 2019).

5 1.2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E GENÉTICA DE CAFEEIROS

6 O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae e inclui 124 espécies (DAVIS;
7 DAVIS; GARDENS, 2011), com especial relevância para *C. arabica* ($2n = 4x = 44$,
8 alotetraplóide, autógama) e *C. canephora* ($n = 2x = 22$, diploide, alógama), que
9 correspondem a cerca de dois terços e um terço da produção mundial,
10 respectivamente (MILDS, 2019). Estudos citogenéticos e moleculares apontam que
11 *C. eugenoides* e *C. canephora* são os progenitores prováveis de *C. arabica*
12 (LASHERMES et al., 1999; VIDAL et al., 2010; YU et al., 2011).

13 *C. canephora* é utilizada principalmente para produção dos cafés solúveis,
14 participando com mais de 80% na composição deste, seus grãos possuem alto teor
15 de cafeína e menor aroma (SOUZA et al., 2004). Entre as variedades de *C. canephora*,
16 mais empregadas, está a variedade Robusta que apresentam maior porte e vigor e a
17 variedade Conilon, que possuem um porte de árvore mais compacta (CARNEIRO et
18 al., 2015). A diversidade genética natural encontrada em *C. canephora* oferece um
19 potencial para a detecção de novas variantes genéticas relacionadas à adaptação à
20 seca (SOUZA et al., 2004; CARNEIRO et al., 2015).

21 No trabalho de Guedes et al. (2018) foi confirmado a ocorrência de uma
22 memória transcricional, que pode ser definida como a estrutura, modificações
23 genéticas e bioquímicas resultantes de uma exposição ao estresse que permite que
24 as plantas “lembrem” de eventos ambientais passados (FLETA-SORIANO et al.,
25 2015). Desta forma podem modular, a expressão de genes responsivos à seca e
26 contribui para a tolerância à seca em *C. canephora* (cv. Conilon - clone 120). Além
27 deste, vários estudos têm buscado aumentar a compreensão da maior tolerância à
28 seca em *C. canephora* quando comparada ao *C. arabica* (ALVES et al., 2017; DE
29 AQUINO et al., 2018; TORRES et al., 2019).

30 1.2.3 IMPACTO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS EM CAFEEIROS

31 As mudanças climáticas determinam fortemente a produtividade agrícola e
32 causam impactos econômicos e sociais, desta forma, pesquisas se tornam cada vez

1 mais necessárias nos setores da biotecnologia, ecofisiologia e melhoramento vegetal
2 (ALTIERI; NICHOLLS, 2017). Ensaios que envolvam a aclimação das culturas para
3 superar períodos de temperaturas mais elevadas, principalmente devido a episódios
4 de seca, que vão se tornar mais frequentes e intensos, devem ser realizados.
5 Portanto, a busca e o desafio para aumentar a produção agrícola mundial, com o uso
6 consciente e sustentável da água e sustentabilidade, será a obtenção de culturas mais
7 adaptadas e/ou tolerantes a esses ambientes (DAMATTA et al., 2010; SEMEDO et
8 al., 2018).

9 O relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas da ONU,
10 revela que um aumento estimado da temperatura média global de 1,8°C maior que a
11 atual, pode reduzir as áreas destinadas ao cultivo do grão, especialmente de *C.*
12 *arabica*, que responde por 65 a 70% da demanda global (IPCC, 2015). Esse impacto
13 de mudanças vai atingir o globo como um todo (IPCC, 2015; SEMEDO et al., 2018).

14 Nos próximos anos, as mudanças climáticas poderão afetar muitas culturas,
15 principalmente de árvores tropicais como o cafeeiro, em cerca de 50% nos cenários
16 atuais, sendo os impactos mais altos em regiões produtoras de baixas latitudes e
17 altitudes (CAMARGO, 2010). As maiores regiões de produção de café do mundo,
18 como o Brasil e o Vietnã, podem passar por reduções na área disponível para plantio
19 (BUNN et al., 2015).

20 Dentre os estresses que mais influenciam o desenvolvimento vegetal, está o
21 déficit hídrico, que exerce uma influência prejudicial para a planta, afetando funções
22 fisiológicas e bioquímicas (LESK; ROWHANI; RAMANKUTTY, 2016). As plantas para
23 superar os períodos adversos, desencadeiam uma série de respostas que envolvem
24 cascatas de transcrição e interações entre proteínas, que causam uma mudança em
25 toda a fisiologia, crescimento e desenvolvimento vegetal (YAMAGUCHI-SHINOZAKI;
26 SHINOZAKI, 2006; LIU; PENG; DAI, 2014).

27 No Brasil, a combinação de altas temperaturas e escassez de recursos hídricos
28 diminuiu consideravelmente o cultivo nos principais Estados produtores, como Minas
29 Gerais e São Paulo, assim como nas novas plantações de café nos estados da Bahia
30 (arábica) e Rondônia (robusta) (BAUMANN, 2015). Secas severas incidentais causam
31 impacto sobre a cafeicultura brasileira (BAUMANN, 2015). Portanto, o café sofre com
32 secas severas, e a diminuição de áreas cultiváveis, não só no Brasil e globalmente,
33 pode se tornar um grande problema, de acordo com as estimativas futuras
34 (CAMARGO, 2010; DAMATTA et al., 2010; BUNN et al., 2015).

1 O estresse hídrico prejudica as plantas de café em todas as fases de
2 desenvolvimento (DAMATTA; RAMALHO, 2006). Além disso, a produção e a
3 qualidade do café são altamente dependentes de uma sequência regular de eventos
4 climáticos como a temperatura e disponibilidade de água adequada durante o seu
5 ciclo de desenvolvimento (VAN DER VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER, 2015).
6 Cafeeiros sobre estresse hídrico apresentam sintomas de murcha e desfolha, morte
7 das raízes e dos ramos, e quando mais severo pode levar a deficiência nutricional da
8 planta (DAMATTA; RAMALHO, 2006; VAN DER VOSSSEN; BERTRAND; CHARRIER,
9 2015).

10 Mofatto et al. (2016) descreveu que durante uma seca severa, a floração pode
11 ser afetada, levando ao aborto de frutos, e sob condições extremas pode causar a
12 morte das plantas. A seca também afeta o crescimento vegetativo, estimula a
13 senescência precoce das folhas e o vigor, aumentando indiretamente a incidência de
14 pragas e doenças no cafeeiro (ALVES et al., 2017). Notavelmente, a seca é o principal
15 estresse ambiental que afeta a produção de café na maioria das áreas de cultivo,
16 causando diminuições acentuadas no rendimento, de até 80% em anos muito secos,
17 em regiões marginais sem irrigação (BERTRAND et al., 2016).

18 O estresse hídrico, provocado pela escassez e irregularidade das chuvas, e
19 agravado pelas condições de elevadas temperaturas, também causa sérios danos às
20 lavouras de café na fase de formação e enchimento de grãos, ocasionando perdas
21 produtivas de 15 a 30%, conforme o tipo da lavoura e do solo (SEMEDO et al., 2018).

22 O estresse salino também tem impacto na cultura do café (ACOSTA-MOTOS
23 et al., 2017), onde pode causar efeitos adversos no metabolismo e conseqüentemente
24 aumenta o estresse hídrico nas plantas, por diminuir o potencial hídrico (NEGRÃO;
25 SCHMÖCKEL; TESTER, 2016). A salinidade limita a produtividade das culturas em
26 muitas áreas do mundo (ZHU, 2016). O estresse salino também afeta o crescimento
27 das mudas de café (DA SILVA TEMOTEO et al., 2015). No trabalho de Dos Santos et
28 al (2011) foi demonstrado que a alta expressão do mRNA dos genes da galactinol
29 sintase (*GoS*) e o acúmulo elevado de rafinose detectada nas folhas de café
30 submetidas à estresse salino, sugerem que a família dos oligossacarídeos da rafinose
31 (RFO) pode ter um papel importante no aumento da tolerância das plantas a esse
32 estresse.

33 Os estresses causados por baixas temperaturas podem influenciar
34 negativamente a cultura do café (PARTELLI et al., 2010; BATISTA-SANTOS et al.,

1 2011), em alguns estados produtores no Brasil. Baixas temperaturas representam
2 uma grande restrição ambiental que limita o crescimento e o desenvolvimento das
3 plantas (ZHU, 2016). No cafeeiro, causa danos nas folhas e nos frutos nos anos de
4 ocorrência, podendo afetar as produções subsequentes (BATISTA-SANTOS et al.,
5 2011), assim o uso de cultivares mais tolerantes ao frio, podem amenizar estes
6 períodos, nas mais diversas culturas.

7 1.2.4 ENGENHARIA GENÉTICA E A UTILIZAÇÃO DE PROMOTORES COMO 8 FERRAMENTAS PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DE CAFEEIROS

9 O uso da engenharia genética para introduzir características agrônômicas de
10 interesse em plantas perenes, que possuem período juvenil longo, através de técnicas
11 que facilitem e acelerem a obtenção, seleção e avaliação de materiais superiores é de
12 grande importância (ISIK et al., 2015). A produção de plantas tolerantes à seca
13 capazes de crescer sobre regimes hídricos restritos, sem perdas de rendimento, tem
14 a capacidade de minimizar consideravelmente os danos relacionados com a seca e
15 garantir a produção de alimentos em regiões com menor disponibilidade hídrica
16 (RIBAS et al., 2011; LI et al., 2019).

17 Estudos com o objetivo de introduzir novos genes nas mais diversas culturas e
18 o desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético, integrando o
19 melhoramento convencional e a transformação genética são de fundamental
20 importância para o futuro do planeta (MISHRA; SLATER, 2012; ZIEMIENOWICZ,
21 2014). A transformação genética oferece interessantes perspectivas para
22 desenvolvimento de cultivares de café tolerantes a estresses bióticos e abióticos, em um
23 curto espaço de tempo (DÉCHAMP et al., 2015), pois é uma ferramenta que auxilia nos
24 programas de melhoramento, uma vez que introduz características desejáveis no
25 genoma existente e preserva a identidade genética das plantas.

26 Regiões promotoras gênicas, genes e/ou fatores genéticos associados com uma
27 determinada característica fenotípica de interesse agrônômico são de vital importância
28 para a aplicação prática destas ferramentas no melhoramento genético do cafeeiro e a
29 criação de genótipos elite (DÉCHAMP et al., 2015; KAUSCH et al., 2019).

30 Cada gene nas plantas é regulado por uma região promotora única. Os
31 promotores são regiões não codificadoras de proteínas, localizados a montante ou
32 acima (“*upstream*”) do sítio de início da transcrição (*Transcription start site* (TSS)) dos
33 genes e exibem elementos de DNA conservados que, juntamente com os fatores de

1 transcrição, são importantes reguladores da supressão ou ativação da expressão
2 gênica em diferentes tecidos, órgãos ou de acordo com diferentes estádios de
3 desenvolvimento da planta (ZOU et al., 2011; LONG; PRESCOTT; WYSOCKA, 2016;
4 ESMAEILI et al., 2017). Os promotores contêm sítios de ligação para os fatores de
5 transcrição e possuem os sítios de ligação para os complexos de proteínas de RNA
6 polimerases, que é a enzima responsável e necessária pela transcrição gênica
7 (LEWIN, 2001).

8 Os promotores em geral, podem ser divididos em três partes (Figura 1). A
9 primeira está localizada a montante do início da transcrição do gene e é chamada de
10 Promotor principal ou central (*Core promoter*), onde está localizado o TATA-Box,
11 (aproximadamente 30 pb) que foi o primeiro elemento identificado em eucariotos e o
12 único elemento que tem uma localização relativamente fixa em relação ao TSS
13 (BREATHNACH; CHAMBON, 1981). Também, estão presentes os elementos
14 promotores CCAAT-box (conhecido por controlar a iniciação da transcrição) a
15 aproximadamente 100 pb do local do iniciação da transcrição dos genes (MOLINA;
16 GROTEWOLD, 2005; PORTO et al., 2014). Ainda nesta parte da região promotora se
17 encontram iniciadores, a RNA polimerase e fatores gerais de transcrição formados por
18 proteínas que se ligam para facilitar a ligação entre a RNA polimerase e o DNA (DEY
19 et al., 2015).

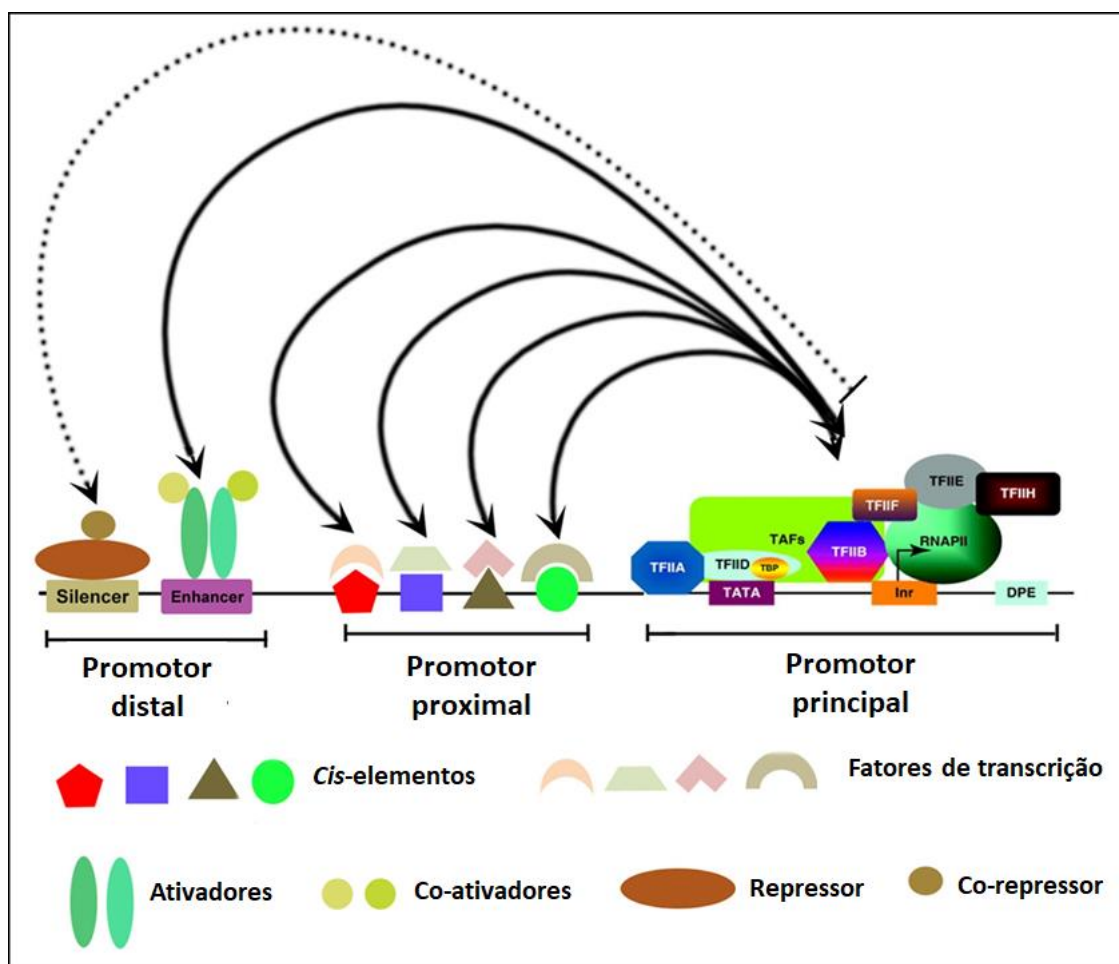
20 A segunda região é denominada Promotor Proximal (*Proximal promoter*) que
21 contém os principais elementos regulatórios, como por exemplo, os sítios específicos
22 para fatores de transcrição e *cis*-elementos que contribuem para a regulação da
23 expressão gênica (PORTO et al., 2014; DEY et al., 2015).

24 O Promotor Distal (*Distal promoter*) contém sequencias regulatórias adicionais
25 como os silenciadores e os *enhancers* (potencializadores). Ativadores, co-ativadores,
26 repressores e co-repressores que se relacionam com a maquinaria transcricional
27 ativando ou reprimindo a transcrição (SOLOVYEV; SHAHMURADOV, 2003; DEY et
28 al., 2015).

29 Um dos métodos adequados para a validação de promotores é a fusão dos
30 mesmos com um gene repórter, possibilitando a fácil análise da expressão desses
31 genes (HELLENS; MULLINEAUX, 2000; LEE; GELVIN, 2008). Construções contendo
32 promotor::gene repórter são rotineiramente usados para indicar regulações temporais
33 e espaciais da expressão gênica (NAKAGAWA et al., 2007). Três classes de gene
34 repórter são mais comumente utilizados em estudos que visam a caracterização das

1 atividades de um promotor, β -glucuronidase (*GUS* - *uidA*), *Green fluorescent protein*
 2 (*GFP*) e luciferase (*LUC*) (DE RUIJTER et al., 2003; KAVITA; BURMA, 2008; XIONG
 3 et al., 2016).

4 Figura 1. Estrutura de um promotor gênico e seus elementos.



5 Fonte: Adaptado de DEY et al. (2015).

6 1.2.5 PROMOTORES CONSTITUTIVOS

7 Os promotores constitutivos direcionam e ativam a expressão do gene na
 8 maioria dos órgãos e tecidos durante os estádios de desenvolvimento de um
 9 organismo (PARK et al., 2010; PORTO et al., 2014). Esses promotores têm sido
 10 usados e estudados em larga escala e são importantes ferramentas biotecnológicas
 11 para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PORTO et al., 2014).

12 Shimada et al. (2014) demonstrou que promotores constitutivos apresentam um
 13 alto nível de conservação nas suas sequências, com *cis*-elementos TTGACA (-35) e
 14 TATAAT (-10) separados por em torno de 17 pares de bases. O promotor 35S, com
 15 origem do vírus do mosaico da couve-flor (*CaMV*), é o mais comumente utilizado

1 desde o início dos estudos para pesquisa básica (SOMSSICH, 2019). Possui a função
2 de dirigir a expressão dos transgenes de forma constitutiva, e também é utilizado para
3 produção comercial. Isso se deve aos seus subdomínios serem amplamente
4 caracterizados (HUSSAIN et al., 2018; ODELL; NAGY; CHUA, 1985).

5 Cultivares comerciais já foram lançadas com o promotor 35S, como exemplo
6 soja, milho e algodão Roundup Ready (resistência ao herbicida glifosato) e a soja BT
7 – Intacta RR2 PRO (resistência a lagartas) ambos comercializados pela empresa
8 Monsanto. No entanto, segundo Porto et al. (2014) a expressão do promotor 35S é
9 frequentemente baixa em tecidos reprodutivos, portanto, isso limita o seu uso em
10 eventos onde é necessário a proteção contra ataques de insetos ou patógenos. Além
11 disso, a questão do custo energético para a planta manter a expressão de uma
12 proteína em todos os estádios de desenvolvimento (WU et al., 2018; PANDEY et al.,
13 2019).

14 1.2.6 PROMOTORES ESPECÍFICOS

15 Os promotores específicos, são ativados e desativados por fatores de
16 transcrição, dependendo das condições *in vivo* (HERNANDEZ-GARCIA; FINER,
17 2014). Estes promotores merecem destaque, pois permitem uma expressão
18 direcionada dos genes e representam uma estratégia desejável na engenharia
19 genética para a expressão gênica específica em órgãos e tecidos, ou em resposta a
20 determinados tipos de estresses (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014; SHIMADA et
21 al., 2014).

22 Esse tipo de promotor evita a expressão constitutiva de um gene, que
23 geralmente é obtida por promotores convencionais, como o 35S, promotor mais
24 utilizados em cafeeiros até o presente momento (RIBAS; PROTASIO PEREIRA;
25 VIEIRA, 2006; MISHRA; SLATER, 2012; DINH; KANG, 2017).

26 Promotores estresse-induzido de plantas foram isolados e validados
27 funcionalmente (*PgApx*, *PgDhn*, *PgHsc70*, *PgLea*, *PgHsp10*), através da
28 transformação de tabaco com o gene *GUS* (DIVYA K. et al., 2017). Estes promotores
29 foram identificados e os *cis*-elementos analisados, e identificou-se que vários
30 elementos encontrados eram induzidos por estresse e específicos para determinados
31 tecidos. Os mesmos autores constataram respostas específicas dos promotores
32 *PgHsc70* (altas temperaturas), *PgDhn* (calor, frio e seca), *PgApx* (estresse hídrico),

1 *PgLea* (calor e seca) e *PgHsp10* (calor, frio, sal e tratamentos de estresse hídrico)
2 para as mais diversas situações de estresse abiótico.

3 Quintero et al. (2018), desenvolveu um trabalho com o promotor específico,
4 isolado do gene *CaSMP*, identificados em sementes de *C. arabica*. Foi identificado a
5 presença de *cis*-elementos envolvidos na expressão específica de sementes e
6 endospermas a montante do gene *CaSMP*. O promotor *CaSMP* foi fusionado ao gene
7 repórter *GUS*, e sua atividade específica foi confirmada em óvulos de frutos de tomate.
8 Os mesmos autores indicaram que o promotor *CaSMP* pode ser usado para direcionar
9 a expressão do transgene em grãos de café e sementes de tomate, assim, se torna
10 uma ferramenta biotecnológica promissora (QUINTERO et al., 2018).

11 Nessa mesma linha de busca de promotores específicos para determinado
12 tecido, um estudo caracterizou um promotor do gene *nsLTP* (proteínas não
13 específicas de transferência de lipídios) que está presente principalmente durante o
14 desenvolvimento inicial do endosperma (COTTA et al., 2014). Foi comprovado que
15 *nsLTP* atua como promotor grão específico em plantas de tabaco transgênico (COTTA
16 et al., 2014).

17 Em um trabalho com promotor fruto-específico (SILVA, 2012), foram
18 caracterizados três promotores de genes de expansinas de cafeeiro (*CaEXPA1*,
19 *CaEXPA2* e *CaEXPA3*), relacionadas com o alongamento e expansão inicial dos
20 frutos. *Cis*-elementos regulatórios destes promotores estiveram em maior número,
21 relacionados a luminosidade, e também em resposta ao ABA (ácido abscísico) e GA
22 (giberelinas) (SILVA, 2012).

23 Em um trabalho com transformação de tabaco (*N. tabacum*) foi apontado que
24 três promotores (*HP15*, *HP16* e *HP17*) do gene *CcDREB1D* encontrados em clones
25 de *C. canephora* tolerantes à seca, demonstraram atividades de regulação em
26 resposta a estresses abióticos (DE AQUINO et al., 2018). A expressão dos promotores
27 foi detectada através da análise histoquímica do gene repórter *GUS* em experimentos
28 de estresse hídrico, choque térmico e tratamentos a frio (DE AQUINO et al., 2018).

29 A caracterização de promotores específicos, em café, é de grande interesse,
30 pois podem se tornar ferramentas de engenharia genética para expressão específica
31 de características agrônômicas desejáveis (PORTO et al., 2014). O uso de promotores
32 induzidos por seca, calor e frio e que promovam expressão de genes relacionados
33 com a tolerância a esses estresses, é de importância para o desenvolvimento de

1 alternativas biotecnológicas, visando amenizar problemas relacionados com as
2 mudanças climáticas (DAMATTA et al., 2010; WYDRA, 2018).

3 Além disso, o uso de novos promotores específicos obtidos dentro da mesma
4 família das plantas de café, para o controle da expressão do transgene, pode facilitar
5 o processo de aceitação dos órgãos reguladores de organismos geneticamente
6 modificados (OGMs) e da percepção pública visando a comercialização do produto
7 final (ALMEIDA et al., 2008; PORTO et al., 2014).

8 Desta forma, com os promotores específicos, onde estes podem ser elaborados
9 por um rearranjo de seus *cis*-elementos (*motifs*), de acordo com uma posição, tipo e
10 número de cópias destes elementos, construir cassetes de expressão com a finalidade
11 de obter níveis desejados de expressão gênica, seria uma estratégia interessante para
12 a engenharia genética de plantas (KASSAW et al., 2018).

13 Com o conhecimento das regiões promotoras e a ferramenta de edição gênica
14 CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), pode-se
15 modificar com precisão e projetar culturas melhoradas a nível molecular (HAQUE et
16 al, 2018). Por meio da indução de mutações em regiões de um gene para minimizar a
17 expressão, reprimi-lo totalmente (knock-out) ou super expressá-lo (LIU et al., 2017;
18 OSAKABE et al., 2016).

19 Assim, CRISPR/Cas9, é um método para gerar mutações direcionadas nos mais
20 diferentes tipos de plantas (BELHAJ et al., 2015). Em café, os principais objetivos do uso
21 desta tecnologia estão relacionados com o desenvolvimento de cultivares com
22 resistência a pragas e doenças, tolerância a seca e ao frio e ao aumento da qualidade
23 da bebida, características estas que levam muitos anos para serem incorporadas através
24 das técnicas de melhoramento genético convencional (KOROTKOVA; GERASIMOVA;
25 KHLESTKINA, 2019).

26 Em café, um estudo inicial comprovou o conceito do uso desta tecnologia, com o
27 uso do gene do *Phytoene desaturase* (*CcPDS*), através da técnica de transformação via
28 *Agrobacterium tumefaciens*, assim o método CRISPR/Cas9 foi eficiente e confiável para
29 silenciar genes de interesse agrônômico em café (BREITLER et al., 2018). No estudo
30 de Shi et al. (2017), através da utilização do sistema CRISPR/Cas9, recentes avanços
31 na geração de plantas tolerantes à seca foram obtidos para a cultura do milho. Com o
32 uso de um promotor nativo (*GOS2*) e um regulador negativo das respostas do etileno
33 (*ARGOS8*), os eventos *ARGOS8* gerados, aumentaram o rendimento de grãos sob
34 condições de estresse, sem apresentar perda de rendimento (SHI et al., 2017). O

1 sistema CRISPR/Cas9 foi eficaz na geração de novas variações alélicas para as
2 novas plantas de milho, tolerantes à seca (SHI et al., 2017).

3 1.2.7 ELEMENTOS CIS-REGULATÓRIOS E MOTIVOS CONSERVADOS 4 PRESENTES NAS REGIÕES PROMOTORAS DOS GENES

5 As sequências regulatórias *cis*, conhecidas como *cis-regulatory elements* (CRE)
6 ou *Cis-acting regulatory elements* (CAREs), presente na sequência dos promotores e
7 que antecedem as regiões codificadoras de proteínas (genes), são responsáveis pela
8 regulação espacial (tecido-específico) e temporal (estádio desenvolvimento da planta-
9 específico) da expressão gênica (ONG; CORCES, 2011).

10 Os CREs são pequenas sequências de DNA (aproximadamente 5 a 25 pb), não
11 codificantes e compreendem sítios de ligação para os fatores de transcrição (TFs) e
12 também, para outras moléculas reguladoras que são necessárias para ativar e realizar
13 a transcrição. Nas regiões promotoras, os CREs são parte integrante dos genes,
14 regulam a expressão temporal e estão geralmente localizados perto do local do início da
15 transcrição (TSS) dos genes nas plantas (CHANDLER; VAUCHERET, 2001;
16 WITTKOPP; KALAY, 2012).

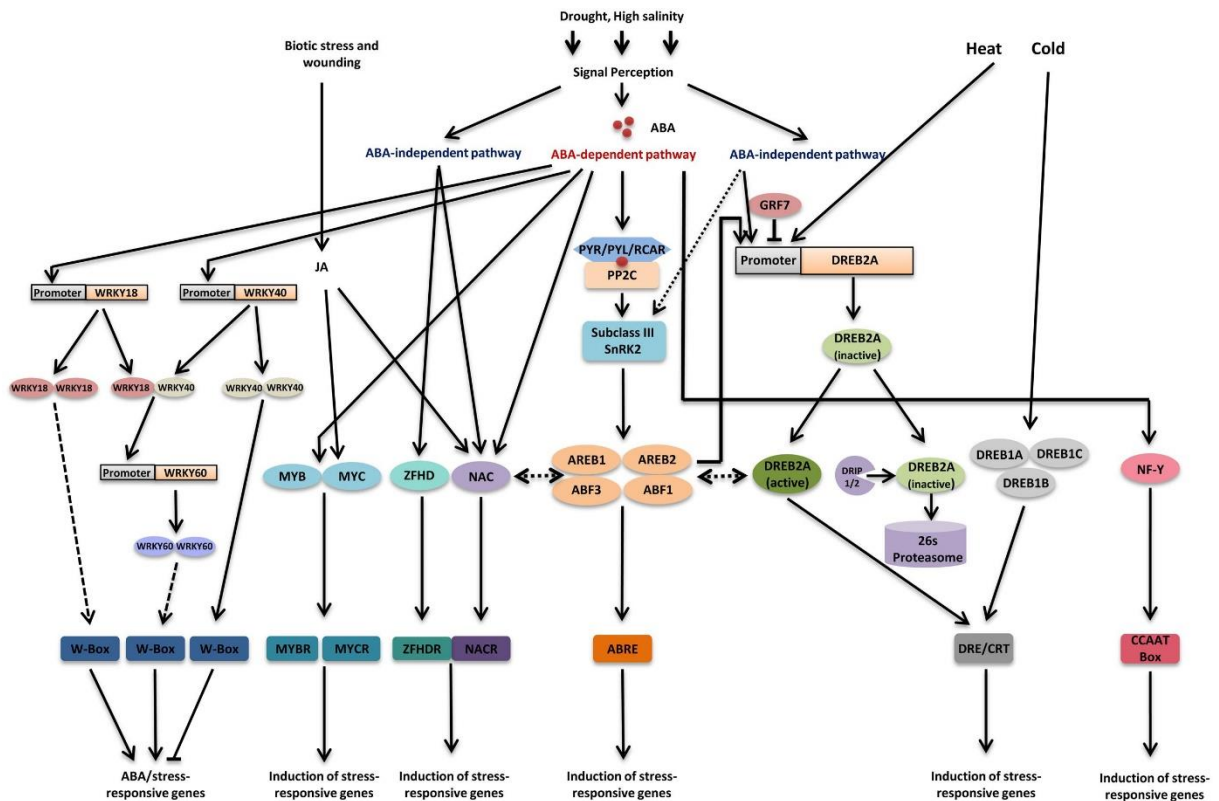
17 Através das técnicas de sequenciamento de DNA foram descobertas alterações
18 genéticas e mutações nos mais diversos genomas e algumas destas estão associadas
19 aos CREs, onde essas mudanças colaboram para uma maior diversidade fenotípica
20 dentro e entre as espécies (WITTKOPP; KALAY, 2012).

21 Os CREs e motivos (*motifs*) conservados presentes nos promotores gênicos
22 relacionados com o déficit hídrico são comumente descritos na literatura como
23 responsivos à seca, e atuam independentemente do ácido abscísico (ABA) e
24 apresentam os motifs *drought-responsive elements* (DRE) e *C-repeat* (CRT) (JAIN et
25 al., 2018). Além disso, nos promotores em geral se encontram sequências conservadas
26 de 9 pb (TACCGACAT) e foram descritos como *cis*-elementos responsivos à seca
27 (*drought-responsive cis-element*) (LIU; PENG; DAI, 2014) (Fig. 2).

28 *Cis*-elementos que atuam pela via dependente do ABA contém o motif *abscisic*
29 *acid-responsive element* (ABRE), com uma sequência conservada de 8 pb
30 (ACGTGG/TC) (BUSK, 1997; ZHANG et al., 2005). Os motivos MYC (CANNTG), MYB
31 (C/TAACNA/G), *early responsive to dehydration1* (ERD1) e CCAATbox são
32 comumente presentes nos promotores de genes envolvidos nos mecanismos de

1 resposta à seca (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014; NAKASHIMA; YAMAGUCHI-
2 SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2014; WYDRA, 2018) (Fig. 2).

3 Figura 2. Fatores de transcrição envolvidos no estresse hídrico, nos mecanismos ABA
4 dependente e ABA-independente e seus *cis*-elementos.



5
6 Fonte: SINGH, LAXMI, (2015).

7 1.2.8 GALACTINOL SINTASE

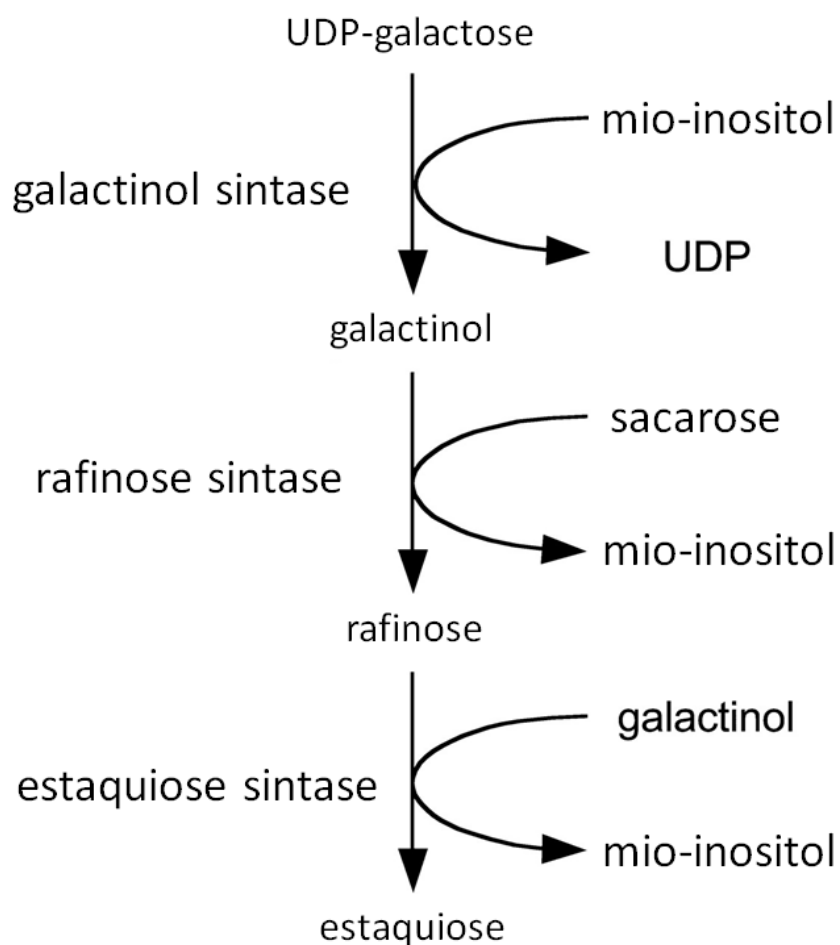
8 A utilização de osmoprotetores, é uma das estratégias para aumentar a tolerância
9 ao estresse hídrico, por exemplo, através do aumento da produção de prolina, ácido γ -
10 aminobutírico (GABA), betaína glicina (GB), frutanos, amido, mono e dissacarídeos,
11 trealose (Tre) e os oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) (WYDRA, 2018).

12 Os RFOs representados pela galactinol, estaquiose e verbascose, exercem um
13 papel importante na tolerância da planta a estresses abióticos, e sua via metabólica
14 de síntese já está bem estabelecida (SENGUPTA et al., 2015; IVAMOTO et al., 2017).
15 A galactinol sintase (EC 2.4.1.123 - *Go/S*) é a primeira enzima da via de biossíntese
16 de RFOs, responsável pela formação do galactinol, a partir da união das moléculas
17 de UDPG- galactose e mio-inositol (SENGUPTA et al., 2015). Galactinol é
18 posteriormente convertido para rafinose e, em seguida, para estaquiose com as

1 reações catalisadas pela rafinose sintase e estaquiose sintase, respectivamente (Fig.
2 3) (NISHIZAWA; YABUTA; SHIGEOKA, 2008; SENGUPTA et al., 2015).

3 Os RFOs, juntamente com o gene da galactinol sintase, já foram identificados em
4 diferentes espécies de plantas (Tabela 1) e descritos como genes relacionados ao
5 aumento da tolerância a estresses abióticos.

6 Figura 3. Via biossintética do galactinol, rafinose e estaquiose em plantas.



7

Fonte: Adaptado de NISHIZAWA; YABUTA; SHIGEOKA (2008).

1 Tabela 1. Galactinol sintase descritas em diferentes espécies de plantas.

Identificação de <i>Go/S</i>	Espécies	Referências
<i>AtGo/S</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(TAJI et al., 2012; JANG et al., 2018)
<i>BnGo/S1 – 20</i> e <i>NtGo/S1 - 9</i>	<i>Brassica napus</i> e <i>N. tabacum</i>	(FAN et al., 2017)
<i>CaGo/S1, 2 e 3</i>	<i>C. arabica</i>	(DOS SANTOS et al., 2011)
<i>CaGo/S 2, 3, 4, 8, 9</i>	<i>C. arabica</i>	(IVAMOTO et al., 2017)
<i>CcGo/S1</i>	<i>C. canephora</i>	(DOS SANTOS et al., 2015)
<i>GmGo/S2</i>	<i>Glycine max</i>	(CHU; BUFFEL MELANIE, 2018)
<i>LcGo/S1 e 2</i>	<i>Lens culinaris</i> Medik.	(KANNAN et al., 2016)
<i>MdGo/S1 – 8</i>	<i>Malus domestica</i> Borkh	(FALAVIGNA et al., 2018)
<i>MaGo/S1 – 4</i>	<i>Musa acuminata</i>	(DOLCIMASCULO et al., 2018)
<i>PsGo/S</i>	<i>Pisum sativum</i> L.	(LAHUTA et al., 2014)
<i>PtGo/S</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	(ZHOU et al., 2014)
<i>SlGo/S1 - 4</i> e <i>BdGo/S1 e 2</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Brachypodium distachyon</i>	(FILIZ; OZYIGIT; VATANSEVER, 2015)
<i>SmGo/S1, 2 e 3</i>	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	(WANG et al., 2012)
<i>VvGo/S1</i>	<i>Vitis vinifera</i>	(PILLET et al., 2012)
<i>ZmGo/S1</i>	<i>Zea mays</i>	(ZHOU et al., 2012)

2 Fonte: Elaboração própria autora.

3 Plantas de *Arabidopsis* geneticamente modificadas expressando o gene *Go/S* de
4 *Glycine max* L. (*Go/S2*) demonstraram que este gene pode ser um potencial candidato
5 para melhorar a tolerância ao estresse abiótico em plantas de soja (CHU et al., 2018). O
6 acúmulo de rafinose está relacionado a proteção e manutenção das células em fases de
7 dessecação e tolerância em períodos de estresse (SENGUPTA et al., 2015).

8 Oito genes *MeGo/S* foram isolados do genoma da mandioca (*Manihot esculenta*
9 Crantz), e através do estudo dos *cis*-elementos em seus promotores, identificou-se que
10 todos os genes de *MeGo/S* atuam como elementos relacionados a hormônios, estresse
11 e tecidos específicos em diferentes graus (LI et al., 2018). Os mesmos autores
12 observaram que estes genes exibem padrões diferentes de expressão em vários
13 tecidos, indicando uma provável diversidade de funções. *MeGo/S1* e *MeGo/S3–6* são
14 altamente expressos em folhas e *MeGo/S3–6* são altamente expressos em raízes (LI et
15 al., 2018).

16 Em *Oryza sativa*, duas isoformas do gene *Go/S* (*OsGo/S*) foram utilizadas para
17 estudos de estresse abiótico (MUKHERJEE et al., 2019). Após as análises dos genes e
18 dos promotores *Go/S*, verificou-se que existe um controle transcricional e pós-
19 transcricional, para regular a expressão de *Go/S* sob condições de estresse e está ligada
20 à síntese de RFOs (MUKHERJEE et al., 2019).

21 Em um estudo com grão de bico (*chickpea*) (*CaGo/S*), foi evidenciado a atividade
22 de *Go/S*, e o teor de galactinol e rafinose, e os resultados apontaram para um aumento
23 significativo em resposta a estresses abióticos (SALVI; KAMBLE; MAJEE, 2018).
24 Segundo os autores, a caracterização destes promotores apontou a presença de *cis*-

1 elementos reguladores nas regiões 5'-upstream, como ABRE (ACGTGG/TC), DRE
2 (ACCGACAT), *heat stress responsive element* (AAAAAATTT) e *E-box element*
3 (CANNTG) (SALVI; KAMBLE; MAJEE, 2018).

4 Um estudo anterior mostrou as diferenças no padrão transcricional dos genes
5 *Go/S* em plantas de *C. canephora* e um acúmulo diferencial de RFOs durante
6 experimentos de déficit hídrico, fornecendo uma visão mais aprofundada sobre os
7 mecanismos moleculares envolvidos na tolerância à seca (DOS SANTOS et al., 2011).
8 A expressão específica de *CcGo/S* foi detectada predominantemente nos tecidos de
9 folhas e raízes. Esta descoberta sugere a possibilidade de utilização deste promotor
10 como parte de uma estratégia biotecnológica para melhorar a tolerância à estresses
11 em plantas de café (DOS SANTOS et al., 2011).

12 A descoberta e caracterização de promotores nativos e que conferem alto nível
13 de expressão, em plantas geneticamente modificadas, fusionados com o gene de
14 interesse, deve contribuir para a pesquisa básica, aplicada e para o avanço das
15 ferramentas de pesquisa disponíveis para o melhoramento genético (HERNANDEZ-
16 GARCIA; FINER, 2014; XIONG et al., 2016; PANDEY et al., 2019). Portanto, trabalhos
17 sobre o promotor *Go/S* pode auxiliar a compreensão de como as plantas respondem
18 a condições de estresse.

19

1 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 ACOSTA-MOTOS, J. R. et al. Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms.
3 **Agronomy**, v. 7, n. 1, 2017.
- 4 AERTS, R.; HONNAY, O. Protecting coffee from intensification Measuring merit : Take
5 the risk Protecting coffee from intensification. **Science**. n. JANUARY, 2015.
- 6 ALMEIDA, D. et al. Prospecção de promotores tecido-específico em Café. Brasília:
7 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Comunicado Técnico**, 187. 5 p. 2008.
- 8 ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. I. The adaptation and mitigation potential of traditional
9 agriculture in a changing climate. **Climatic Change**, v. 140, n. 1, p. 33–45, jan. 2017.
- 10 ALVES, G. S. C. et al. Differential fine-tuning of gene expression regulation in coffee
11 leaves by *CcDREB1D* promoter haplotypes under water deficit. **Journal of**
12 **Experimental Botany**, v. 68, n. 11, p. 3017–3031, 2017.
- 13 BATISTA-SANTOS, P. et al. The impact of cold on photosynthesis in genotypes of
14 *Coffea* spp.—Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene
15 expression. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 8, p. 792–806, 2011.
- 16 BAUMANN, T. Espresso Coffee – Chapter 2: The Plant. **Elsevier**. p. 21–86. 2015.
- 17 BELHAJ, K. et al. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. **Current Opinion in**
18 **Biotechnology**, v. 32, p. 76–84, 2015.
- 19 BERTRAND, B. et al. Healthy Tropical Plants to Mitigate the Impact of Climate
20 Change---As Exemplified in Coffee. In: TORQUEBIAU, E. (Ed.). **Climate Change and**
21 **Agriculture Worldwide**. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 83–95, 2016.
- 22 BREATHNACH, R.; CHAMBON, P. Organization and Expression of Eucaryotic Split
23 Genes Coding for Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 349–383,
24 1 jun. 1981.
- 25 BREITLER, J. C. et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the
26 potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and**
27 **Organ Culture**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2018.
- 28 BUNN, C. et al. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and
29 Robusta coffee. **Climatic Change**, v. 129, n. 1–2, p. 89–101, 2015.
- 30 BUSK;, P. K. A. B. J. M. P. Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic
31 acid responsive gene rab 17 from Maize. **The Plant Journal**, 1997.
- 32 CAMARGO, M. B. P. DE. THE IMPACT OF CLIMATIC VARIABILITY AND CLIMATE
33 CHANGE ON ARABIC COFFEE CROP IN BRAZIL (1). **Bragantia**, v. 69, n. 1, p.
34 239–247, 2010.
- 35 CARNEIRO, F. A. et al. Genome wide association study for drought tolerance and

- 1 other agronomic traits of a *Coffea canephora* population. 2015. In : The 12th
2 Solanaceae Conference. **INRA**, Résumé, p. 59. 2015.
- 3 CECAFE – Conselhos dos exportadores de café do Brasil. 2018. Disponível em:
4 <<https://www.cecafe.com.br/sobre-o-cafe/historia-do-cafe/>> Acesso em: 21/03/2018.
- 5 CHANDLER, V. L.; VAUCHERET, H. Gene Activation and Gene Silencing. **Plant**
6 **Physiology**, v. 125, n. 1, p. 145-148, 2001.
- 7 CHU, D. H.; BUFFEL MELANIE, T. D. LE. Functional characterisation of a soybean
8 galactinol synthase gene under various stress conditions. **Vietnam Journal of**
9 **Science, Technology and Engineering**, v. 60, p. 33–36, 2018.
- 10 CONAB, C. N. D. A.-. Acompanhamento da safra brasileira. 2018. – Brasília: Conab,
11 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>. Acesso em: 10
12 jan. 2019.
- 13 CONAB, C. N. D. A.-. Acompanhamento da safra brasileira. 2019. – Brasília: Conab,
14 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>. Acesso em: 12
15 maio. 2019.
- 16 CONAB, C. N. D. A.-. Acompanhamento da safra brasileira. 2019. – Brasília: Conab,
17 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>. Acesso em: 21
18 fevereiro. 2020.
- 19 COTTA, M. G. et al. Lipid transfer proteins in coffee: Isolation of *Coffea* orthologs,
20 *Coffea arabica* homeologs, expression during coffee fruit development and promoter
21 analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, v. 85, n. 1–2, p. 11–
22 31, 2014.
- 23 DAMATTA, F. M. et al. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality.
24 **Food Research International journal**. v. 43, p. 1814–1823, 2010.
- 25 DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on 45
26 coffee physiology and production: a review. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 18, n. 1, p. 55–46
27 81, 2006.
- 28 DA SILVA TEMOTEO, A. et al. Crescimento de cultivares de cafeeiro conilon
29 submetidas ao estresse salino-hídrico. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 2, p. 46–56, 2015.
- 30 DAVIS, A. P.; DAVIS, A. P.; GARDENS, R. B. *Psilanthus mannii*, the type species of
31 *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. **Nordic Journal of Botany**. v.29 p. 471–472, 2011.
- 32 DE AQUINO, S. O. et al. Functional analysis of different promoter haplotypes of the
33 coffee (*Coffea canephora*) *CcDREB1D* gene through genetic transformation of
34 *Nicotiana tabacum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 2, p. 279–294,
35 2018.
- 36 DE RUIJTER, N. C. A. et al. Evaluation and Comparison of the *GUS*, *LUC* and *GFP*
37 Reporter System for Gene Expression Studies in Plants. **Plant biol (Stuttg)**, v. 5, n.

- 1 02, p. 103–115, 2003.
- 2 DÉCHAMP, E. et al. Coffee (*Coffea arabica* L.). In: WANG, K. (Ed.). **Agrobacterium**
3 **Protocols**: Volume 2. New York, NY: Springer New York. p. 275–291, 2015.
- 4 DEY, N. et al. Synthetic promoters in planta. **Planta**, v. 242, n. 5, p. 1077–1094, 2015.
- 5 DINH, S. N.; KANG, H. An endoplasmic reticulum-localized *Coffea arabica* BURP
6 domain-containing protein affects the response of transgenic Arabidopsis plants to
7 diverse abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 11, p. 1829–1839, 2017.
- 8 DIVYA, K. et al. Isolation and characterization of stress inducible promoters from
9 *Pennisetum glaucum* and their role in abiotic stress adaptation. In: **Inter-Drought V.**
10 p. 201, 2017.
- 11 DOLCIMASCULO, F. et al. A genome-wide analysis of the galactinol synthase gene
12 family in banana (*Musa acuminata*). **Colloquium Agrariae**, v. 14, n.3, p. 01-11, 2018.
- 13 DOS SANTOS, T. B. et al. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea*
14 *arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses.
15 **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 441–448, 2011.
- 16 DOS SANTOS, T. B. et al. Galactinol synthase transcriptional profile in two genotypes
17 of *Coffea canephora* with contrasting tolerance to drought. **Genetics and Molecular**
18 **Biology**, v. 38, n. 2, p. 182–190, 2015.
- 19 ESMAEILI, F. et al. In silico search and biological validation of microRNAs related to
20 drought response in peach and almond. **Functional and Integrative Genomics**, v.
21 17, n. 2–3, p. 189–201, 2017.
- 22 FALAVIGNA, V. DA S. et al. Evolutionary diversification of galactinol synthases in
23 Rosaceae: adaptive roles of galactinol and raffinose during apple bud dormancy.
24 **Journal of Experimental Botany**, n. January, 2018.
- 25 FAN, Y. et al. Genome-wide identification, evolutionary and expression analyses of the
26 galactinol synthase gene family in rapeseed and tobacco. **International Journal of**
27 **Molecular Sciences**, 2017.
- 28 FILIZ, E.; OZYIGIT, I. I.; VATANSEVER, R. Genome-wide identification of galactinol
29 synthase (*GoS*) genes in *Solanum lycopersicum* and *Brachypodium distachyon*.
30 **Computational Biology and Chemistry**, v. 58, p. 149–157, 2015.
- 31 FLETA-SORIANO, E.; PINTÓ-MARIJUAN, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Evidence of
32 Drought Stress Memory in the Facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: Possible Role of
33 Phytohormones. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–12, 2015.
- 34 GUEDES, F. A. DE F. et al. Transcriptional memory contributes to drought tolerance
35 in coffee (*Coffea canephora*) plants. **Environmental and Experimental Botany**,
36 2018.

- 1 HAQUE, E. et al. Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the
2 Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects,
3 and Challenges. **Front Plant Sci.** 2018.
- 4 HELLENS, R.; MULLINEAUX, P. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends**
5 **in Plant Science**, v. 5, n. 10, p. 446–451, 2000.
- 6 HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; FINER, J. J. Identification and validation of promoters
7 and *cis*-acting regulatory elements. **Plant Science**, v. 217–218, p. 109–119, 2014.
- 8 HUANG, J. et al. OsRhoGAP2 promoter drives inflorescence-preferential expression
9 and confers responses to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis. **Acta**
10 **Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 5, p. 67, 2019.
- 11 HUSSAIN, A. et al. Salt stress tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) expressing
12 *AtDREB1A* gene under inducible or constitutive promoters. **Biologia (Poland)**, v. 73,
13 n. 1, p. 31–41, 2018.
- 14 ISIK, F. et al. Chapter Three - Acceleration of Forest and Fruit Tree Domestication by
15 Genomic Selection. In: PLOMION, C.; ADAM-BLONDON, A.-F. (Eds.). . Land Plants -
16 Trees. **Advances in Botanical Research**. [s.l.] Academic Press, v. 74 p. 93–124,
17 2015.
- 18 IVAMOTO, S. T. et al. Transcriptome Analysis of Leaves, Flowers and Fruits Perisperm
19 of *Coffea arabica* L. Reveals the Differential Expression of Genes Involved in Raffinose
20 Biosynthesis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169595, 2017.
- 21 JAIN, A. et al. Abiotic Stress Response in Plants:A *Cis*-Regulatory Perspective. In:
22 ZARGAR, S. M.; ZARGAR, M. Y. (Eds.). Abiotic Stress-Mediated Sensing and
23 Signaling in Plants: An Omics Perspective. **Springer**. p. 183–205, 2018.
- 24 JANG, J.-H. et al. *Arabidopsis* galactinol synthases 1 (*AtGOLS1*) negatively regulates
25 seed germination. **Plant Science**, v. 267, p. 94–101, 2018.
- 26 KANNAN, U. et al. Differential expression of two galactinol synthase isoforms *LcGo/S1*
27 and *LcGo/S2* in developing lentil (*Lens culinaris* Medik. cv CDC Redberry) seeds. **Plant**
28 **Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 422–433, 2016.
- 29 KASSAW, T. K. et al. Plant Science Engineering synthetic regulatory circuits in plants.
30 **Plant Science**, n. January, p. 0–1, 2018.
- 31 KAUSCH, A. P. et al. Edit at will: Genotype independent plant transformation in the era
32 of advanced genomics and genome editing. **Plant Science**, v. 281, p. 186–205, 2019.
- 33 KAVITA, P.; BURMA, P. K. A comparative analysis of green fluorescent protein and β -
34 *glucuronidase* protein-encoding genes as a reporter system for studying the temporal
35 expression profiles of promoters. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 3, p. 337–343,
36 2008.
- 37 KOROTKOVA, A.; GERASIMOVA, S.; KHLESTKINA, E. Current achievements in

- 1 modifying crop genes using CRISPR/Cas system. **Vavilov Journal of Genetics and**
2 **Breeding**, v. 23, p. 29–37, 2019.
- 3 LAHUTA, L. B. et al. Dehydration induces expression of galactinol synthase and
4 *raffinose synthase* in seedlings of pea (*Pisum sativum* L.). **Journal of Plant**
5 **Physiology**, v. 171, n. 14, p. 1306–1314, 2014.
- 6 LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L .
7 genome. **Mol Gen Genet.** p. 259–266, 1999.
- 8 LEE, L.-Y.; GELVIN, S. B. T-DNA Binary Vectors and Systems. **Plant Physiology**, v.
9 146, n. 2, p. 325–332, 2008.
- 10 LESK, C.; ROWHANI, P.; RAMANKUTTY, N. Influence of extreme weather disasters
11 on global crop production. **Nature**, v. 529, p. 84, 2016.
- 12 LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre (RS): Artmed Editora, 2001.
- 13 LI, M. et al. An optimal modelling approach for managing agricultural water-energy-
14 food nexus under uncertainty. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 1416–
15 1434, 2019.
- 16 LI, R. et al. Genome-Wide Identification and Expression Profiling Analysis of the
17 Galactinol Synthase Gene Family in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Agronomy**,
18 v. 8, n. 11, p. 250, 2018.
- 19 LIU, J.; PENG, T.; DAI, W. Critical *cis*-Acting Elements and Interacting Transcription
20 Factors : Key Players Associated with Abiotic Stress Responses in Plants. **Plant Mol**
21 **Biol Rep.** p. 303–317, 2014.
- 22 LIU et al. *CRISPR/Cas9*-mediated genome editing in plants. **Methods.** v. 121, p94-
23 102, 2017.
- 24 LONG, H. K.; PRESCOTT, S. L.; WYSOCKA, J. Ever-Changing Landscapes:
25 Transcriptional Enhancers in Development and Evolution. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1170–
26 1187, 2016.
- 27 MILDS, O. Coffee market recovers slightly from December slump. **Coffee market**
28 **report.** p. 16–21, 2019.
- 29 MILDS, O.; MILDS, C. Prices for all group indicators fall in January. n. January 2020.
30 **Coffee market report.** 2020.
- 31 MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent Advances in the Genetic Transformation of
32 Coffee. **Biotechnology Research International.** v. 2012, 2012.
- 33 MOFATTO, L. S. et al. Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee
34 by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars.
35 **BMC Plant Biology**, 16:94. 2016.

- 1 MOLINA, C.; GROTEWOLD, E. Genome wide analysis of *Arabidopsis* core promoters.
2 **BMC genomics**, v. 6, n. 1, p. 25, 2005.
- 3 MUKHERJEE, S. et al. Abiotic stress regulates expression of galactinol synthase
4 genes post - transcriptionally through intron retention in rice. **Planta**, v. 249, n. 3, p.
5 891–912, 2019.
- 6 NAKAGAWA, T. et al. Development of Series of Gateway Binary Vectors , *pGWBs* ,
7 for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation. **J.**
8 **Biosci. Bioeng.** v. 104, n. 1, p. 34–41, 2007.
- 9 NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional
10 regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses
11 including drought, cold, and heat. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. May, p. 170,
12 2014.
- 13 NEGRÃO, S.; SCHMÖCKEL, S. M.; TESTER, M. Evaluating physiological responses
14 of plants to salinity stress. **Annals of Botany**, v. 119, n. 1, p. 1–11, 2016.
- 15 NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and Raffinose Constitute a
16 Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. **Plant Physiology**, v.147, p.
17 1251-63, 2008.
- 18 ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N.-H. Identification of DNA sequences required for
19 activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, n. 6005, p. 810–
20 812, 1985.
- 21 ONG, C.-T.; CORCES, V. G. Enhancer function: new insights into the regulation of
22 tissue-specific gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 283, 1 mar.
23 2011.
24
- 25 OSAKABE, Y. et al. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic
26 stress responses in plants. **Sci Rep** 6, 26685, 2016.
- 27 PANDEY, B. et al. Chapter 10 - Regulated Gene Expression by Synthetic Modulation 2 of
28 the Promoter Architecture in Plants. In: Sing, S. P. et al (Eds.). **Current 3 Developments**
29 **in Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier. p. 235-255, 2019.
- 30 PARK, S. H. et al. Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in
31 transgenic rice plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 9, p. 2459–2467,
32 2010.
- 33 PARTELLI, F. L. et al. Cold induced changes on sugar contents and respiratory
34 enzyme activities in coffee genotypes. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 781–786, 2010.
- 35 PILLET, J. et al. *VvGOLS1* and *VvHsfA2* are Involved in the Heat Stress Responses
36 in Grapevine Berries. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 10, p. 1776–1792, 2012.
- 37 PORTO, M. S. et al. Plant promoters: An approach of structure and function. **Molecular**
38 **Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 38–49, 2014.

- 1 QUINTERO, F.O.. et al. Identification of a seed maturation protein gene from *Coffea*
2 *arabica* (*CaSMP*) and analysis of its promoter activity in tomato. **Plant Cell Reports**,
3 v. 37, p. 1257-1268, 2018.
- 4 RIBAS, A. F. et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica*
5 (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant**
6 **Biology**, v. 11, n. 1, p. 92, 2011.
- 7 RIBAS, A. F.; PROTASIO PEREIRA, L. F.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of
8 coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 83–94, 2006.
- 9 SALVI, P.; KAMBLE, N. U.; MAJEE, M. Stress-Inducible Galactinol Synthase of
10 Chickpea (*CaGo/S*) is Implicated in Heat and Oxidative Stress Tolerance Through
11 Reducing Stress-Induced Excessive Reactive Oxygen Species Accumulation. **Plant &**
12 **cell physiology**, v. 59, n. 1, p. 155–166, 2018.
- 13 SEMEDO, J. N. et al. Coffee Responses to Drought, Warming and High [CO₂] in a
14 Context of Future Climate Change Scenarios. In: ALVES, F.; LEAL FILHO, W.;
15 AZEITEIRO, U. **Theory and Practice of Climate Adaptation**. Cham: Springer
16 International Publishing, p. 465–477. 2018.
- 17 SENGUPTA, S. et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide
18 synthesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. AuGUST, p. 1–11, 2015.
- 19 SHI, J. et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield
20 under field drought stress conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 2, p.
21 207–216, 2017.
- 22 SHIMADA, T. et al. The Whole Set of Constitutive Promoters Recognized by RNA
23 Polymerase RpoD Holoenzyme of *Escherichia coli*. **PLOS ONE**. v. 9, n. 3, 2014.
- 24 SILVA, N. V. Clonagem e caracterização de promotores de três isoformas de
25 expansinas de *Coffea arabica*. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia
26 Molecular) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina. p. 100, 2012.
- 27 SINGH, D.; LAXMI, A. Transcriptional regulation of drought response: a tortuous
28 network of transcriptional factors. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 895, 2015.
- 29 SOLOVYEV, V. V.; SHAHMURADOV, I. A. PromH: Promoters identification using
30 orthologous genomic sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3540–
31 3545, 2003.
- 32 SOMSSICH, M. A short history of the CaMV 35S promoter. **Peer J. Preprints** 7,
33 e27096v3. 2019.
- 34 SOUZA, F. DE F. et al. Características das principais variedades de café cultivadas
35 em Rondônia. **Documentos** / Embrapa Rondonia, 93, p. 21, 2004.

- 1 TAKAHASHI, R.; TODO, Y. Coffee Certification and Forest Quality: Evidence from a
2 Wild Coffee Forest in Ethiopia. **World Development**, v. 92, p. 158–166, 2017.
- 3 TEKETAY, D. History, botany and ecological requirements of coffee. **Walia**, v. 20, n.
4 March, p. 28–50, 1999.
- 5 TORRES, L. F. et al. Expression of *DREB* -Like Genes in *Coffea canephora* and *C* .
6 *arabica* Subjected to Various Types of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**,v. 12,
7 p. 98–116, 2019.
- 8 UN, K.; CAO, C. Coffee Consumption Provides Therapeutic Benefits against AD
9 through Journal of Clinical Neurology and Coffee Consumption Provides Therapeutic
10 Benefits against AD through Increasing Plasma GCSF Levels and Improving Cognitive
11 Performance. **J Clin Neurol Neurosurg**. p. 0–4, 2018.
- 12 VAN DER VOSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety
13 development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review.
14 **Euphytica**, v. 204, n. 2, p. 243–256, 2015.
- 15 VIDAL, R. O. et al. A High-Throughput Data Mining of Single Nucleotide
16 Polymorphisms in *Coffea* Species Expressed Sequence Tags Suggests Differential
17 Homeologous Gene Expression in the Allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant**
18 **Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1053–1066, 2010.
- 19 WANG, D. et al. Molecular characterization and expression of three galactinol
20 synthase genes that confer stress tolerance in *Salvia miltiorrhiza*. **Journal of Plant**
21 **Physiology**, v. 169, n. 18, p. 1838–1848, 2012.
- 22 WITTKOPP, P. J.; KALAY, G. *Cis*-regulatory elements: Molecular mechanisms and
23 evolutionary processes underlying divergence. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 1,
24 p. 59–69, 2012.
- 25 WU, L. et al. Constitutively Expressed RB Gene Confers a High Level but Unregulated
26 Resistance to Potato Late Blight. **American Journal of Potato Research**, v. 95, n. 5,
27 p. 575–583, 2018.
- 28 WYDRA, G. O. AND K. Advances in Plant Tolerance to Abiotic Stresses. **Plant**
29 **Genomics**, v. 2, p. 64, 2018.
- 30 XIONG, T. C. et al. Chapter 7 Spatio-Temporal Imaging of Promoter Activity in Intact
31 Plant Tissues. **Methods in Molecular Biology**. v. 1482, p. 103–110, 2016.
- 32 YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in
33 Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. **Annu. Rev.**
34 **Plant Biol.** v. 57, p. 701-803, 2006.
35
- 36 YU, Q. et al. Micro-collinearity and genome evolution in the vicinity of an ethylene
37 receptor gene of cultivated diploid and allotetraploid coffee species (*Coffea*). **The Plant**
38 **Journal**, v. 6, p. 305-317, 2011.

- 1 ZHANG, W. et al. *Cis*-regulatory element based targeted gene finding: Genome-wide
2 identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis*
3 *thaliana*. **Bioinformatics**, v. 21, n. 14, p. 3074–3081, 2005.
- 4 ZHOU, J. et al. Responses of *Populus trichocarpa* galactinol synthase genes to abiotic
5 stresses. **Journal of Plant Research**, v. 127, n. 2, p. 347–358, 2014.
- 6 ZHOU, M. L. et al. Genome-wide identification of genes involved in raffinose
7 metabolism in Maize. **Glycobiology**, v. 22, n. 12, p. 1775–1785, 2012.
- 8 ZHU, J.-K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313–
9 324, 2016.
- 10 ZIEMIENOWICZ, A. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology *Agrobacterium* -
11 mediated plant transformation: Factors , applications and recent advances.
12 **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 95–102, 2014.
- 13 ZOU, C. et al. *Cis*-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis*
14 *thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 36, p.
15 14992–14997, 2011.

1 **2 CAPÍTULO 1: In silico characterization of galactinol synthase promoters**
2 **in *Coffea* spp. (submitted to Genetics and Molecular Biology)**

3 **Short running title: Characterization of *Go/S* promoters**

4 **Abstract**

5 One bottlenecks of genetic transformation is the absence of specific promoters
6 controlling the gene-protein expression for a specific tissue, development stage and/or
7 response to environmental condition. Galactinol synthase (*Go/S*) is a gene involved in
8 raffinose oligosaccharide biosynthesis, important osmoprotectors that protect plants
9 from oxidative damage during an abiotic stress. The characterization of *cis*-acting
10 regulatory elements (CRE) present in *Go/S* promoter region can help to improve our
11 knowledge about the mechanism involved in plant tolerance against stress condition.
12 We identified 10 *Go/S* genes using coffee genome public database (4 in *C. arabica*, 4
13 in *C. canephora* and 2 in *C. eugenioides*). All CRE were classify using PlantCARE
14 database. We identified several CRE related to plant defense (TC, WUN and GC),
15 stress (ARE, CARE, DRE, LTR, MBS, STRE, W-Box) and light (Box 4, G-Box, Sp1).
16 Our analysis indicated that promoter *Ca_Go/S2* (XP_027107993) should be important
17 for anaerobic and drought stress, and promoters *Ca_Go/S2* (XP_027120966),
18 *Cc02_g35340* and *Ce_Go/S2* (XP_027164479) for drought, cold, temperature and salt
19 stresses. All these promoters have potential to be used for plant transgene expression
20 helping to save time/money and improve the success rate to obtain new cultivars
21 tolerant to stress condition.

22
23 *Keywords:* Coffee, osmoprotection, raffinose, oligosaccharides, climate changes.

1 2.1 INTRODUCTION

2 Coffee is a perennial crop considered one of the most important agricultural
3 commodities in the world (Tucker, 2017). The genus *Coffea* belongs to the Rubiaceae
4 family and includes more than 124 species (Davis et al., 2011), with special relevance
5 to *Coffea arabica* ($2n = 4x = 44$, allotetraploid) and *C. canephora* ($n = 2x = 22$, diploid),
6 those species correspond to about two-thirds and one third of world production,
7 respectively (Milds, 2019). In order to accelerate the genetic improvement of coffee,
8 research in advanced biology such as genomics, bioinformatics and genetic
9 transformation may offer alternatives to reduce the time to obtain new genotypes with
10 agronomic traits of interest and act as an auxiliary tool in breeding programs (Ferrão
11 et al., 2019; Merot-L'Anthoene et al., 2019).

12 In coffee, as well in other plant species, one of the problems observed in genetic
13 transformation is the lack of specific promoters controlling gene-protein expression for
14 a specific tissue, development stage and/or response to environmental condition
15 (Brandalise et al., 2009; Nobres et al., 2016). In the past, the majority promoters used
16 in coffee plant transformation studies were from constitutive class (Barbosa et al.,
17 2010; De Guglielmo-Croquer et al., 2010; Ribas et al., 2011). Actually, researches
18 have been used specific promoters to transform coffee plants (Cotta et al., 2014;
19 Nobres et al., 2016; Alves et al., 2017; Aquino, 2018). One way to discover specific
20 promoters is by choosing a gene that are not produced continuously and perform an
21 structural analysis of their promoter region (Yang et al., 2013; Porto et al., 2013). The
22 characterization of regulatory *cis*-elements can give important information about the
23 genetic mechanism involved in the enzyme/protein production (Yang et al., 2013)
24 likewise was already observed in rice (Deeba et al., 2017; Mukherjee et al., 2019) and
25 cassava (Li et al., 2018).

26 *Cis*-regulatory elements (CREs or 'motifs') present in promoters region, control
27 plant development and physiology by regulating gene expression (Wittkopp and Kalay,
28 2012). The most widely studied CREs related to abiotic stress conditions in plants are
29 the ABRE (abscisic acid (ABA)-responsive element), DRE (dehydration-responsive
30 element), and MYB (ABRE element that confers ABA inducibility and mediates ABA
31 response) classes (Hernandez-Garcia and Finer, 2014; Wong et al., 2017).

32 Different abiotic stresses such as drought, salinity, oxidative and extreme
33 temperatures stresses lead to a series of morphological, physiological and biochemical
34 changes (Nakashima et al., 2014; Wu et al., 2016). Those changes occurs by triggering

1 post-translational modifications that adversely affect plant growth and productivity
2 (Mickelbart et al., 2015).

3 In coffee, abiotic stress situations can affect flowering, causes fruit abortion, and
4 under extreme conditions can lead to plant death (Mofatto et al., 2016). Drought also
5 affects vegetative growth, stimulate early leaf senescence and vigor and indirectly can
6 increase pests and diseases incidence (Alves et al., 2017). Notably, drought is the
7 main environmental stress that affects coffee production, causing yield decreases up
8 to 80% in dry years (Bertrand et al., 2016).

9 Plants overcome biotic/abiotic environmental stress conditions by acquiring
10 stress tolerance (Coolen et al., 2016). This is achieved by stress perception and
11 signaling, leading to the induction of stress responsive genes or transcription factors
12 (Overmyer et al., 2018). Stress responsive genes are categorized in two main groups,
13 the first group contains osmoprotectants, late embryogenesis abundant proteins,
14 antifreeze proteins, chaperones, detoxification enzymes and plays an important role in
15 protecting the cell against dehydration, and the second group regulates gene
16 expression and signal transduction through transcription levels linked to gene
17 promoters (Kosová et al., 2018).

18 Raffinose family of oligosaccharides (RFOs) and galactinol synthase enzyme
19 plays multiple important functions in plants stress response (Falavigna et al., 2018),
20 including drought (Gu et al., 2018), temperature (Cui et al., 2019) and salinity (Dos
21 Santos et al., 2011) stresses. The biosynthesis of raffinose, galactinol and stachyose
22 is mediated by raffinose synthase (RAFS; EC 2.4.1.82), galactinol synthase (*GoIS*; EC
23 2.4. 1.123) and stachyose synthase (STS; EC 2.4.1.67), respectively (Sui et al., 2012).
24 Galactinol synthase is a key enzyme responsible to catalyze the first step in the
25 biosynthesis of RFOs, producing raffinose, which is a sugar with structural, storage
26 and signaling roles importance (Salvi et al., 2019). In a previous studies of *C. arabica*
27 (Dos Santos et al., 2011) and *C. canephora* (Dos Santos et al., 2015), authors
28 observed that *GoIS* gene are up-regulated under drought stress condition, leading to
29 an increase of RFOs production in coffee leaves and roots.

30 In the *GoIS* promoter region of *Solanum lycopersicum* (*SlGoIS*) and
31 *Brachypodium distachyon* (*BdGoIS*), cis-elements were identified as being related to
32 abscisic acid-responsive elements (ABRE) and dehydration-responsive elements
33 (DRE), both were already described to contribute for plant abiotic stress tolerance (Filiz
34 et al., 2015). Despite several studies highlighted that coffee RFOs are able to protect

1 plants against abiotic stress (Joët et al., 2014; Dos Santos et al., 2015; Sengupta et
2 al., 2015; Ivamoto et al., 2017), there is no report about the *cis*-elements present in
3 their promoter region.

4 In this way, the aim of this study was to identified *Go/S* genes sequences in *C.*
5 *arabica*, *C. canephora* and *C. eugenioides*, followed by the selection and
6 characterization of the *cis*-elements present in these promoter regions using
7 bioinformatic tools. This information is fundamental to improve our knowledge about
8 the genetic mechanisms involved in the control of RFOs biosynthesis and to identify
9 new stress-induced promoters.

10 2.2 MATERIAL AND METHODS

11 2.2.1 GOLS GENES ANNOTATION PROCEDURES

12 *Go/S* nucleotide gene sequences from *Arabidopsis thaliana* were retrieved from
13 The Arabidopsis Information Resource (TAIR; Berardini et al., 2015) database. These
14 sequences were used as bait sequences to select coffee *Go/S* sequences by similarity
15 using BlastX tool against NCBI non-redundant sequence (NCBI-nr) and Swiss-Prot
16 database (Magrane and Consortium, 2011). Manual annotation of coffee *Go/S* genes
17 were also individually performed against *C. canephora* (Denoëud et al., 2014), *C.*
18 *arabica* cv. Caturra and *C. eugenioides* (CCC68 access) available at NCBI public
19 database (NCBI Resource Coordinators, 2016). We also used the Conserved Domains
20 Database (CDD) available at NCBI platform (Marchler-Bauer et al., 2016) to confirm
21 *Go/S* protein identification. Only full-length genes with high similarity to *A. thaliana* (E-
22 value = 0.0; score > 500), and sequences that presented PLN00176 (Galactinol
23 synthase) conserved motif were used for further analysis.

24 2.2.2 PHYLOGENETIC ANALYSES OF COFFEE GOLS GENES

25 To perform phylogenetic analysis, we used protein sequences from coffee *Go/S*
26 previously described (Dos Santos et al., 2011; Ivamoto et al., 2017), *Go/S* from *A.*
27 *thaliana* (Rhee et al., 2003), and *Go/S* protein sequences identified using *C. arabica*,
28 *C. canephora* and *C. eugenioides* genomes (Denoëud et al., 2014; NCBI Resource
29 Coordinators, 2016). Phylogenetic tree was developed using MEGAX software (Kumar
30 et al., 2018) and MUSCLE alignment (default parameters). Phylogenetic tree was
31 inferred using the Neighbor-Joining method, and bootstrap consensus tree was

1 obtained from 1000 replicates. The evolutionary distances were computed using the
2 JTT matrix-based method and are in the units of the number of amino acid substitutions
3 per site. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise
4 deletion).

5 2.2.3 *GOLS* GENES AND THEIR RESPECTIVE PROMOTERS REGION 6 IDENTIFICATION IN *COFFEA* SPP DATABASES.

7 Protein sequences for *GoIS* genes and their promoter sequences were retrieved
8 from Coffee Genome Hub databases (*C. canephora*) and through keyword search
9 (galactinol synthase). For *C. arabica* and *C. eugenioides*, we used *galactinol synthases*
10 already functionally characterized in Arabidopsis (Rhee et al., 2003) as bait sequences
11 to identify their respective promoter regions using BlastX tool
12 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences of *GoIS* promoter regions were
13 obtained using *C. canephora* genome (Denoeud et al., 2014) using Coffee Genome
14 Hub platform (<http://coffee-genome.org/>), *C. arabica* genome (BioProject accession
15 code PRJNA506972 – NCBI database) and *C. eugenioides* genome (BioProject
16 accession code PRJNA497891 – NCBI database) both available at NCBI platform. All
17 promoter region identified and selected for further analysis were located 2000 base
18 pair (2 kb) upstream of ATG start codon.

19 2.2.4 CHARACTERIZATION OF COFFEE *GOLS* GENES PROMOTERS

20 The presence and frequency of all *cis*-acting elements (CREs) were obtained
21 using Plant *Cis*-Actin Regulatory Element databases (PlantCARE; Lescot et al., 2002).
22 CREs were identified by similarity using PlantCARE Blast tool (default parameters).
23 Venn diagram for CREs observed in coffee *GoIS* promoters were developed using
24 Venn diagrams tool (Oliveros, 2007).

1 2.3 RESULTS

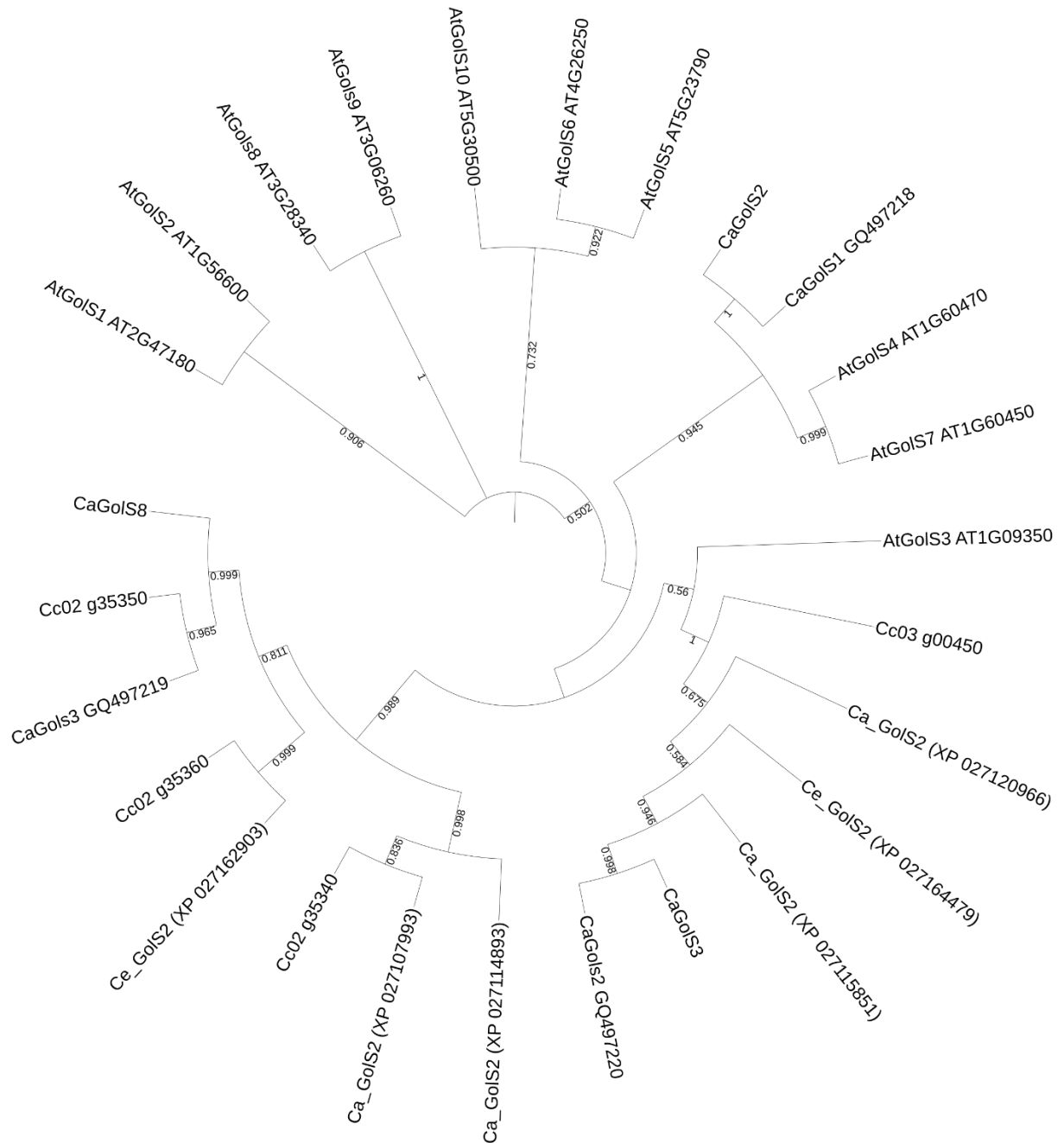
2 2.3.1 GOLS GENES IDENTIFICATION, ANNOTATION AND PHYLOGENETIC 3 ANALYSES

4 We selected from NCBI public database 6 *GoIS* sequences already described
5 in *C. arabica* (Dos Santos et al., 2011; Ivamoto et al., 2017), 4 *GoIS* genes from *C.*
6 *arabica* genome, 4 *GoIS* from *C. canephora* genome, 2 *GoIS* from *C. eugenioides*
7 genome, and 10 *GoIS* from *A. thaliana* (Table 1) to manually annotate and perform
8 phylogenetic analysis.

9 We constructed a phylogenetic tree to observe the evolutionary relationship
10 among *GoIS* protein sequences from coffee and Arabidopsis (Figure 1). According to
11 our phylogenetic analysis, two *C. arabica* *GoIS* genes were probably derived from *C.*
12 *canephora* (*Ca_GoIS2* XP_027107993 and *Ca_GoIS2* XP_027114893), and the other
13 two from *C. eugenioides* (*Ca_GoIS2* XP_027115851 and *Ca_GoIS2* XP_027120966)
14 (Figure 1).

- 1 Table 1. *Go/S* gene protein sequence used for phylogenetic tree. Results highlighted
 2 in gray are the genes (promoters) identified in this work.

Organism	Gene ID	Conserved domain ID	Protein length	Reference	
<i>C. arabica</i>	<i>Ca_Go/S2</i> XP_027115851	PLN00176	344 aa	NCBI Resource Coordinators, 2016	
	<i>Ca_Go/S2</i> XP_027120966	PLN00176	341 aa		
	<i>Ca_Go/S2</i> XP_027107993	PLN00176	383 aa		
	<i>Ca_Go/S2</i> XP_027114893	PLN00176	383 aa		
	<i>Cc02_g35340</i>	PLN00176	335 aa		Denoeud et al., 2014
	<i>Cc02_g35350</i>	PLN00176	334 aa		
<i>Cc02_g35360</i>	PLN00176	331 aa			
<i>Cc03_g00450</i>	PLN00176	341 aa			
<i>C. eugenioides</i>	<i>Ce_Go/S2</i> XP_027162903	PLN00176	335 aa	NCBI Resource Coordinators, 2016	
	<i>Ce_Go/S2</i> XP_027164479	PLN00176	341 aa		
	<i>CaGo/S2</i>	PLN00176	338 aa		Ivamoto et al., 2017
<i>CaGo/S3</i>	PLN00176	344 aa			
<i>CaGo/S8</i>	PLN00176	334 aa			
<i>C. arabica</i>	<i>CaGo/S1_GQ497218</i>	PLN00176	338 aa	Dos Santos et al., 2011	
	<i>CaGo/S2_GQ497220</i>	PLN00176	344 aa		
	<i>CaGo/S3_GQ497219</i>	PLN00176	334 aa		
<i>A. thaliana</i>	<i>AtGo/S1_AT2G47180</i>	PLN00176	344 aa	Rhee et al., 2003	
	<i>AtGo/S2_AT1G56600</i>	PLN00176	344 aa		
	<i>AtGo/S3_AT1G09350</i>	PLN00176	335 aa		
	<i>AtGo/S4_AT1G60470</i>	PLN00176	334 aa		
	<i>AtGo/S5_AT5G23790</i>	PLN00176	333 aa		
	<i>AtGo/S6_AT4G26250</i>	PLN00176	336 aa		
	<i>AtGo/S7_AT1G60450</i>	PLN00176	334 aa		
	<i>AtGo/S8_AT3G28340</i>	PLN00176	364 aa		
	<i>AtGo/S9_AT3G06260</i>	PLN00176	351 aa		
	<i>AtGo/S10_AT5G30500</i>	PLN00176	328 aa		



1

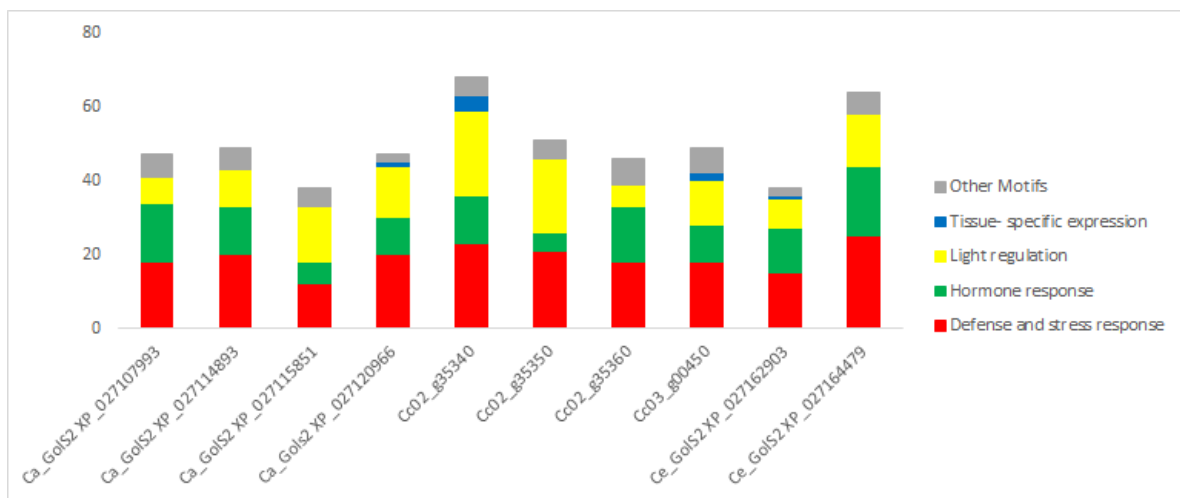
2 Figure 1. Phylogenetic analysis of *GoIS*s protein sequences. The tree was built with the MEGA X
 3 program using the Neighbor-Joining method, bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates.
 4 Ca = *C. arabica*, Cc = *C. canephora*, Ce = *C. eugenoides*, At= *A. thaliana*.

5 2.3.2 IN SILICO INVESTIGATION OF *CIS*-ELEMENTS IN PROMOTER REGIONS

6 We identified 10 *GoIS* sequences, four in *C. canephora*, four in *C. arabica* and
 7 two in *C. eugenoides* genome (Table 1). To understand *GoIS* transcriptional regulation
 8 and to better uncover the potential function of *GoIS* promoter, the *cis*-acting elements
 9 (CREs) were analyzed in PlantCARE webserver. We classified all basic elements, and

1 several CREs motifs (boxes) according to their respective functional categories (Figure
2 S1).

3 The sequences of *Coffea* spp. *Go/S* promoters presented in total 68 different
4 CREs motifs (Table S1). The CREs were identified and categorized into five main
5 classes of biological process: defense and stress, hormone, light, tissue and other
6 (Figure 2). In all promoters, the majority of *CREs* observed were related to defense
7 and stress responses, confirming the possibility of these promoters to be stress-
8 inducible. In a small number, we identified motifs related to hormone response and
9 light regulation in all promoters (Figure 2).



10 Figure 2. Graphical representation of the number of regulatory motifs predicted in the *Go/S* promoters
11 regions. Promoters were grouped according to their related functions provided by PlantCARE database
12 (Lescot et al., 2002) (Cc - *Coffea canephora*; Ca – *C. arabica* and Ce - *C. eugenioides*).

13 We identified 12 types of CREs: ABRE, ARE, CARE, DRE, GC-motif, LTR,
14 MBS, MYB, STRE, TC-rich, W-Box and WUN-motif (Table 2). All these CREs are
15 regulated by mechanism involved in plant defense and stress response signals. We
16 also described CREs position, sequence and motif localization for each promoter
17 (Table S1). We observed that the frequency of each CREs were distinct among *Go/S*
18 promoter regions. This is an indication that each promoter are different and can be
19 active under specific environmental condition (Table S3).

1 Table 2. List of *cis*-elements involved in defense and stress response observed in the
2 promoter regions of *Coffea Go/S* genes.

CRE IDs (Function)	Core sequence	References
ABRE (ABA responsive element)	ACGTG / CACGTG/ TACGTGTC/ CGTACGTGCA	Zhang et al., 2005
ABRE3a / ABRE4 (ABA responsive element)	TACGTG / CACGTA	Busk, 1997
ARE (<i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction)	AAACCA	Dolferus et al., 2017
CARE (<i>cis</i> -acting regulatory elements involved in stress and hormone response)	CAACTCCC	Pandey et al., 2015
DRE (<i>cis</i> -acting element involved in dehydration, low-temp, salt stresses)	TACCGACAT	Zhang et al., 2005
GC-motif (enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility)	CCCCCG	Olive et al., 1990
LTR (<i>cis</i> -acting element involved in low-temperature responsiveness)	CCGAAA	Bakeret al., 1994
MBS (MYB binding site involved in drought-inducibility)	CAACTG	Urao, 1993
MYB (ABRE element that confers ABA inducibility and mediates ABA response)	TAACTG / CAACCA/ CCGTTG/ CAACAG/ TAACCA	Abe et al., 2003
STRE (present in the promoters of genes that are regulated during stress)	AGGGG	Zahringer et al., 2000
TC-rich repeats (<i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness)	GTTTTCTTAC / ATTCTCTAAC	Diaz-De-Leon et al., 1993
W-Box (involved in regulation of abiotic stresses)	TTGACC	Su et al., 2011
WUN-motif (wound-responsive element)	AAATTTCTT/ CCATTTCAA	Ni et al., 1996

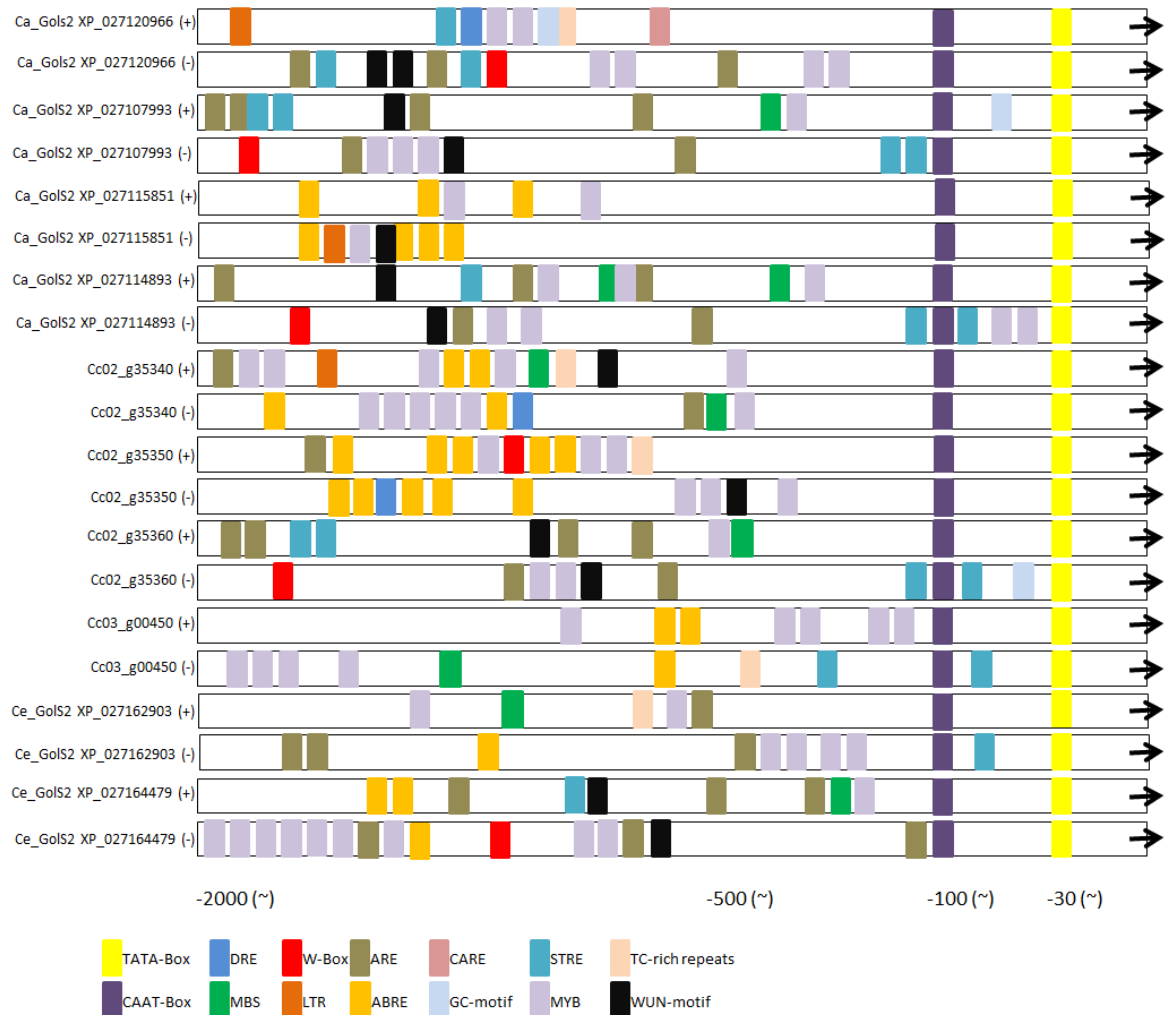
3 MYB was the most abundant stress-related CREs identified, present in all
4 promoters ranging from 3 to 11 copies (Table 3), followed by ARE (1 to 6, in 8
5 promoters), WUN-motif (1 to 2, in 8 promoters) and W-Box (1 to 2 in 8 promoters).
6 MBS and STRE were found in seven of the 10 *Go/S* promoters, ABRE in six, and TC-
7 rich repeats in five promoters. DRE, LTR, and GC-motif were observed in three
8 promoters, and CARE only in one promoter.

1 Table 3. Stress related number of *cis*-elements in *Coffea Go/S* gene promoters.

ID Promoter	ABRE	ARE	CARE	DRE	GC-motif	LTR	MBS	MYB	STRE	TC-rich repeats	W-Box	WUN-motif	Total
Ca_ <i>Go/S</i> 2													18
XP_027107993		6			1		1	3	4		1	2	20
Ca_ <i>Go/S</i> 2													11
XP_027114893		5					2	7	3		1	2	20
Ca_ <i>Go/S</i> 2	6					1		3				1	11
XP_027115851													20
Ca_ <i>Go/S</i> 2		3	1	1	1	1		6	3	1	1	2	20
XP_027120966													23
Cc02_g35340	4	2		1		1	2	11		1		1	23
Cc02_g35350	7	1		1				6		1	1	1	18
Cc02_g35360		6			1		1	3	4		1	2	18
Cc03_g00450	2						1	9	2	1	2		17
Ce_ <i>Go/S</i> 2													16
XP_027162903	1	4					1	7	1	1	1		16
Ce_ <i>Go/S</i> 2													24
XP_027164479	2	6					1	11	1		1	2	24
Total	22	33	1	3	3	3	9	66	18	5	9	13	

2 Defense-response promoters are also important for biotechnological
3 applications, we observed that Ca_*Go/S*2 (XP_027107993) promoter region contained
4 anaerobic stress inducible elements (ARE) and drought stress (MBS, MYB and STRE).
5 Ca_*Go/S*2 (XP_027120966), Cc02_g35340 and Ce_*Go/S*2 (XP_027164479) promoter
6 regions contained motifs for anaerobic stress (ARE), cold (LTR), dehydration (CARE
7 and DRE), salt stresses (DRE), low-temperature responsiveness (LTR and DRE),
8 drought-inducibility (ABRE, MBS and MYB) and wound-responsive element (WUN-
9 motif). These results indicate that *Go/S* promoter is possible modulated under plant
10 stress condition.

11 All promoters presented four or more stress-related *cis*-elements (Figure 3). The
12 most promising coffee *Go/S* promoter according to our results are *Go/S* Cc02_g35340
13 (Figure 2) and Ce_*Go/S*2 that showed 68 and 64 motifs, respectively. They were
14 related to abiotic stress (9) and plant defense (3) and were already described to be up-
15 regulated under abiotic stress condition (Dhatterwal et al., 2019). CREs are involved
16 in gene regulation of specific genes/protein biosynthesis for stress response, allowing
17 plants to survive against adverse environment condition (Hernandez-Garcia and Finer,
18 2014).



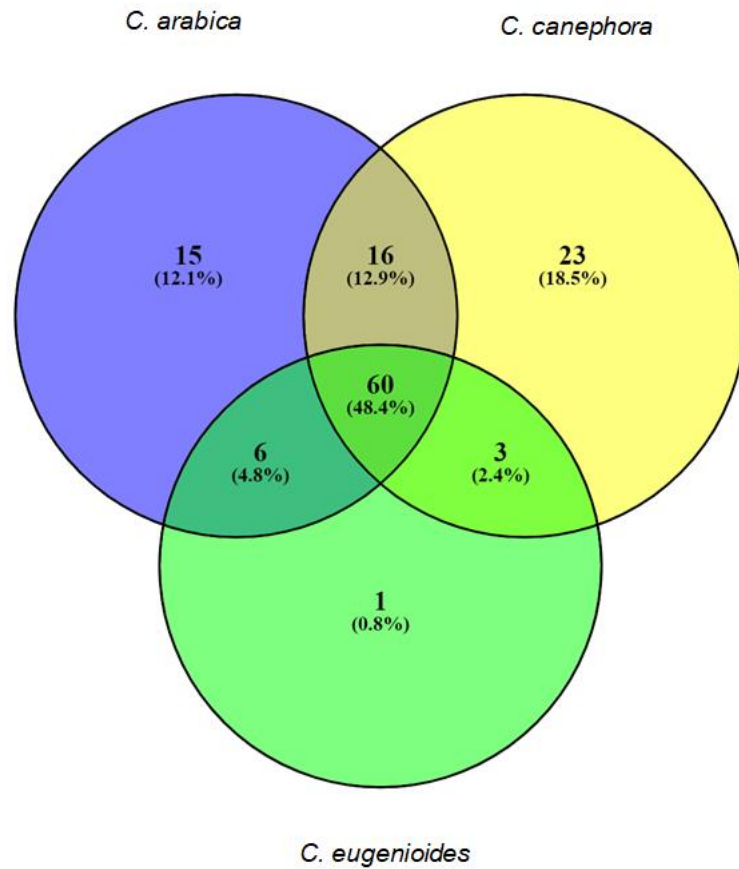
1

2 Figure 3. *Cis*-acting elements in the main *Go/S* promoter. Proximal locations of the transcriptional
 3 regulatory elements (TATA-Box and CAAT – Box) and the *cis*-elements involved in defense and stress
 4 response are indicated. Accurate position as shown in Table S1.

5 2.3.3 CONSERVED SEQUENCE ANALYSIS

6 We use Venn diagrams to compare the diversity of conserved sequences
 7 (motifs) obtained by PlantCare analysis among *Coffea* species sequences (Figure 4).

8 We observed that 48,4% are common elements present in all genomes.



1 Figure 4. Venn diagrams showing the similarity of *cis*-elements observed among *Go/S* promoter region
2 of *Coffea* spp. genomes.

3 *C. canephora* showed the highest number of exclusively elements (18,5%),
4 followed by *C. arabica* (12,1%) and *C. eugenioides* with the smallest number (0,8%).
5 *C. arabica* and *C. canephora* shared more common motifs 12,9%. *C. arabica* and *C.*
6 *eugenioides* shared 4,8% of common motifs, and *C. eugenioides* and *C. canephora*
7 showed only 2,4% of common motifs.

8 The 60 common elements in *Coffea* spp identified were analyzed and classified
9 in four functions: 11 motifs for defense and stress response, nine for light regulation,
10 three for tissue- specific expression and six for hormone response (Table 2). Other
11 motifs are composed by core promoter elements or motifs with unknown functions.

12 Fourteen elements in common between *C. arabica* and *C. canephora* were
13 identified, including the important GC – motif and LTR related with defense and stress
14 response. Four common light regulation (Gap-Box, Sp1, chs-CMA2a and G-Box) and
15 three hormone response (O2-site, P-box and TCA-element). The others motifs are

1 transcriptional regulatory elements and enhancer regions, which are common in all
2 species, as well as the Tata box in its different sequences (for example TATA,
3 ATTATA).

4 Motifs shared by *C. arabica* and *C. eugenioides* were AE-box, I-Box and GT1-
5 motif (light responsive element). Three common elements in *C. canephora* and *C.*
6 *eugenioides* were observed: CAT-Box (*cis*-acting regulatory element related to
7 meristem expression), GARE-motif (gibberellin-responsive element) and MRE (MYB
8 binding site involved in light responsiveness).

9 *C. canephora* promoters had 23 exclusively motifs, majority of motifs was
10 related to light responsive elements, followed by defense, stress response *cis*-
11 elements and hormone response (Table S2). In *C. arabica* 15 exclusively elements
12 related, to defense / stress response *cis*-elements (5), light responsive elements (5)
13 and other motifs are composed by core promoters elements or motifs with unknown
14 functions (Table S2).

1 2.4 DISCUSSION

2 RFOs are up-regulated under drought stress condition (Dos Santos et al., 2011),
3 and these oligosaccharides are able to osmoprotect plant cell (Joët et al., 2014;
4 Ivamoto et al., 2017). *Go/S* is the key enzyme on RFOs production. Several studies
5 also observed the up-regulation of *Go/S* under adverse conditions, such as high salinity
6 (Filiz et al., 2015), dehydration stress (Salvi et al., 2019), cold and drought (Cui et al.,
7 2019). To our knowledge this is the first report characterizing the promoter region of
8 coffee *Go/S* genes.

9 The promoter *rd29* have been studied in *A. thaliana* under osmotic stress
10 condition (Lee et al., 2016), and authors observed the presence of the CREs elements
11 ABRE and DRE, similarly with the ones we identified in our study. These Arabidopsis
12 plants were more tolerant to salt stress and ABA treatments. Another promoter, the
13 *AtNCED* (Hwang et al., 2018) also have the same CREs motifs (ARE, ABRE and MBS)
14 observed in our coffee *Go/S* promoter sequences.

15 We detected in the promoter regions of coffee *Go/S* genes several CREs
16 described as being a stress-induced promoter, such as ABRE (ABA responsive
17 element), DRE (dehydration, cold and low temperature), ARE (element for anaerobic
18 induction), LTR (low-temperature), MBS (drought-inducibility) and TC-rich repeats
19 (defense and stress responsiveness) (Urao, 1993; Diaz-De-Leon and Klotz; Lagrimini,
20 1993; Baker and Wilhelm; Thomashow, 1994; Abe et al., 2003; Zhang et al., 2005;
21 Dolferus et al., 2017), supporting the possibility that *Go/S* is stress-related and with
22 potential for future use.

23 We also found CRE type from MYB (ABRE family) that confers ABA inducibility
24 and mediates ABA response (Abe et al., 2003). Abscisic acid (ABA) is a key regulator
25 of plant adaptation, response and tolerance by regulating the expression of many
26 genes under drought stress, salinity levels, pathogenic attack and response to
27 constantly changing in the environment condition (Cheng et al., 2017, 2018a), likewise
28 observed for *Go/S* promoters under abiotic stress in *O. sativa* (Deeba et al., 2017;
29 Mukherjee et al., 2019), *EsNAC1* promoters in Arabidopsis (Liu et al., 2018) and
30 *EgrGATL* promoter in *Eucalyptus grandis* (Cheng et al., 2018b). *Go/S* from *Boea*
31 *hygrometrica* contain W-box cis-elements in their promoters, suggesting a possible
32 role of *Go/S* downstream regulation by ABA signaling (Wang et al., 2009).

1 The same *cis*-elements ABRE, ARE and MBS were found in papaya (*Carica*
2 *papaya*, L.) (Carlos-Hilario et al., 2014), *S. lycopersicum* and *B. distachyon* promoters
3 (Filiz et al., 2015) and *C. arabica* (Nobres et al., 2016) corroborating with our results.

4 In addition, we also observed hormone responsive elements in coffee *Go/S*
5 promoter regions, such as CGTCA-motif (MeJA responsiveness), GARE-motif
6 (gibberellin-responsive), and TGACG-motif (MeJA responsiveness). Similar results
7 were observed in the *OsRhoGAP2* promoter gene in rice (Huang et al., 2019). Several
8 CREs are jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) responsiveness, such as TCA-
9 element (GAGAAGAATA, TCAGAAGAGG and CAGAAAAGGA), were also observed
10 in *Sorghum bicolor* (Su et al., 2011) and *Catharanthus roseus* (Wang et al., 2010).
11 These CREs are able to modulate the levels of these hormones under light induction
12 (Ballaré, 2014).

13 We described the presence of several *cis*-regulatory elements as G-box (light
14 responsiveness) as already observed in *V. vinifera* L. (Wong et al., 2017) and *A.*
15 *thaliana* (*AtNCED3*) in response to water-deficit stimuli (Behnam et al., 2013). AT-rich
16 motif (element for maximal elicitor-mediated activation) in peach and almond (Esmaeili
17 et al., 2017), CT-rich sequence (defense and stress responsiveness) in *Catharanthus*
18 *roseus* (Yang et al., 2013), and conserved regions TATA-Box and CAAT box (Porto et
19 al., 2013). We also observed these CREs in our *Go/S* promoters region (Table S1)
20 indicating that our promoters may have the same characteristics and functions.

21 It was interesting to note, Box 4, GATA box and GA-motif, classified as light-
22 inducible (Filiz et al., 2015; Ezer et al., 2017), were widespread and represented by a
23 large number of motifs among coffee *Go/S* promoters. Light responsive elements also
24 has been observed in the promoter region of Arabidopsis genes responsiveness to
25 salinity and drought (Shariatipour and Heidari, 2018).

26 An stress-induced promoter previously characterized in *C. arabica* observed
27 several CREs (Brandalise et al., 2009), such as, W-box (defense-related genes), a GT-
28 1 element (biotic and salt stress-responsive), and ACCTACC motif (light-responsive),
29 similarly to what was observed in our promoter regions, corroborating to support our
30 hypothesis that we have characterize new stress-responsive promoters.

31 The characterization of CREs in *Coffea Go/S* promoters are mainly related to
32 drought-induced genes, according Tripathi et al. (2016) and Wang et al. (2012). Those
33 *cis*-elements suggest the involvement of these promoters in environmental response,

1 and they may participate in plant response to abiotic stresses in a way that is benefit
2 for plant to adapt to assorted environmental conditions.

3 Our study described several CREs associated to stress-induced promoters in
4 the coffee *Go/S* promoters sequences, providing a in depth characterization of these
5 potential stress-induced promoters in future genetic breeding program. Two promoters
6 showed the highest number of total motifs as well as of plant defense motifs:
7 (Cc02_g35340) and (Ce_*Go/S2* XP_027164479). Those promoters are potential
8 candidates to be used in plant transformation studies as a tool for coffee breeding
9 programs.

10 2.5 CONCLUSION

11 For the first time, we characterize all CREs present in coffee *Go/S* promoter
12 regions. We described new stress-responsive promoters which can be activated under
13 anaerobic and drought stress (Ca_*Go/S2* XP_027107993) and under drought,
14 temperature and salt stress (Ca_*Go/S2* XP_027120966, Cc02_g35340 and Ce_*Go/S2*
15 XP_027164479). Our results open the possibility to use these inducible promoters for
16 plant genetic breeding purposes avoiding the use of constitutive promoters.

17

1 2.6 REFERENCES

- 2 Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). The Plant
3 Cell 15:63-78.
- 4 Alves G, Torres LF, Déchamp E, Breitler J, Joët T, Gatineau F, Andrade AC, Bertrand
5 B, Marraccini P and Etienne H (2017). Differential fine-tuning of gene expression
6 regulation in coffee leaves by CcDREB1D promoter haplotypes under water deficit.
7 Journal of experimental botany 68: 3017–3031.
- 8 Aquino SO, Carneiro FA, Rêgo EC, Alves G, Andrade AC and Marraccini P (2016).
9 Functional analysis of different promoter haplotypes of the coffee (*Coffea canephora*)
10 *CcDREB1D* gene through genetic transformation of *Nicotiana tabacum*. Plant Cell,
11 Tissue and Organ Culture (PCTOC) 132: 279-294.
- 12 Barbosa AE, Albuquerque ÉV, Silva MC, Souza DSL, Oliveira-Neto OB, Valencia A,
13 Rocha TL and Grossi-de-Sa MF (2010). α -Amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus*
14 *vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits α -amylases from the coffee berry
15 borer pest. BMC Biotechnol 10, 44.
- 16 Baker SS, Wilhelm KS and Thomashow MF (1994). Plant Mol Biol 24:701.
- 17 Ballaré C (2014). Light Regulation of Plant Defense. Annual review of plant biology 65.
18 10.1146/annurev-arplant-050213-040145.
- 19 Behnam B, Iuchi S, Fujita M, Fujita Y, Takasaki H, Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki
20 K, Kobayashi M and Shinozaki K (2013). Characterization of the Promoter Region of
21 an Arabidopsis Gene for 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Involved in Dehydration-
22 Inducible Transcription, DNA Research 20:315–324.
- 23 Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E.
24 (2015). The Arabidopsis information resource: making and mining the “gold standard”
25 annotated reference plant genome. Genesis, 53(8), 474-485.
- 26 Bertrand B, Marraccini P, Villain L, Breitler JC and Etienne H (2016). Healthy Tropical
27 Plants to Mitigate the Impact of Climate Change—As Exemplified in Coffee. In:
28 Torquebiau E. (eds) Climate Change and Agriculture Worldwide. Springer, Dordrecht,
29 83-95.
- 30 Brandalise M, Severino FE, Maluf MP, and Maia IG (2009). The promoter of a gene
31 encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a
32 stress-responsive expression in leaves. Plant Cell Reports 28:1699-1708.
- 33 Busk PK, Jensen AB and Pagès M (1997). Regulatory elements *in vivo* in the promoter
34 of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. The Plant Journal, 11: 1285-
35 1295.
- 36 Carlos-Hilario L, Porter B, Zhu Y and Christopher D (2014). Identification and
37 Characterization of Papaya (*Carica papaya*, L.) Promoters by Heterologous
38 Expression as eGFP Fusions in *Arabidopsis thaliana*. Tropical Plant Biology 7:85-99.

- 1 Cheng C, Wang Z, Ren Z, Zhi L, Yao B, Chao S, Liu L and Li X (2017). SCFAtPP2-
2 B11 modulates ABA signaling by facilitating SnRK2.3 degradation in *Arabidopsis*
3 *thaliana*. PLoS genetics. 13. e1006947. 10.1371/journal.pgen.1006947.
- 4 Cheng C, Li C, Wang D, Zhai L and Cai Z (2018a). The Soybean GmNARK Affects
5 ABA and Salt Responses in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in Plant
6 Science. 9. 10.3389/fpls.2018.00514.
- 7 Cheng L, Ni X, Zheng M, Sun L, Wang X and Tong Z (2018b). Expressional
8 characterization of galacturonosyltransferase-like gene family in *Eucalyptus grandis*
9 implies a role in abiotic stress responses. Tree Genetics & Genomes 14.
10 10.1007/s11295-018-1294-5.
- 11 Cotta MG, Barros LM, Almeida JD, Lamotte FD, Barbosa EA, Vieira NG, Alves G,
12 Vinecky F, Andrade AC and Marraccini P (2013). Lipid transfer proteins in coffee:
13 isolation of *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, expression during coffee fruit
14 development and promoter analysis in transgenic tobacco plants. Plant Molecular
15 Biology 85: 11-31.
- 16 Coolen S, Proietti S, Hickman R, Olivas NH, Huang P, Verk MC, Pelt JA, Wittenberg
17 AH, Vos MD, Prins M, Loon JJ *et al* (2016). Transcriptome dynamics of *Arabidopsis*
18 during sequential biotic and abiotic stresses. The Plant journal: for cell and molecular
19 biology,86:249-67.
- 20 Cui L, Byun M, Oh H, Kim S, Lee J, Park H, Lee H and Kim W, T (2019). Poaceae
21 Type II Galactinol Synthase 2 from Antarctic Flowering Plant *Deschampsia antarctica*
22 and Rice Improves Cold and Drought Tolerance by Accumulation of Raffinose Family
23 Oligosaccharides in Transgenic Rice Plants. Plant & cell physiology.
24 10.1093/pcp/pcz180.
- 25 Davis AP, Tosh J, Ruch, N and Fay, MF (2011). Growing
26 coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and
27 morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary
28 history of *Coffea*. Botanical Journal of the Linnean Society 167: 357-377.
- 29 De Guglielmo-Cróquer Z, Altosaar I, Zaidi M, and Menéndez-Yuffá A (2010).
30 Transformation of coffee (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) with the *cry1ac* gene by
31 biolistic, without the use of markers. Brazilian Journal of Biology 70(2), 387-393.
- 32 Denoeud F, Carretero-Paulet L, Dereeper A, Droc G, Guyot R, Pietrella M, Zheng C,
33 Alberti A, Anthony F, et al. (2014). The Coffee Genome Provides Insight into the
34 Convergent Evolution of Caffeine Biosynthesis. Science. 345. 1181-1184.
35 10.1126/science.1255274.
- 36 Deeba F, Sultana T, Mahmood TM, O'Shea C, Skriver K and Naqvi SM (2017).
37 Involvement of WRKY, MYB and DOF DNA-binding proteins in interaction with a rice
38 germin-like protein gene promoter. Acta Physiologiae Plantarum 39:1-10.
- 39 Dhatteerwal P, Basu S, Mehrotra S and Mehrotra R (2019). Genome wide analysis of
40 W-box element in *Arabidopsis thaliana* reveals TGAC motif with genes down regulated
41 by heat and salinity. *Sci Rep* 9, 1681.

- 1 Diaz-De-Leon F, Klotz KL and Lagrimini LM (1993). Nucleotide sequence of the
2 tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. *Plant physiology*, 101:1117-8.
- 3 Dolferus R, Klok E J, Ismond K, Delessert C, Wilson S, Good A, Peacock J and Dennis
4 L (2017). Molecular basis of the nitrogen response in plants. *Soil Science and Plant
5 Nutrition* 63:329–341.
- 6 Dos Santos TB, Budzinski IG, Marur CJ, Petkowicz CL, Pereira LF and Vieira LG
7 (2011). Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and
8 accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant
9 physiology and biochemistry: PPB*, 49:441-8.
- 10 Dos Santos TB, Lima RB, Nagashima GT, Petkowicz CL, Carpentieri-Pípolo V, Pereira
11 LF, Domingues DS and Vieira LG (2015). Galactinol synthase transcriptional profile in
12 two genotypes of *Coffea canephora* with contrasting tolerance to drought. *Genetics
13 and Molecular Biology* 38:182–190.
- 14 Esmaeili F, Shiran B, Fallahi H, Mirakhorli N, Budak H and Martínez-Gómez P (2016).
15 *In silico* search and biological validation of microRNAs related to drought response in
16 peach and almond. *Functional & Integrative Genomics* 17:189-201.
- 17 Ezer D, Shepherd S, Brestovitsky A, Dickinson P, Cortijo S, Charoensawan V, Box M,
18 Biswas S, Jaeger K and Wigge P (2017). The G-Box Transcriptional Regulatory Code
19 in Arabidopsis. *Plant Physiology* 175. pp.
- 20 Falavigna VD, Porto DD, Miotto YE, Santos HP, Oliveira PR, Márgis-Pinheiro M,
21 Pasquali G and Revers LF (2018). Evolutionary diversification of galactinol synthases
22 in Rosaceae: adaptive roles of galactinol and raffinose during apple bud dormancy.
23 *Journal of experimental botany* 69: 1247–1259.
- 24 Filiz E, Ozyigit II and Vatansever R (2015). Genome-wide identification of galactinol
25 synthase (*GalS*) genes in *Solanum lycopersicum* and *Brachypodium distachyon*.
26 *Computational biology and chemistry* 58:149-57.
- 27 Ferrão RG, Fonseca Afa Da, Ferrão Mag and De Muner LH (2019). (Ed.).
28 *Biotechnology Applied to Coffea canephora*. In: *Conilon Coffee*. 3 edition updated and
29 expanded. Vitória, ES: Incaper. Cap. 8: 223-253.
- 30 Gu H, Lu M, Zhang Z, Xu J, Cao W and Miao M (2018). Metabolic process of raffinose
31 family oligosaccharides during cold stress and recovery in cucumber leaves. *Journal
32 of Plant Physiology*. 224-225.
- 33 Hernandez-Garcia CM and Finer JJ (2014). Identification and validation of promoters
34 and *cis*-acting regulatory elements. *Plant science: an international journal of
35 experimental plant biology* 217-218:109-19.
- 36 Huang J, Yan X, Li J, Shi J, Peng J, Du J, Ge H, Wang M, An W, Wang K, Wang H
37 and Liang W (2019). *OsRhoGAP2* promoter drives inflorescence-preferential

- 1 expression and confers responses to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Acta*
2 *Physiologiae Plantarum* 41. 10.1007/s11738-019-2856-3.
- 3 Hwang SG, Lee CY and Tseng CS (2018). Heterologous expression of rice 9-cis-
4 epoxy-carotenoid dioxygenase 4 (*OsNCED4*) in *Arabidopsis* confers sugar
5 oversensitivity and drought tolerance. *Bot Stud* 59: 2.
- 6 Ivamoto ST, Reis O, Domingues DS, Santos TB, Oliveira FF, Pot D, Leroy T, Vieira
7 LG, Carazzolle MF, Pereira GA and Pereira LF (2017). Transcriptome Analysis of
8 Leaves, Flowers and Fruits Perisperm of *Coffea arabica* L. Reveals the Differential
9 Expression of Genes Involved in Raffinose Biosynthesis. *PloS one* 12(1): e0169595.
- 10 Joët T, Laffargue A, Salmona J, Doubeau S, Descroix F, Bertrand B, Lashermes P
11 and Dussert S (2014) Regulation of galactomannan biosynthesis in coffee
12 seeds. *Journal of Experimental Botany* 65:323–337.
- 13 Kosová K, Vítámvás P, Urban M, Prasil I and Renaut J (2018). Plant Abiotic Stress
14 Proteomics: The Major Factors Determining Alterations in Cellular Proteome. *Frontiers*
15 *in Plant Science* 9:1-22.
- 16 Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K (2018). MEGA X: Molecular
17 Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and*
18 *evolution*. 35. 10.1093/molbev/msy096.
- 19 Lee S, Boon N, Webb A and Tanaka R (2016). Synergistic Activation of *RD29A* Via
20 Integration of Salinity Stress and Abscisic Acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell*
21 *Physiology*. 57. pcw132. 10.1093/pcp/pcw132.
- 22 Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P and
23 Rombauts S (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements
24 and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids*
25 *research*. 30. 325-7. 10.1093/nar/30.1.325.
- 26 Li RM, Yuan S, He Y, Fan J, Zhou Y, Qiu T, Lin X, Yao Y, Liu J, Fu S, Hu X and Guo
27 J (2018). Genome-Wide Identification and Expression Profiling Analysis of the
28 Galactinol Synthase Gene Family in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Agronomy*
29 8: 250.
- 30 Liu C, Sun Q, Zhao L, Li Z, Peng Z and Zhang J (2018). Heterologous Expression of
31 the Transcription Factor EsNAC1 in *Arabidopsis* Enhances Abiotic Stress Resistance
32 and Retards Growth by Regulating the Expression of Different Target Genes. *Frontiers*
33 *in Plant Science*. 9. 10.3389/fpls.2018.01495.
- 34 Liu J, Peng T and Dai W (2014). Critical cis -Acting Elements and Interacting
35 Transcription Factors: Key Players Associated with Abiotic Stress Responses in
36 Plants. *Plant Mol Biol Rep* 32:303–317.
- 37 Liu S, Li M, Su L, Ge K, Li L, Li X, Liu X and Li L (2016). Negative feedback regulation
38 of ABA biosynthesis in peanut (*Arachis hypogaea*): a transcription factor complex
39 inhibits *AhNCED1* expression during water stress. *Sci Rep* 6, 37943.

- 1 Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki C, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire M,
2 Geer R, Gonzales N et al (2016). CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins
3 via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research*. 45. 10.1093/nar/gkw1129.
- 4 Magrane M and Le Mercier P (2011). UniProt Knowledgebase: A hub of integrated
5 protein data. *Database: the journal of biological databases and curation*. 2011. bar009.
6 10.1093/database/bar009.
- 7 Mickelbart MV, Hasegawa PM and Bailey-Serres J (2015). Genetic mechanisms of
8 abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*
9 16:237-251.
- 10 Merot-L'anthoene V, Tournebize R, Darracq O, Rattina V, Lepelley M, Bellanger L,
11 Tranchant-Dubreuil C, Coulée M, Pégard M, Metairon S, et al. (2019), Development
12 and evaluation of a genome-wide Coffee 8.5K SNP array and its application for high-
13 density genetic mapping and for investigating the origin of *Coffea arabica* L.. *Plant*
14 *Biotechnol J* 17: 1418-1430.
- 15 Milds O (2019). Coffee market recovers slightly from December slump. *Coffee market*
16 *report* 16–21.
- 17 Mofatto LS, Carneiro FD, Vieira NG, Duarte KE, Vidal RO, Alekcevetch JC, Cotta MG,
18 Verdeil J, Lapeyre-Montès F, Lartaud M et al (2016). Identification of candidate genes
19 for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of
20 different *Coffea arabica* cultivars. *BMC Plant Biology* 16:94.
- 21 Mukherjee, S, Sengupta SD, Mukherjee A, Basak P and Majumder AL (2018). Abiotic
22 stress regulates expression of galactinol synthase genes post-transcriptionally through
23 intron retention in rice. *Planta* 249: 891-912.
- 24 Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2014). The transcriptional
25 regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses
26 including drought, cold, and heat. *Front. Plant Sci* 5:170.
- 27 NCBI Resource Coordinators (2016). Database resources of the national center for
28 biotechnology information. *Nucleic acids research* 44:D7.
- 29 Ni MX, Cui D and Gelvin SB (1996). Sequence-specific interactions of wound-inducible
30 nuclear factors with mannopine synthase 2' promoter wound-responsive elements.
31 *Plant Molecular Biology* 30:77-96.
- 32 Nobres P, Patreze CM, Waltenberg FP, Correa MF, Tavano EC, Mendes BM, and
33 Alves-Ferreira M (2016). Characterization of the Promoter of the Homeobox Gene
34 *CaHB12* in *Coffea arabica*. *Tropical Plant Biology* 9:50-62.
- 35 Olive MR, Walker JC, Singh K, Dennis ES and Peacock J. *Plant Mol Biol* (1990) 15:
36 593.
- 37 Oliveros JC (2007) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's

- 1 diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (May 26, 2019).
- 2 Overmyer K, Vuorinen K and Brosché M (2018). Interaction points in plant stress
3 signaling pathways. *Physiol Plantarum* 162:191-204.
- 4 Pandey S, Subramanaym RC, Yaqoob U, Negi YK, Arora S and Kaul T (2015) In silico
5 Analysis of cis acting Regulatory Elements CAREs in Upstream Regions of Ascorbate
6 Glutathione Pathway Genes from *Oryza sativa*. *Biochem Physiol* 4:159.
- 7 Porto MS, Pinheiro MP, Batista VG, Santos RC, Filho PA and Lima LM (2013). Plant
8 Promoters: An Approach of Structure and Function. *Molecular Biotechnology* 56:38-
9 49.
- 10 Rhee S, Beavis W, Berardini T, Chen G, Dixon D, Doyle A, Garcia-Hernandez M, Huala
11 E, Lander G, Montoya M *et al* (2003). The Arabidopsis Information Resource (TAIR):
12 A model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis
13 biology, research materials and community. *Nucleic acids research*. 31. 224-8.
14 10.1093/nar/gkg076.
- 15 Ribas AF, Dechamp E, Champion A, Bertrand B, Combes MC, Verdeil JL, Lapeyre F,
16 Lashermes P and Etienne H (2011). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation
17 of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus
18 cultures. *BMC Plant Biol* 11, 92.
- 19 Salvi P, Kamble N and Majee M (2019). Ectopic over-expression of ABA-responsive
20 Chickpea galactinol synthase (*CaGo/S*) gene results in improved tolerance to
21 dehydration stress by modulating ROS scavenging. *Environmental and Experimental*
22 *Botany*. 103957. 10.1016/j.envexpbot.2019.103957.
- 23 Selvaraj MG, Ishizaki T, Valencia M, Ogawa S, Dedicova B, Ogata T, Yoshiwara K,
24 Maruyama K, Kusano M, Saito K, Takahashi F, Shinozaki K, Nakashima K and Ishitani
25 M (2017), Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* galactinol synthase gene
26 improves drought tolerance in transgenic rice and increased grain yield in the field.
27 *Plant Biotechnol J*, 15: 1465-1477.
- 28 Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder AL (2015). Significance of galactinol
29 and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science* 6:1-
30 11.
- 31 Shariatipour N and Heidari B (2018). Investigation of Drought and Salinity Tolerance
32 Related Genes and their Regulatory Mechanisms in Arabidopsis (*Arabidopsis*
33 *thaliana*). *The Open Bioinformatics Journal*. 11. 12-28.
- 34 Su M, Li X, Ma X, Peng X, Zhao A, Cheng L, Chen S and Liu G (2011). Cloning two
35 P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic
36 stresses and MeJA treatment. *Plant science: an international journal of experimental*
37 *plant biology* 181:652-9.
- 38 Tripathi P, Rabara R, Reese R, Miller M, Rohila J, Subramanian S, Shen Q, Morandi
39 D, Bücking H, Shulaev V and Rushton P (2016). A toolbox of genes, proteins,

- 1 metabolites and promoters for improving drought tolerance in soybean includes the
2 metabolite coumestrol and stomatal development genes. BMC Genomics. 17.
3 10.1186/s12864-016-2420-0.
- 4 Tucker C (2017). Coffee Culture. 2nd edition. Routledge, New York, 188 p.
- 5 Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S and Shinozaki K (1993). The Plant Cell
6 5:1529-1539; DOI: 10.1105/tpc.5.11.1529
- 7 Wang D Yao W, Song Y, Liu W and Wang Z (2012). Molecular characterization and
8 expression of three galactinol synthase genes that confer stress tolerance in *Salvia*
9 *miltiorrhiza*. Journal of plant physiology. 169. 10.1016/j.jplph.2012.07.015.
- 10 Wang Z, Zhu Y, Wang L, Liu X, Liu Y, Phillips JR and Deng X (2009). A WRKY
11 transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by
12 binding to the W-box elements of the galactinol synthase (BhGo/S1) promoter. Planta
13 230:1155-1166.
- 14 Wang Q, Yuan F, Pan Q, Li M, Wang G, Zhao J, Tang K (2010). Isolation and functional
15 analysis of the *Catharanthus roseus* deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase gene
16 promoter. Plant cell reports 29:185-92.
- 17 Wittkopp P, Kalay G (2012). *Cis*-regulatory elements: molecular mechanisms and
18 evolutionary processes underlying divergence. Nat Rev Genet 13:59–69.
- 19 Wong D, Gutierrez R, Gambetta G and Castellarin S (2017). Genome-wide analysis of
20 *cis*-regulatory element structure and discovery of motif-driven gene co-expression
21 networks in grapevine. DNA research:an international journal for rapid publication of
22 reports on genes and genomes 3: 311–326.
- 23 Wu X, Gong F, Cao D, Hu X and Wang W (2016). Advances in crop proteomics: PTMs
24 of proteins under abiotic stress. Proteomics 16:847-65.
- 25 Yang Z, Patra B, Li R, Pattanaik S and Yuan L (2013). Promoter analysis reveals *cis*-
26 regulatory motifs associated with the expression of the WRKY transcription factor
27 CrWRKY1 in *Catharanthus roseus*. Planta 238:1039-1049.
- 28 Zhang W, Ruan J, Ho TD, You Y, Yu T and Quatrano RS (2005). *Cis*-regulatory element
29 based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic
30 stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*, *Bioinformatics* 21:3074–3081.

- 1 Table S1. Description of *cis*-elements presented in *coffee* *Go/S* promoters and related
 2 to defense and stress response.

Site Name	Position	Strand	Promoter
ABRE	1052	+	Ca_Go/S2 XP_027115851
ABRE	1354	-	Ca_Go/S2 XP_027115851
ABRE	1356	-	Ca_Go/S2 XP_027115851
ABRE	1647	-	Ca_Go/S2 XP_027115851
ABRE	1648	+	Ca_Go/S2 XP_027115851
ABRE	1643	-	Cc02_g35340
ABRE	1644	+	Cc02_g35340
ABRE	1655	+	Cc02_g35340
ABRE	1741	-	Cc02_g35340
ABRE	960	+	Cc02_g35350
ABRE	1219	+	Cc02_g35350
ABRE	1330	-	Cc02_g35350
ABRE	1703	-	Cc02_g35350
ABRE	754	+	Cc03_g00450
ABRE	868	-	Ce_Go/S2 XP_027162903
ABRE	1622	+	Ce_Go/S2 XP_027164479
ABRE3a	1356	-	Ca_Go/S2 XP_027115851
ABRE3a	959	+	Cc02_g35350
ABRE3a	1330	-	Cc02_g35350
ABRE3a	1703	-	Cc02_g35350
ABRE3a	753	+	Cc03_g00450
ABRE3a	1621	+	Ce_Go/S2 XP_027164479
ABRE4	1356	+	Ca_Go/S2 XP_027115851
ABRE4	959	-	Cc02_g35350
ABRE4	1330	+	Cc02_g35350
ABRE4	1703	+	Cc02_g35350
ABRE4	753	-	Cc03_g00450
ABRE4	1621	-	Ce_Go/S2 XP_027164479
ARE	658	-	Ca_Go/S2 XP_027107993
ARE	888	+	Ca_Go/S2 XP_027107993
ARE	1136	+	Ca_Go/S2 XP_027107993
ARE	1346	-	Ca_Go/S2 XP_027107993
ARE	1884	+	Ca_Go/S2 XP_027107993
ARE	1920	+	Ca_Go/S2 XP_027107993
ARE	638	-	Ca_Go/S2 XP_027114893
ARE	876	+	Ca_Go/S2 XP_027114893
ARE	1131	+	Ca_Go/S2 XP_027114893
ARE	1340	-	Ca_Go/S2 XP_027114893
ARE	1884	+	Ca_Go/S2 XP_027114893
ARE	430	-	Ca_Go/S2 XP_027120966
ARE	1137	-	Ca_Go/S2 XP_027120966
ARE	1399	-	Ca_Go/S2 XP_027120966
ARE	633	-	Cc02_g35340
ARE	1943	+	Cc02_g35340
ARE	1807	+	Cc02_g35350
ARE	647	-	Cc02_g35360
ARE	876	+	Cc02_g35360
ARE	1124	+	Cc02_g35360
ARE	1334	-	Cc02_g35360
ARE	1872	+	Cc02_g35360
ARE	1908	+	Cc02_g35360

ARE	480	-	Ce_GolS2 XP_027162903
ARE	515	+	Ce_GolS2 XP_027162903
ARE	1624	-	Ce_GolS2 XP_027162903
ARE	1723	-	Ce_GolS2 XP_027162903
ARE	148	-	Ce_GolS2 XP_027164479
ARE	386	+	Ce_GolS2 XP_027164479
ARE	641	+	Ce_GolS2 XP_027164479
ARE	850	-	Ce_GolS2 XP_027164479
ARE	1394	+	Ce_GolS2 XP_027164479
ARE	1638	-	Ce_GolS2 XP_027164479
CARE	759	+	Ca_GolS2 XP_027120966
DRE	1677	-	Cc02_g35350
DRE core	1168	-	Cc02_g35340
DRE1	966	+	Ca_GolS2 XP_027120966
GC-motif	67	-	Ca_GolS2 XP_027107993
GC-motif	765	+	Ca_GolS2 XP_027120966
GC-motif	57	-	Cc02_g35360
LTR	1672	-	Ca_GolS2 XP_027115851
LTR	1492	+	Ca_GolS2 XP_027120966
LTR	1379	+	Cc02_g35340
MBS	433	+	Ca_GolS2 XP_027107993
MBS	416	+	Ca_GolS2 XP_027114893
MBS	863	+	Ca_GolS2 XP_027114893
MBS	455	-	Cc02_g35340
MBS	1054	+	Cc02_g35340
MBS	422	+	Cc02_g35360
MBS	1337	-	Cc03_g00450
MBS	952	+	Ce_GolS2 XP_027162903
MBS	373	+	Ce_GolS2 XP_027164479
Myb	433	+	Ca_GolS2 XP_027107993
Myb	1248	-	Ca_GolS2 XP_027107993
MYB	1194	-	Ca_GolS2 XP_027107993
Myb	416	+	Ca_GolS2 XP_027114893
Myb	863	+	Ca_GolS2 XP_027114893
Myb	1142	+	Ca_GolS2 XP_027114893
Myb	1243	-	Ca_GolS2 XP_027114893
MYB	52	-	Ca_GolS2 XP_027114893
MYB	1189	-	Ca_GolS2 XP_027114893
Myb	637	+	Ca_GolS2 XP_027115851
MYB	1214	+	Ca_GolS2 XP_027115851
MYB	317	-	Ca_GolS2 XP_027120966
MYB	693	-	Ca_GolS2 XP_027120966
MYB	862	+	Ca_GolS2 XP_027120966
Myb	455	-	Cc02_g35340
Myb	1054	+	Cc02_g35340
Myb	1352	+	Cc02_g35340
MYB	541	+	Cc02_g35340
MYB	1355	-	Cc02_g35340
MYB	1472	-	Cc02_g35340
MYB	1947	+	Cc02_g35340
Myb	434	-	Cc02_g35350
MYB	727	-	Cc02_g35350
MYB	927	+	Cc02_g35350
MYB	1290	+	Cc02_g35350
Myb	422	+	Cc02_g35360
Myb	1236	-	Cc02_g35360

MYB	1182	-	Cc02_g35360
Myb	1337	-	Cc03_g00450
MYB	120	+	Cc03_g00450
MYB	377	+	Cc03_g00450
MYB	940	+	Cc03_g00450
MYB	1708	-	Cc03_g00450
MYB	1857	-	Cc03_g00450
Myb	952	+	Ce_GoIS2 XP_027162903
MYB	265	-	Ce_GoIS2 XP_027162903
MYB	349	-	Ce_GoIS2 XP_027162903
MYB	621	+	Ce_GoIS2 XP_027162903
Myb	373	+	Ce_GoIS2 XP_027164479
Myb	652	+	Ce_GoIS2 XP_027164479
Myb	753	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
MYB	699	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
MYB	1523	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
MYB	1634	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
MYB	1685	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
MYB	1990	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
MYB recognition site	1620	-	Ca_GoIS2 XP_027115851
MYB recognition site	1626	-	Cc02_g35340
MYB recognition site	1611	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
Myb-binding site	317	-	Ca_GoIS2 XP_027120966
Myb-binding site	862	+	Ca_GoIS2 XP_027120966
Myb-binding site	1355	-	Cc02_g35340
Myb-binding site	1947	+	Cc02_g35340
Myb-binding site	120	+	Cc03_g00450
Myb-binding site	377	+	Cc03_g00450
Myb-binding site	1857	-	Cc03_g00450
Myb-binding site	265	-	Ce_GoIS2 XP_027162903
Myb-binding site	349	-	Ce_GoIS2 XP_027162903
Myb-binding site	1990	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
MYB-like sequence	52	-	Ca_GoIS2 XP_027114893
MYB-like sequence	693	-	Ca_GoIS2 XP_027120966
MYB-like sequence	1472	-	Cc02_g35340
MYB-like sequence	727	-	Cc02_g35350
MYB-like sequence	927	+	Cc02_g35350
MYB-like sequence	1523	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
STRE	105	-	Ca_GoIS2 XP_027107993
STRE	151	-	Ca_GoIS2 XP_027107993
STRE	1674	+	Ca_GoIS2 XP_027107993
STRE	1709	+	Ca_GoIS2 XP_027107993
STRE	88	-	Ca_GoIS2 XP_027114893
STRE	135	-	Ca_GoIS2 XP_027114893
STRE	1662	+	Ca_GoIS2 XP_027114893
STRE	1056	-	Ca_GoIS2 XP_027120966
STRE	1185	+	Ca_GoIS2 XP_027120966
STRE	1413	-	Ca_GoIS2 XP_027120966
STRE	95	-	Cc02_g35360
STRE	141	-	Cc02_g35360
STRE	1662	+	Cc02_g35360
STRE	1697	+	Cc02_g35360
STRE	75	-	Cc03_g00450
STRE	250	-	Cc03_g00450
STRE	98	-	Ce_GoIS2 XP_027162903
STRE	1172	+	Ce_GoIS2 XP_027164479

TC-rich repeats	911	+	Ca_GoIS2 XP_027120966
TC-rich repeats	998	+	Cc02_g35340
TC-rich repeats	921	+	Cc02_g35350
TC-rich repeats	494	-	Cc03_g00450
TC-rich repeats	702	+	Ce_GoIS2 XP_027162903
WUN-motif	1264	-	Ca_GoIS2 XP_027107993
WUN-motif	1520	+	Ca_GoIS2 XP_027107993
WUN-motif	1259	-	Ca_GoIS2 XP_027114893
WUN-motif	1508	+	Ca_GoIS2 XP_027114893
WUN-motif	1551	-	Ca_GoIS2 XP_027115851
WUN-motif	1374	-	Ca_GoIS2 XP_027120966
WUN-motif	1375	-	Ca_GoIS2 XP_027120966
WUN-motif	688	+	Cc02_g35340
WUN-motif	440	-	Cc02_g35350
WUN-motif	1252	-	Cc02_g35360
WUN-motif	1508	+	Cc02_g35360
WUN-motif	769	-	Ce_GoIS2 XP_027164479
WUN-motif	1018	+	Ce_GoIS2 XP_027164479

1 Table S2. Characterization of putative *cis*-elements identified in *C. canephora*, *C. arabica* and *C. eugenioides* promoters regions by
 2 Venny.

Transcription factor binding motifs	Sequence	Function
15 elements included exclusively in " <i>C. arabica</i> ":		
ABRE	CGTACGTGCA	<i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
CARE	CAACTCCC	<i>cis</i> -acting regulatory elements involved in stress and hormone response
DRE1	ACCGAGA	<i>cis</i> -acting element involved in dehydration, low-temp, salt stresses
ERE	ATTCATA	half-site of the estrogen response element
F-Box	CTATTCTCATT	first characterized as components of SCF ubiquitin-ligase complexes
GATA-motif	GATAGGA	part of a light responsive element
G-box	ACACGTGT	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
I-box	cCATATCCAAT	part of a light responsive element
I-box	gGATAAGGTG	part of a light responsive element
TATA-box	TATAAGAA	core promoter element around -30 of transcription start
TATC-box	TATCCCA	<i>cis</i> -acting element involved in gibberellin-responsiveness
TCCC-motif	TCTCCCT	part of a light responsive element
WUN-motif	CAATTACAT	Wound-responsive element
WUN-motif	AAATTACTA	wound-responsive element
Unnamed_1	GAATTAATTA	60K protein binding site
16 common elements in " <i>C. arabica</i> " and " <i>C. canephora</i> ":		
AAGAA-motif	gGTAAAGAAA	Unknown function element
AC-I	(T/C)C(T/C)(C/T)ACC(T/C)ACC	Unknown function element
chs-CMA2a	TCACTTGA	part of a light responsive element
circadian	CAAAGATATC	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in circadian control
Gap-box	CAAATGAA(A/G)A	part of a light responsive element
GC-motif	CCCCCG	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
G-Box	CACGTG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
HD-Zip 1	CAAT(A/T)ATTG	element involved in differentiation of the palisade mesophyll cells
LTR	CCGAAA	<i>cis</i> -acting element involved in low-temperature responsiveness
O2-site	GATGATGTGG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in zein metabolism regulation
P-box	CCTTTTG	gibberellin-responsive element
Sp1	GGGCGG	light responsive element
TATA-box	TATATTTATATTT	core promoter element around -30 of transcription start

TCA-element	CCATCTTTTT	<i>cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness
Unnamed__1	CGTGG	Unknown function element
Unnamed__2	CCCCGG	Unknown function element
23 elements included exclusively in " <i>C. canephora</i> ":		
3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	light responsive element
ATC-motif	AGTAATCT	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
AT-rich sequence	TAAAATACT	element for maximal elicitor-mediated activation (2copies)
ATCT-motif	AATCTAATCC	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
CAAT-box	CCCAATTT	common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
chs-CMA1a	TTACTTAA	part of a light responsive element
chs-Unit 1 m1	ACCTAACCCGC	part of a light responsive element
CTAG-motif	ACTAGCAGAA	Unknown function element
DRE	TACCGACAT	<i>cis</i> -acting element involved in dehydration, low-temp, salt stresses
DRE core	GCCGAC	<i>cis</i> -acting element involved in dehydration, low-temp, salt stresses
GATA-motif	AAGATAAGATT	part of a light responsive element
G-box	CCACGTAA	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
G-box	CACGTC	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
G-box	TAAACGTG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
GCN4_motif	TGAGTCA	<i>cis</i> -regulatory element involved in endosperm expression
MSA-like	(T/C)C(T/C)AACGG(T/C)(T/C)A	<i>cis</i> -acting element involved in cell cycle regulation
Myc	TCTCTTA	transcription regulation and cell transformation
O2-site	GATGACATGG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in zein metabolism regulation
TATA-box	taTATAAAg	core promoter element around -30 of transcription start
TCA-element	TCAGAAGAGG	<i>cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	<i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness
WUN-motif	AAATTCCT	wound-responsive element
WUN-motif	TTATTACAT	wound-responsive element
60 common elements in " <i>C. arabica</i> ", " <i>C. canephora</i> " and " <i>C. eugenioides</i> ":		
AAGAA-motif	GAAAGAA	Unknown function element
A-box	CCGTCC	<i>cis</i> -acting regulatory element
ABRE	ACGTG	<i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ARE	AAACCA	<i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction
AT~TATA-box	TATATA	core promoter element around -30 of transcription start
AT~TATA-box	TATATAAA	core promoter element around -30 of transcription start

AT~TATA-box	TATATAAA	core promoter element around -30 of transcription start
AuxRR-core	GGTCCAT	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in auxin responsiveness
Box 4	ATTAAT	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
CAAT-box	CAAT	common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
CAAT-box	CAAAT	common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
CAAT-box	CCAAT	common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
CCAAT-box	CAACGG	MYBHv1 binding site
CGTCA-motif	CGTCA	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
ERE	ATTTTAAA	half-site of the estrogen response element
GATA-motif	AAGGATAAGG	part of a light responsive element
G-box	CACGAC	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
G-box	TACGTG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
G-Box	CACGTT	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
G-box	CCACGTAA	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
GT1-motif	GGTTAA	light responsive element
I-box	ccttatcct	part of a light responsive element
L-box	ATCCCACCTAC	part of a light responsive element
MBS	CAACTG	MYB binding site involved in drought-inducibility
MBSI	aaaAaaC(G/C)GTTA	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation
MYB	TAACCA	ABRE element that confers ABA inducibility and mediates ABA response, another <i>cis</i> -acting element
MYB	CAACAG	ABRE element that confers ABA inducibility and mediates ABA response, another <i>cis</i> -acting element
Myb	TAACTG	ABRE element that confers ABA inducibility and mediates ABA response, another <i>cis</i> -acting element
MYB	CAACCA	ABRE element that confers ABA inducibility and mediates ABA response, another <i>cis</i> -acting element
MYB recognition site	CCGTTG	ABRE element that confers ABA inducibility and mediates ABA response, another <i>cis</i> -acting element
MYC	CATGTG	transcription regulation and cell transformation
MYC	CAATTG	transcription regulation and cell transformation
MYC	CATTTG	transcription regulation and cell transformation
STRE	AGGGG	present in the promoters of genes that are regulated during stress
TATA	TATAAAAT	core promoter element around -30 of transcription start

TATA-box	TATA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	ATATAA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	TACAAAA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	ccTATAAAaa	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	ATTATA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	ATATAT	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	TATAAAA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	TATTTAAA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	TACATAAA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	TATATAA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	taTATAAAtc	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	TATACA	core promoter element around -30 of transcription start
TATA-box	TAAAGATT	core promoter element around -30 of transcription start
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	<i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness
TC-rich repeats	TCTTAC	<i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness
TGACG-motif	TGACG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGA-element	AACGAC	auxin-responsive element
Unnamed__4	CTCC	Unknown function element
Unnamed__6	taTAAATATct	Unknown function element
Unnamed__6	taTAAATATct	Unknown function element
Unnamed__6	TATAAAT	Unknown function element
W box	TTGACC	involved in regulation of abiotic stresses
WRE3	CCACCT	<i>cis</i> -regulatory elements associated with biotic stress responsiveness
WUN-motif	AAATTACT	wound-responsive element
WUN-motif	AAATTTCTT	wound-responsive element
6 common elements in " <i>C. arabica</i> " and " <i>C. eugenioides</i> ":		
AE-box	AGAAACAA	part of a module for light response
AE-box	AGAAACTT	part of a module for light response
GT1-motif	GGTTAAT	light responsive element
I-box	GATAAGGGT	part of a light responsive element
TATA-box	tcTATAAATAgg	core promoter element around -30 of transcription start

Unnamed_2	AACCTAACCT	Unknown function element
3 common elements in " <i>C. canephora</i> " and " <i>C. eugenioides</i> ":		
CAT-box	GCCACT	<i>cis</i> -acting regulatory element related to meristem expression
GARE-motif	TCTGTTG	gibberellin-responsive element
MRE	AACCTAA	MYB binding site involved in light responsiveness
1 element included exclusively in " <i>C. eugenioides</i> ":		
Unnamed_16	GCTGCCCGTC	Unknown function element

1 Table S3. Identification of putative *cis*-elements present in the *C. canephora*, *C.*
 2 *arabica* and *C. eugenioides* promoters identified by the PlantCARE software.

Motifs ID	<i>C. arabica</i>				<i>C. canephora</i>				<i>C. eugenioides</i>		Total
	Ca_GoIS2 XP_027107993	Ca_GoIS2 XP_027114893	Ca_GoIS2 XP_027115851	Ca_GoIS2 XP_027120966	Cc02_g35340	Cc02_g35350	Cc02_g35360	Cc03_g00450	Ce_GoIS2 XP_027162903	Ce_GoIS2 XP_027164479	
3-AF1 binding site						1					1
AAGAA-motif			1	1	2	1			1		6
A-box	1	1	1			1	1		1		6
ABRE			7		4	10		3	1	3	28
AC-I	1						1				2
AE-box			2	2					1	1	6
ARE	6	5		3	2	1	6		2	6	31
as-1	2	2		2	2	1	2	2	3	4	20
ATC-motif						1					1
ATCT-motif								2			2
AT-rich sequence								1			1
AuxRR-core	1	1				1	1			1	5
Box 4	2	1	3	1	4	10	1	6	2	1	31
Box III											0
CARE				1							1
CAAT-box	33	37	35	47	48	40	33	41	38	34	386
CAT-box					1			2	1		4
CCAAT-box			1		1					1	3
CCGTCC motif	1	1	1			1	1		1		6
CCGTCC-box	1	1	1			1	1		1		6
CGTCA-motif	2	2		2	2	1	2	2	2	4	19
chs-CMA1a					1						1
chs-CMA2a	1						1				2
chs-Unit 1 m1					1						1
circadian			1			2		1			4
CTAG-motif								2			2
DRE				1	1	1					3
ERE	6	5	2	1			5	1		4	24
F-box				1							1
GA-motif											0
Gap-box				1	1	1					3
GARE-motif					1			1	1	1	4
GATA-motif		1	2	2	2			2		1	10
G-box			5	2	6	5		1	2	1	22

GC-motif	2			1		1					4
GCN4_motif						1					1
GT1-motif	2	3	2		1		2		1	6	17
HD-Zip 1				1	1						2
I-box	2		1	2	2					2	9
LAMP-element											0
L-box	1	1					1	1		1	5
LTR			1	1	1						3
MBS	1	2			2		1	1	1	1	9
MBSI	1	1		1			1			1	5
MRE					3		2		1		6
MSA-like					1						1
Myb	4	6	3	6	11	6	3	9	6	12	66
MYC	1	2	4	8	3	7	1	1	5	1	33
O2-site	1				2		1				4
P-box			2	1	1	1		1			6
Sp1	1	1		2	1	1	1				7
STRE	4	3		3		4		2	1	1	18
TATA-box	88	82	32	16	33	29	86	29	15	72	482
TATC-box			1	1							2
TCA	1				1		1	1			4
TCCC-motif				2							2
TC-rich repeats				1	1	1		1	1		5
TCT-motif		1			1	1			1	1	5
TGACG-motif	2	2		2	2	1	2	2	3	4	20
TGA-element			1		2				3		6
W box	1	1		1		1	1	2	1	1	9
WRE3	2	2	2		2		2	3	2	2	17
WUN-motif	2	2	1	2	1	1	2		2		13
Total	173	166	112	118	152	133	162	120	100	167	X



1 Figure S1. Sequence of *GoS* promoter A - *C. arabica* (Ca), B – *C. canephora* (Cc) and C – *C. eugenioides* (Ce) and its multiple *cis*-acting regulatory motifs (boxes) identified using the PlantCARE software.

2

3

1 3 CAPÍTULO 2. Caracterização *in vivo* do promotor do gene galactinol sintase 2 de *Coffea canephora*.

3 **Resumo:**

4 O café, é uma das mais importantes *commodities* agrícolas, sendo o Brasil seu
5 maior produtor e exportador. Os estresses abióticos afetam o crescimento das plantas
6 e a produtividade agrícola, situações de déficit hídrico, salinidade e temperatura estão
7 se tornando um problema cada vez mais comuns à medida que o aquecimento global
8 avança. O déficit hídrico impacta a cafeicultura através da redução de áreas
9 adequadas para o cultivo, produtividade e qualidade dos frutos, além de aumentar a
10 incidência de pragas e doenças. Uma das alternativas biotecnológicas para mitigar
11 esses impactos é a produção de plantas geneticamente modificadas com tolerância a
12 esses estresses. Neste caso, o uso de promotores estresse induzido e específicos de
13 café pode minimizar os efeitos negativos causados por estresses abióticos, ao
14 aumentarem a produção de osmoprotetores, por exemplo. A galactinol sintase (*Go/S*)
15 é a primeira enzima na via de síntese dos oligossacarídeos da família da rafinose
16 (RFO) e sintetiza o galactinol a partir da molécula de UDP-galactose e inositol. A
17 expressão dos genes *Go/S* é induzida sob estresse abiótico, principalmente o de seca
18 e salinidade. Portanto, a seleção e a caracterização do promotor do gene *Go/S* torna-
19 se interessante para o desenvolvimento de culturas tolerantes a estresses abióticos.
20 Para caracterização deste promotor, plantas de *Arabidopsis thaliana* foram
21 transformadas com o cassete de expressão contendo o gene repórter *GUS* sob o
22 controle do promotor *Go/S3* de *Coffea canephora* utilizando *Agrobacterium*
23 *tumefaciens*. Plantas transgênicas (T3) foram submetidas a diferentes estresses
24 abióticos (desidratação, estresse salino, estresse de frio e aclimatação a baixas
25 temperaturas), e foram realizadas análises histoquímicas e de quantificação da
26 atividade transcricional do gene repórter *GUS* via PCR quantitativa em tempo real. A
27 coloração histoquímica do gene repórter *GUS* foi verificada em todos os tecidos de *A.*
28 *thaliana* nas plantas com a construção *pCcGo/S3::GUS*, provavelmente devido a uma
29 atividade *leaky*. Houve um aumento considerável da expressão do gene *GUS* em *A.*
30 *thaliana* nos experimentos de estresse abiótico, com maiores níveis de expressão na
31 desidratação *in vivo* (8h), desidratação *in vitro* (48h) nas concentrações de PEG 10 e
32 20%, estresse salino (24h) na concentração de NaCl 50 mM e no estresse de frio
33 (6°C). Este promotor demonstrou ter potencial como tipo estresse-induzido para futura
34 utilização para obtenção de plantas geneticamente modificadas de café.

35 **Palavras chave:** Transformação genética, *Go/S*, estresse abiótico, *A. thaliana*.

1 3.1 INTRODUÇÃO

2 O café é uma das mais importantes *commodities* agrícolas dos países em
3 desenvolvimento, sendo o Brasil o maior produtor e exportador de café (AERTS;
4 HONNAY, 2015; SEMEDO et al., 2018).

5 Estudos sugerem que os efeitos causados pelas mudanças climáticas, que
6 estão se tornando cada vez mais imprevisíveis, podem aumentar os períodos de
7 déficit hídrico, com impacto direto na produtividade na maioria das culturas
8 (ATKINSON; JAIN; URWIN, 2015; SALEHI-LISAR; BAKHSHAYESHAN-AGDAM,
9 2016). Em um futuro próximo, culturas de importância agrícola serão afetadas devido
10 a estes impactos ambientais, ocasionando a redução da produtividade, qualidade,
11 aumento na incidência de pragas e doenças a nível mundial (IIZUMI; RAMANKUTTY,
12 2015).

13 Assim, o clima influencia diretamente todos os componentes na produção
14 agrícola, incluindo o zoneamento agrícola, produtividade e amplitude de cultivo (LESK;
15 ROWHANI; RAMANKUTTY, 2016). As mudanças climáticas nas últimas décadas,
16 podem ocasionar uma expansão da área de cultivo para latitudes e altitudes mais
17 altas, de acordo com estudos que exploram índices edafoclimáticos (BUNN et al.,
18 2014). Deste modo, regiões de produção de café do mundo, como o Brasil e o Vietnã,
19 podem passar por reduções na área disponível para plantio (BUNN et al., 2015).

20 Uma das alternativas biotecnológicas para mitigar esses impactos é o
21 desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas tolerantes a estresses
22 abióticos (GOLLDAK; LÜKING; YANG, 2011; GOLLDAK et al., 2014). Através das
23 técnicas de transformação genética de plantas é possível introduzir genes de
24 interesse comercial nas mais diversas culturas e com o auxílio dos promotores
25 estresse induzido é possível realizar a expressão dos transgenes em níveis desejados
26 (NAKASHIMA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2014; SALVI; KAMBLE;
27 MAJEE, 2018).

28 Os promotores são controladores chave da regulação gênica e baseado nesse
29 potencial, a sua caracterização mais detalhada pode se tornar uma ferramenta para
30 proporcionar estratégias biotecnológicas para aumentar a tolerância à seca em
31 cafeeiros (HERNANDEZ-GARCIA et al. 2014; PORTO et al., 2014).

32 Portanto, os genes induzidos por diferentes tipos de estresse têm mostrado que
33 a caracterização de seus promotores, podem ser úteis na engenharia genética (JAIN

1 et al., 2018). Assim a utilização de promotores estresse induzido, se torna uma
2 ferramenta poderosa, com um controle mais preciso da expressão, na aplicação da
3 biotecnologia para tolerância à seca, salinidade e de temperatura em culturas
4 comerciais (AYUB et al., 2019).

5 Os oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) representados pela
6 galactinol, estaquiose e verbascose, exercem um papel importante na tolerância a
7 estresses abióticos (SENGUPTA et al., 2015), pois exercem um papel de
8 osmoproteção (JOËT et al., 2014). A galactinol sintase (EC 2.4.1.123 - *Go/S*) é a
9 primeira enzima da via metabólica das RFOs
10 , responsável pela formação do galactinol, a partir da união das moléculas de
11 UDP- galactose e mio-inositol (SENGUPTA et al., 2015). Diversos estudos
12 verificaram que a expressão dos genes *Go/S* isolados de várias espécies aumentaram
13 as quantidades de galactinol e rafinose, e conseqüentemente uma melhor tolerância
14 à seca em plantas transgênicas quando submetidas a tratamentos de estresse
15 abióticos (MUKHERJEE et al., 2019; ZHUO et al., 2013).

16 Dos Santos et al. (2011) observaram que o gene de *CaGo/S* desencadeou
17 respostas específicas de acordo com diferentes estresses abióticos. Os autores
18 observaram diferenças no padrão transcricional do gene *Go/S* em plantas de *C.*
19 *canephora* e um maior acúmulo de RFOs nas folhas e raízes durante os estresses
20 abióticos de déficit hídrico, estresse salino e calor. A expressão de *CaGo/S* foi
21 detectada predominantemente em folhas e raízes (DOS SANTOS et al., 2011). Com
22 isto, existe a possibilidade deste promotor ser do tipo estresse-induzido no gênero
23 *Coffea*, e a sua utilização poderia dirigir genes alvos, com características agrônômicas
24 de interesse, que possam ser ativados ou desativados em tecidos específicos ou
25 regulados por estresses abióticos.

26 Neste capítulo, após a identificação de *cis*-elementos realizadas no Capítulo 1,
27 clonamos e caracterizamos o promotor do gene *Go/S3* (*Cc02_35360*), isoforma de
28 *Coffea canephora* (*Cc*). O cassete de expressão contendo o promotor *CcGo/S3* e o
29 gene repórter da β -glucuronidase (*GUS*) (*pCcGo/S3::GUS*), foi introduzido via
30 *Agrobacterium* em plantas de *A. thaliana*, para verificarmos os níveis de expressão do
31 gene repórter sob controle do promotor *CcGo/S3* com o objetivo de analisar a resposta
32 desse promotor em diferentes situações de estresses *in vitro* e *in vivo*.

1 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

2 3.2.1 LOCALIZAÇÃO EXPERIMENTAL

3 Este estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Cultura de
4 Tecidos do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina-PR, credenciado pela
5 Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para desenvolver trabalhos
6 de pesquisa com organismos geneticamente modificados (CQB 0059/98).

7 3.2.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR PLASMIDIAL E TRANSFORMAÇÃO DE *E.* 8 *COLI* *A. TUMEFACIENS*

9 O plasmídeo pCAMBIA 1381 foi utilizado para as transformações das plantas
10 de *A. thaliana* foi modificado e sintetizado pela empresa GenOne Biotechnologies®
11 (RJ), constituído pelo promotor do gene *GoIS*, isoforma de *C. canephora*
12 (*Cc02_35360*), pelo gene repórter β -glucuronidase (*GUS*) (Figura 1), pelo gene de
13 resistência a higromicina (Figura suplementar 1).

14 A escolha deste promotor ocorreu através da identificação de *cis*-elementos
15 realizadas no Capítulo 1, pelos resultados observados por Dos Santos et al. (2011) e
16 pelo genoma de *C. canephora* estar disponibilizado e melhor anotado na época do
17 estudo. O tamanho da sequência do promotor é de 2000 pb a montante do sítio de
18 início da transcrição do gene *GUS* (start códon ATG).

19

20 Figura 1. Representação esquemática do T-DNA do plasmídeo pCAMBIA1381 para
21 transformação das plantas de *A. thaliana* via *A. tumefaciens*.



22 A transformação do DNA de células competentes de *Escherichia coli* linhagem
23 DH5 α para multiplicação e inserção do vetor plasmidial foi realizada via eletroporação.
24 Foram utilizadas cuvetas de 0,1 cm de espessura contendo 40 uL de suspensão de
25 células e 1 uL de DNA plasmidial. A eletroporação foi feita com o Eletroporador 2510
26 (BIO-RAD, Laboratories USA Inc.) com pulso de 1.600 volts. Imediatamente após o
27 pulso, 1 mL de meio LB foi adicionado à suspensão que foi incubada a 37°C em
28 agitador orbital por uma hora. Foram plaqueados a suspensão celular em meio LB
29 sólido contendo canamicina (100 mg.L⁻¹). Após verificar o crescimento das colônias

1 nas placas, uma colônia isolada do plasmídeo recombinante foi inoculada em 10 mL
 2 de meio LB com canamicina (100 mg.L⁻¹) e incubadas a 37° C por 16 horas, em
 3 agitador orbital com rotação de 200 rpm. A mini extração do plasmídeo foi realizada
 4 com o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System Protocol* (Promega, Woods Hollow
 5 Road · Madison, USA) e o DNA obtido, foi quantificado em Nanodrop™ 1000 (Thermo
 6 Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

7 Para confirmar a identidade do plasmídeo, a construção foi testada por meio de
 8 digestão enzimática utilizando duas enzimas de restrição: *EcoRI* e *PstI* (Thermo
 9 Scientific, Waltham, MA, USA), com volume final da reação de 30 µL, seguindo o
 10 protocolo do fabricante. A reação da digestão foi incubada a 37° C por 2 horas e os
 11 fragmentos obtidos de 12kb, foram visualizados em gel de agarose 1%, corados com
 12 brometo de etídio (EtBr) e visualizado com Transilluminator Loocus Biotecnologia® L-
 13 Pix EX.

14 Uma vez confirmada a identidade da construção, por tamanho do fragmento, o
 15 plasmídeo foi inserido via eletroporação, em células competentes de *Agrobacterium*
 16 *tumefaciens* linhagem *EHA105*, pelo equivalente protocolo (Sambrook & Russell,
 17 2006) descrito anteriormente para *E. coli*. Algumas colônias foram selecionadas para
 18 verificar a presença do plasmídeo através de reações em cadeia da polimerase (PCR)
 19 com a utilização de o oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados para o gene
 20 *GUS*, hygamicina e *GoS3GUS* (Tabela 1).

21 Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a PCR.

<i>Primers</i> para PCR	Sequências	Amplicon	Temperatura de anelamento*
<i>GUS</i> F	5'- GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG -3'	412 bp	54°C
<i>GUS</i> R	5'- TGGATTCCGGCATAGTTAAA -3'		
HygR F	5'- TCAGCAATCGCGCATATGAA -3'	150 bp	60°C
HygR R	5'- CGAACTGCCCCGCTGTTCTAC -3'		
<i>GoS3GUS</i> F	5'- TCAGCAATCGCGCATATGAA -3'	600 bp	62°C
<i>GoS3GUS</i> R	5'- CGAACTGCCCCGCTGTTCTAC -3'		

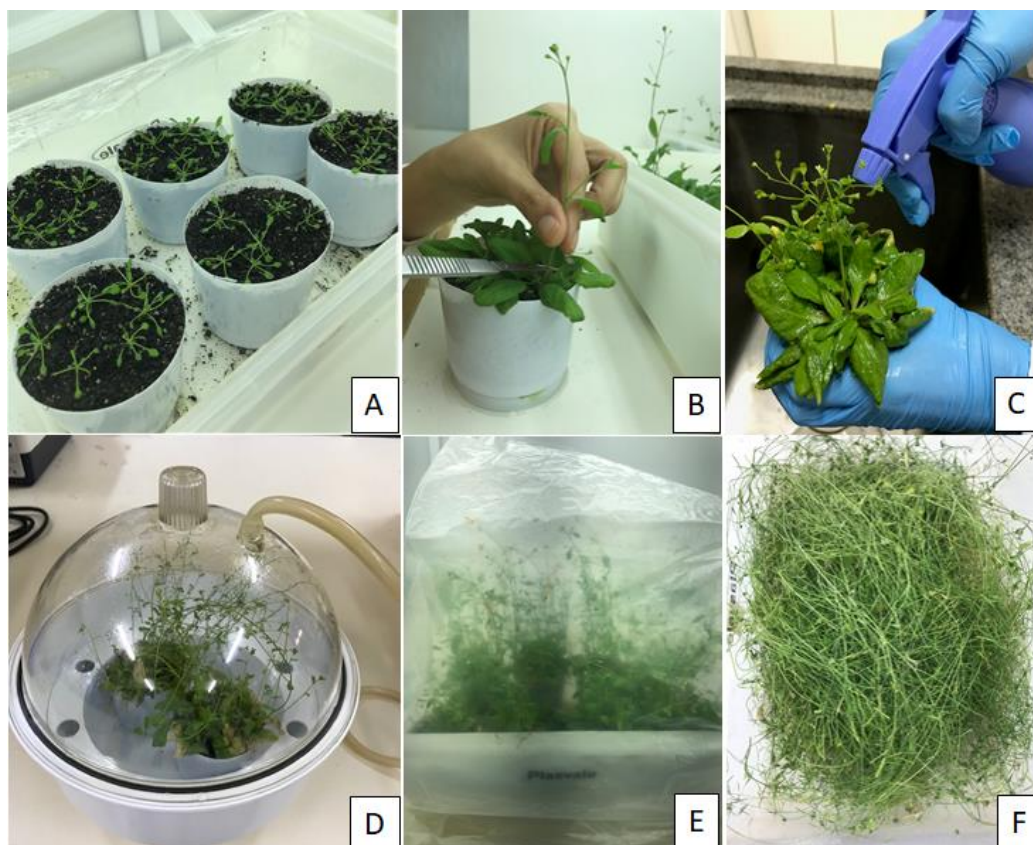
22 Fonte: Elaboração própria autora.

23 3.2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE ARABIDOPSIS THALIANA

24 Plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia 0, foram cultivadas em potes plásticos
 25 de 250 mL, com vermiculita esterilizada, crescidas em solução nutritiva (HOAGLAND;
 26 ARNON, 1950) e mantidas em câmara de crescimento (16 horas de luz/dia e

1 temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$) até o início da floração. Uma semana antes da
2 transformação as hastes foram cortadas, para indução de um maior número de
3 inflorescências. As plantas foram transformadas através do método de micro aspersão
4 manual e vácuo infiltração. Uma colônia isolada de *A. tumefaciens EHA105* contendo
5 o plasmídeo pCAMBIA1381 (*pCcGo/S3::GUS*) foi cultivada em meio LB na presença
6 dos antibióticos rifampicina (25 mg/mL) e canamicina (100 mg/mL), sob agitação de
7 120 rpm em 28°C até atingir a densidade óptica ($\text{OD}_{600} = 0,8$). A suspensão foi
8 centrifugada e o precipitado foi ressuscitado, em solução de sacarose a 5%
9 acrescentado de 99 μL de *Silwet L-77Ag*. Plantas em estágio de floração, foram
10 borrifadas com a suspensão de *A. tumefaciens EHA105* e incubados em vácuo por 5
11 minutos (Figura 2). As plantas foram cobertas com sacos plásticos, permanecendo
12 assim por 24 horas, mantendo um ambiente úmido e propício para a infecção por *A.*
13 *tumefaciens*. Após uma semana as plantas foram re-transformadas com o mesmo
14 método descrito anteriormente, para aumento da eficiência da transformação. As
15 plantas foram então cultivadas, até o momento da coleta de sementes (adaptado de
16 CHUNG; CHEN; PAN, 2000; CLOUGH, 2004; TAGUE; MANTIS, 2006).

1 Figura 2. Transformação de *A. thaliana* com o plasmídeo *pCcGo/S3::GUS*. [(A)
 2 Plantas com 25 dias após desbaste. (B) Corte das hastas uma semana antes da
 3 transformação. (C) Borrifamento da solução com *A. tumefaciens* (*EHA105*) contendo
 4 o plasmídeo *pCcGo/S3::GUS* ressuspendido em solução de sacarose (5%) e Silwet
 5 L-77. (D) vácuo infiltração. (E) plantas cobertas com sacos plásticos por 24 horas. (F)
 6 coleta das sementes].



7
 8 Fonte: Elaboração própria autora.

9 3.2.4 SELEÇÃO DAS SEMENTES TRANSFORMADAS

10 Para a descontaminação superficial, as sementes foram lavadas com etanol
 11 70% por 1 minuto, seguido de incubação por 10 minutos em solução de hipoclorito de
 12 sódio 40% sob agitação constante por 20 minutos. As sementes foram então lavadas
 13 5 vezes, com água destilada esterilizada. Posteriormente, as sementes foram
 14 mantidas no escuro a 4 °C por 5 dias para a quebra de dormência/estratificação das
 15 mesmas.

16 A seleção das sementes transformadas foi realizada em placas contendo meio
 17 MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com os antibióticos cefotaxima (250
 18 mg/mL - utilizado para inibir o crescimento de *A. tumefaciens*) e higromicina (30 mg/L
 19 - seleção das sementes transformadas). As placas foram mantidas em câmara de
 20 crescimento, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após seleção em meio

1 de cultivo *in vitro*, as plantas foram transferidas para recipientes com substrato e uma
2 amostra de folha foi coletada para a análises moleculares. E as plantas aclimatadas,
3 completaram o seu ciclo de desenvolvimento até a obtenção de sementes (seis
4 semanas).

5 3.2.5 CARACTERIZAÇÕES MOLECULARES DE EVENTOS TRANSFORMADOS

6 O DNA genômico foi extraído das folhas de *A. thaliana* usando o método CTAB
7 (Brometo de cetiltrimetilamônio) (DOYLE; DOYLE, 1987). As amostras de DNA
8 extraídas foram visualizadas em gel de agarose a 1% e Nanodrop™ 1000 (Thermo
9 Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) foi utilizado para quantificar a concentração e a
10 qualidade do DNA genômico. As amostras de DNA foram diluídas para 100 ng/μL para
11 análise de PCR. Pares de *primers* foram desenhados utilizando o software Primer
12 Express (Applied Biosystems). A amplificação do DNA genômico foi realizada em uma
13 mistura de 20 μL de volume final com 1X PCR *buffer*, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs
14 mix, 5 mM de cada um dos *primers* senso e antisenso utilizados (Tabela 1), 1 unidade
15 de Taq DNA polimerase e 1 μL de amostra do DNA. A reação de PCR foi realizada
16 em termociclador Applied Biosystem Veriti® a 94°C durante 3 min, seguido por 40
17 ciclos, contendo cada um dos 3 passos: desnaturação durante 1 min a 94°C;
18 anelamento a 54 - 62°C (de acordo com cada primer) foi realizado por 45 segundos;
19 e extensão por 45 segundos a 72°C. A última etapa de extensão foi realizada por 10
20 min a 72°C. O produto de PCR foi analisado em gel agarose a 1,5%, corado com EtBr
21 e visualizado com Transilluminator Loccus Biotecnologia® L-Pix EX.

22 3.2.6 ENSAIO HISTOQUÍMICO DE GUS

23 Para confirmação da inserção do promotor *pCcGoIS3::GUS* nas plantas
24 transformadas de *A. thaliana*, amostras coletadas foram transferidas para microtubos
25 e imersas em solução de *X-Gluc* (NaH₂PO₄.H₂O 0,1 M, K₄Fe(CN)₆.3H₂O 0,0005 M,
26 Na₂EDTA.2H₂O 0,1 M, Triton® X-100 0,1%, x- Gluc 50 mg/mL 1 mM e H₂O na
27 quantidade de 50 mL de volume final de solução). As amostras foram submetidas a
28 câmara de vácuo por 5 minutos para permitir uma máxima infiltração do reagente em
29 todos os tecidos. Posteriormente foram incubadas em estufa a 37°C no escuro por 16
30 horas para avaliação da expressão de *GUS* nos diferentes tecidos da planta. Após o
31 período de incubação as amostras foram lavadas com etanol 70% para interromper a

1 reação e posteriormente com etanol 100% para retirada total da clorofila, e
2 visualização de coloração específica nos tecidos transformados.

3 3.2.7 EXPERIMENTOS DE SIMULAÇÃO DE ESTRESSE ABIÓTICO

4 Para verificar a atividade do promotor através da expressão do gene repórter
5 *GUS* nas plantas transformadas de *A. thaliana* com o vetor *pCcGo/S3::GUS*, foram
6 realizados quatro experimentos de estresse abióticos descritos a seguir. Plantas T3
7 (terceira geração de transformantes) foram selecionadas como mencionado no item
8 2.2.4. Após 15 dias as plantas foram transferidas para uma magenta Box com meio
9 MS até completarem um mês, para o início da realização dos experimentos.

10 3.2.7.1 EXPERIMENTO 1 – DESIDRATAÇÃO

11 3.2.7.1.1 DESIDRATAÇÃO *IN VIVO*

12 As plantas foram retiradas do meio de cultura, removido o excesso de ágar e
13 submetidas à desidratação em temperatura ambiente de 24°C, sobre papel filtro, por
14 um período de 0 à 8 horas. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 4 e 8
15 horas para as análises histoquímicas e de PCR quantitativo em tempo real (RT-
16 qPCR). Duas plantas de cada tempo e condição de estresse foram submetidas a teste
17 histoquímico e nove plantas (três plantas por replicata biológica) foram congeladas
18 em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer a – 80°C até o momento da
19 extração de RNA.

20 3.2.7.1.2 DESIDRATAÇÃO *IN VITRO*

21 Para avaliar *in vitro* o estresse hídrico, nas plantas de *A. thaliana* transformadas
22 com *pCcGo/S3::GUS*, utilizou-se o meio MS (pH 5,6), suplementado com vitaminas
23 (1 mg.L⁻¹), 30 g.L⁻¹ de sacarose e para a solidificação do meio a adição de phytigel 3
24 g.L⁻¹. O meio foi suplementado com o agente osmótico, polietilenoglicol (PEG) 8000,
25 nas concentrações de zero, 10% (-0,05 MPa), 20% (-0,07 MPa) e 30% (-0,12 MPa),
26 diluídos em meio MS. Plantas com um mês de crescimento em magenta box, foram
27 transferidas para as diferentes concentrações de PEG e mantidas em câmara de
28 crescimento (16 horas de luz/dia e temperatura de 22 ± 2°C) por 12, 24 e 48 horas de
29 incubação. Duas plantas de cada tempo e condição de estresse foram submetidas a
30 teste histoquímico e nove plantas (três plantas por replicata biológica) foram

1 congeladas em nitrogênio líquido e armazenado em ultra freezer a – 80°C até o
2 momento da extração de RNA.

3 3.2.7.2 EXPERIMENTO 2 - ESTRESSE SALINO *IN VITRO*

4 Para indução de estresse salino nas plantas de *A. thaliana* transformadas com
5 *pCcGo/S3::GUS*, utilizou-se o meio MS (pH 5,6), suplementado com vitaminas (1
6 mg.L⁻¹), 30 g.L⁻¹ de sacarose e para a solidificação do meio a adição de phytigel 3
7 g.L⁻¹. O meio foi suplementado com o agente estressante, cloreto de sódio (NaCl), nas
8 concentrações de zero, 50 mM, 100 mM e 250 mM, diluídos em meio MS. Plantas,
9 foram transferidas para as diferentes concentrações de NaCl e mantidas em câmara
10 de crescimento (16 horas de luz / dia e temperatura de 22 ± 2°C) por 12, 24 e 48 horas
11 de incubação. Duas plantas de cada tempo e condição de estresse foram submetidas
12 a teste histoquímico e nove plantas (três plantas por replicata biológica) foram
13 congeladas em nitrogênio líquido e armazenado em ultra freezer a – 80°C até o
14 momento da extração de RNA.

15 3.2.7.3 EXPERIMENTO 3 – ESTRESSE FRIO

16 Plantas cultivadas *in vitro* foram retiradas do meio de cultura, removido o
17 excesso de ágar e submetidas por duas horas a temperatura de controle (25°C), 14,
18 10, 6 e 2°C. Para cada temperatura, plantas foram dispostas no banho
19 ultratermostatizado MA-184 Marconi® em tubos de 2 mL (uma planta por tubo), por
20 duas horas. Após esse período as plantas foram retiradas e duas amostras foram
21 submetidas a teste histoquímico e nove plantas (três plantas por replicata biológica),
22 foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenado em ultra freezer a –80°C até
23 o momento da extração de RNA.

24 3.2.7.4 EXPERIMENTO 4 - ACLIMATAÇÃO A BAIXAS TEMPERATURAS

25 Plantas cultivadas *in vitro* foram retiradas do meio de cultura, removido o
26 excesso de ágar. Plantas foram transferidas para banho ultratermostatizado MA-184
27 Marconi® em tubos de 2 mL (uma planta por tubo). A temperatura inicial no
28 experimento foi de 14°C por duas horas. Após esse período a temperatura foi
29 diminuída para 10°C por mais duas horas. Posteriormente, a temperatura foi diminuída
30 para 6°C por mais duas horas e por fim 2°C por mais duas horas.

1 As amostras foram coletadas nas temperaturas de controle (25°C), 14°C (2
2 horas exposição ao frio), 10°C (4 horas), 6°C (6 horas) e 2°C (8 horas). Duas amostras
3 de cada tempo, foram submetidas a teste histoquímico e nove plantas (três plantas
4 por replicata biológica) foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenado em ultra
5 freezer a – 80°C até o momento da extração de RNA.

6 3.2.8 EXTRAÇÃO DO RNA E SÍNTESE DE cDNA

7 O isolamento de RNA total das diferentes amostras foi realizado método do
8 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Foi adicionado 1 mL do
9 reagente Trizol a cada 100 mg de tecido foliar (macerado anterior com nitrogênio
10 líquido, e mantido em freezer – 80°C até o momento da extração), com auxílio de um
11 agitador de tubos do tipo vortex, homogeneizou-se as amostras durante 15 segundos
12 e depois as amostras foram mantidas por 3 minutos a temperatura ambiente. As
13 amostras foram centrifugadas a 12.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi
14 transferido para um novo tubo e foi adicionado 200 µL de clorofórmio, seguido de
15 homogeneização e novamente por 15 segundos e invertidas gentilmente por 5
16 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a
17 12.500 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.
18 Para a precipitação do RNA foram adicionados 500 µL de isopropanol. Os tubos foram
19 invertidos gentilmente por 20 vezes e incubadas a temperatura ambiente por 10
20 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.500 rpm por 15 minutos a 4°C
21 e o RNA recuperado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1
22 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas a 9500 rpm por 5 minutos a 4°C
23 e o sobrenadante foi imediatamente descartado. O precipitado foi seco por cerca de
24 30 minutos no microtubo sobre papel toalha e depois eluído em 30 µL de água livre
25 de *RNAse* para ressuspender o RNA. O RNA isolado foi quantificado em Nanodrop e
26 estocado em ultra freezer (- 80°C).

27 As amostras de RNA foram purificadas com o kit PureLink™ RNA Mini Kit -
28 Invitrogen® de acordo com o protocolo do fabricante.

29 A síntese de DNAs complementares (cDNA) foi realizada utilizando-se o kit
30 GoScript™ Reverse Transcription System da Promega®, segundo o protocolo do
31 fabricante, em um volume final de 20 µL e utilizando 1,50 µg de RNA total.

1 3.2.9 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

2 Os *primers* para os genes *GUS3*, *Tubulina (TUB)* e *Ubiquitina 10 (UBQ10)*
 3 foram desenhados utilizando o software CLC Genomics Workbench v. 9.5.3.27
 4 (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>) e os *amplicons* variaram de 87 a 120 pb com
 5 Tm de 60°C (Tabela 2).

6 Tabela 2. Sequências dos *primers* usados nas análises de RT-qPCR.

<i>Primers ID</i>	Sequências	Amplicon	Eficiência do <i>primer</i>	Referências
<i>GUS3 F</i>	5'- ACCTCGCATTACCCTTACGCTGAA -3'	87 bp	95%	Deste trabalho
<i>GUS3 R</i>	5'- GCCGACAGCAGCAGTTTCATCAAT -3'			
<i>TUB F</i>	5'- TGTTTCAGGCGAGTGAGTGAG -3'	120 bp	96%	Hong et al. (2010)
<i>TUB R</i>	5'- ATGTTGCTCTCCGCTTCTGT -3'			
<i>UBQ10 F</i>	5'- GGTTTGTGTTTTGGGGCCTTG -3'	119 bp	93%	Hong et al. (2010)
<i>UBQ10 R</i>	5'- CGAAGCGATGATAAAGAAGAAGTTCCG -3'			

7 A atividade transcricional foi quantificada através da metodologia de PCR
 8 Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) com a utilização do equipamento 7500 Fast
 9 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os níveis de
 10 expressão gênica foram normalizados utilizando o gene *TUB* como referência no
 11 Experimento de desidratação *in vivo*. Nos demais experimentos foi utilizado o gene
 12 *UBQ10*.

13 As reações foram realizadas com um volume final total de 15 µL com 7,5 µL de
 14 GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0,5 µL de *primer* senso e antisenso (5 µM), 1
 15 µL de cDNA (50 ng/µL) e 5,5 µL de água livre de nucleases. As condições da ciclagem
 16 foram de 95°C por 20 segundos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30
 17 s, seguidas pela análise de curva de dissociação para cada amostra (95°C por 15 s,
 18 60°C por 60 s e 95°C por 15 s).

19 Todas as análises de RT-qPCR foram realizadas com três replicatas biológicas
 20 e três replicatas técnicas. Os dados foram analisados para determinar os valores do
 21 limiar do ciclo (Ct). A especificidade dos produtos de PCR gerados para cada conjunto
 22 de *primers* foi verificada analisando a curva de dissociação dos produtos amplificados.
 23 Os níveis de expressão foram calculados aplicando a fórmula $(1 + E)^{-Ct}$, onde ΔC_{target}
 24 = Gene Ct_{GUS} - Ct_{normalizador} e o $\Delta\Delta Ct = \Delta C_{tGUS} - \Delta C_{tnormalizador}$ (IVAMOTO et al., 2017).
 25 As eficiências de amplificação dos *primers* foram calculadas com o auxílio do software
 26 LinReg PCR (RAMAKERS et al., 2003), com valores de pelo menos 90%. Foram

1 seguidas as recomendações do *MIQE guidelines* para experimentos de RT-qPCR
2 (BUSTIN et al., 2009).

3 3.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

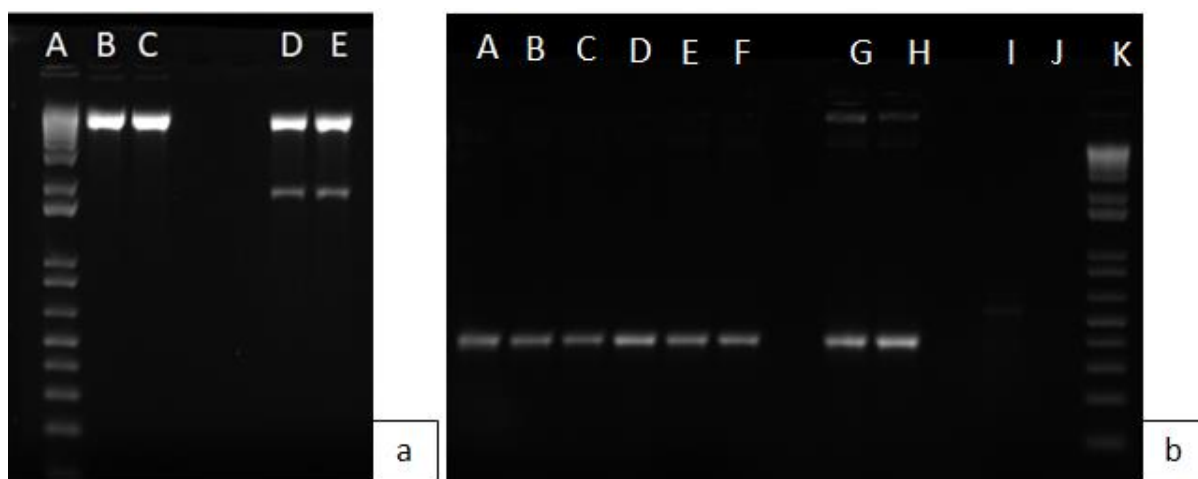
4 A análise estatística dos dados foram realizadas por meio da análise de
5 variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) através do programa
6 XLSTAT (Statistical A significância Software for Excel - <https://www.xlstat.com>).

7 3.3 RESULTADOS

8 3.3.1 VERIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

9 Visando confirmar a inserção do plasmídeo pCAMBIA1381 *pCcGo/S3::GUS*
10 amplificados em *E. coli* linhagem DH5 α e posteriormente em *A. tumefaciens EHA105*,
11 as construções foram verificadas via digestão enzimática utilizando as enzimas de
12 restrição *EcoRI* e *PstI*, gerando o fragmento de restrição esperado de
13 aproximadamente 12 kb (Figura 3a). A confirmação da inserção também foi verificada
14 através de PCR convencional com o par de *primer GUS* (Figura 3b). Para todas as
15 colônias selecionadas, as reações de PCR amplificaram fragmentos de tamanhos
16 esperados de aproximadamente 412 pb. Assim, após a confirmação, essas colônias
17 foram utilizadas para o preparo do inóculo e transformação das plantas de *A. thaliana*.

1 Figura 3. (a) Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão com as
 2 enzimas de restrição. (A) marcador molecular utilizado – 1KB plus; (B e C) Sítios de
 3 restrição da enzima *EcoRI* no vetor pCAMBIA1381; (D e E) Análise dos fragmentos
 4 obtidos após a digestão do vetor pCAMBIA1381 com as enzimas de restrição *EcoRI*
 5 e *PstI*. (b) Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR obtidos a partir
 6 do par de *primers GUS*. (A - F) DNA plasmidial de *EHA105* + pCambia1381. (G e H)
 7 DNA plasmidial *E. coli* linhagem *DH5α* + pCambia1381. (I e J) controles negativos. (k)
 8 marcador molecular utilizado (1KB plus).

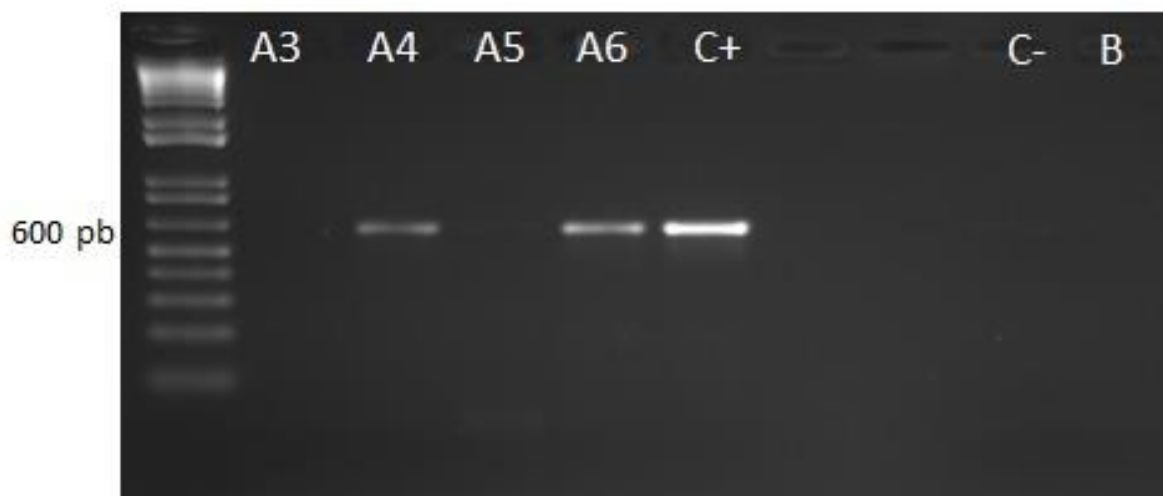


9 Fonte: Elaboração própria autora.

10 3.3.2 TRANSFORMAÇÕES DE *A. THALIANA*

11 A geração T0 (sementes - primeira geração de transformantes) oriundas das
 12 plantas potencialmente transformadas foram coletadas e estocadas a 4°C (geladeira).
 13 Para a seleção das plantas transformadas, as sementes foram semeadas em meio de
 14 cultura MS suplementado com os antibióticos cefotaxima e o agente seletivo
 15 higromicina (30 mg/L). Após um período de 3 semanas, obteve-se uma média de
 16 germinação de 26 possíveis transformantes por aproximadamente 1000 sementes,
 17 com uma eficiência de seleção (sementes T0), de 2,17%. Após a aclimação, foi
 18 confirmado a inserção do transgene (600 pb) via PCR com os *primers* amplificando
 19 parte do promotor e do gene *GUS* (Figura 4), A3 e A5 não apresentaram produto de
 20 amplificação e A4 e A6 apresentaram produto de amplificação de 600 pb, com o
 21 *primers* específicos para a fração do fragmento entre o promotor *GoIS3* e o gene *GUS*.

- 1 Figura 4. Produto amplificado por PCR de plantas de *A. thaliana* T0 regeneradas in
 2 vitro em meio seletivo contendo Higromicina. λ marcador de peso molecular 1 KB DNA
 3 Ladder (Invitrogen). C (+) controle positivo, C (-) controle negativo e branco.



Fonte: Elaboração própria autora.

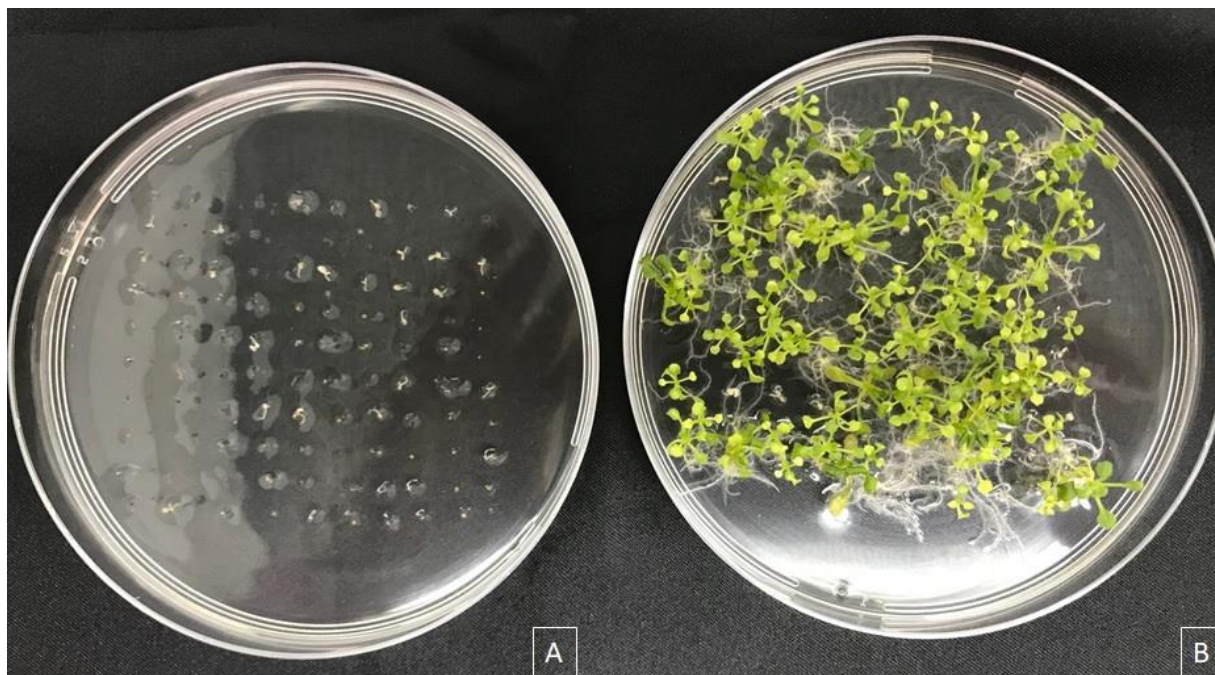
- 4 Após a identificação molecular, as plantas transformadas foram mantidas na
 5 câmara de crescimento para multiplicação de sementes e avanço da geração.
 6 Dois eventos de *A. thaliana*, T0 selecionadas, enumerados como A4 e A6 foram
 7 utilizados para produção da geração das futuras gerações. As sementes foram
 8 selecionadas novamente em meio contendo higromicina. Para cada evento, foram
 9 colocadas 3 placas para germinar contendo 100 sementes cada (Tabela 3 e Figura 5).
 10 Os dois eventos apresentaram segregação mendeliana 3:1 resistente e suscetível
 11 respectivamente, na geração T1.

- 12 Tabela 3. Proporção de segregação dos eventos de *A. thaliana*, na geração T1.

Evento		Positivas	Negativas
A4	Placa 1	75	25
	Placa 2	69	31
	Placa 3	71	29
A6	Placa 1	78	22
	Placa 2	69	31
	Placa 3	74	26

- 13 Fonte: Elaboração própria autora.

1 Figura 5. Seleção de plantas T3 em placas com meio MS suplementado com o agente
2 seletivo higromicina (30 mg.L^{-1}). (A) linhagem selvagem Columbia 0 - não
3 transformadas). (B) plantas da geração T3 com construção *pCcGo/S3::GUS*.



4
5 Fonte: Elaboração própria autora.

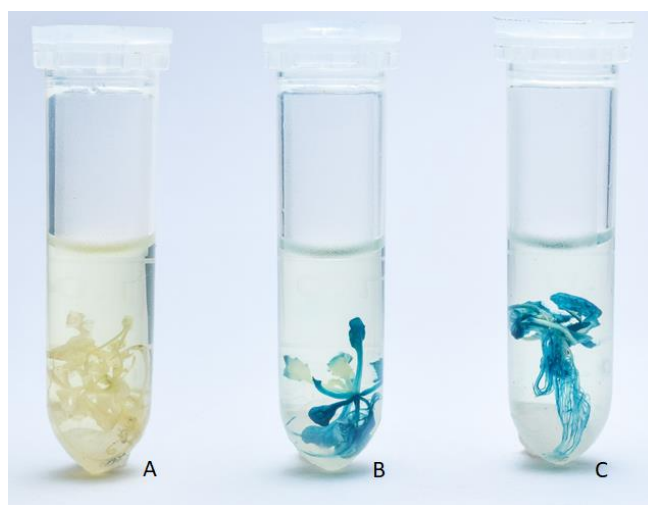
6 As plantas T4 não apresentaram segregação indicando que estas e as plantas
7 T3 utilizadas estavam em homozigose.

8 3.3.3 ENSAIO HISTOQUÍMICO DE GUS

9 As plantas da geração T4 quando submersas em solução com X-Gluc
10 obtiveram reação positiva no ensaio histoquímico (Figura 6).

11

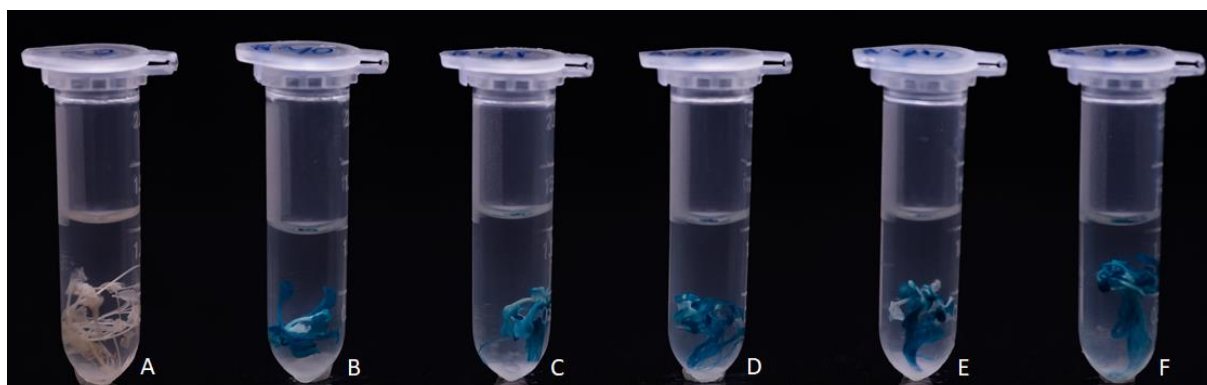
1 Figura 6. Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática β -glucuronidase
 2 (*GUS*) em plantas de *A. thaliana*. (A) Controle negativo, (B e C) geração T4,
 3 transformadas com *pCcGo/S3::GUS*.



4 Fonte: Antônio Neto.

5 Em todos os experimentos de estresse abióticos realizados neste trabalho, a
 6 expressão histoquímica de *GUS* foi avaliada e revelou um forte sinal, com coloração
 7 positiva em diferentes tecidos e regiões, em todas as plantas de *A. thaliana*, com um
 8 mês de idade, contendo a construção *pCcGo/S3::GUS*, conforme observado na Figura
 9 7. Em todos os experimentos realizados, foi observado um padrão de distribuição
 10 variável, em todas as plantas, e expressão do gene *GUS* foi similar. A coloração de
 11 *GUS* também foi observada inclusive no Tempo 0.

12 Figura 7. Expressão de *GUS* dirigida pelo promotor do gene *CcGo/S3* de *Coffea* no
 13 experimento de desidratação em temperatura ambiente, sobre um papel filtro.
 14 Controle negativo (A), controle positivo (B), 1 hora (C), 2 horas (D), 4 horas (E) e 8
 15 horas (F) de desidratação.



16 Fonte: Antônio Neto.
 17

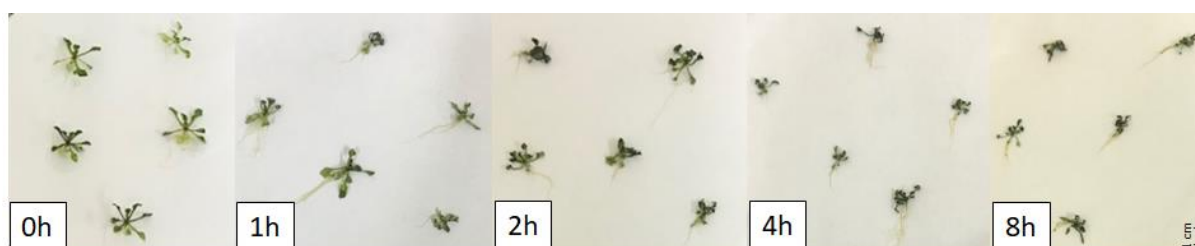
3.3.4 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE ESTRESSES ABIÓTICOS

As plantas em geral, enfrentam estresses abióticos, como seca, alta salinidade e frio (BASHIR et al., 2019). Dentro deste cenário, a sequência do promotor *Go/S*, foi testada quanto a sua capacidade para expressar o gene repórter *GUS* nas plantas geneticamente modificadas de *A. thaliana*, em experimentos de simulação de estresses abióticos. Os resultados obtidos através do o ensaio histoquímico de *GUS* apontou a presença do DNA exógeno nas plantas transgênicas de *A. thaliana*, confirmando a transformação destas plantas. O RT-qPCR, indicaram que os níveis de transcritos do gene *GUS* controlado pelo promotor *CcGo/S3* aumentaram nas plantas estressadas em relação às plantas controle nos experimentos de desidratação *in vivo*, *in vitro* (PEG 10 e 20%), estressa salino (NaCl 50 e 100 mM) e estresse de frio (2, 6 e 10°C).

3.3.4.1 EXPERIMENTO 1.1 – DESIDRATAÇÃO *IN VIVO*

Para caracterizar a resposta do promotor *Go/S*, em plantas transgênicas de *A. thaliana* transformadas com a construção *pCcGo/S3::GUS*, foi realizado um experimento de desidratação, em filtros de papel, mantidas por diferentes tempos (0, 1, 2, 4 e 8 horas). A análise fenotípica demonstrou que as plantas de *A. thaliana* foram afetadas pela desidratação, e os sintomas visuais (murcha) observados, foram intensificados ao longo do desenvolvimento do estresse. É possível observar uma murcha do tecido foliar a partir de 1 hora de experimento e com uma maior intensidade em 8 horas (Figura 8). Em zero hora (0h) a planta foi retirada do cultivo *in vitro* e imediatamente congelada para posteriores análises.

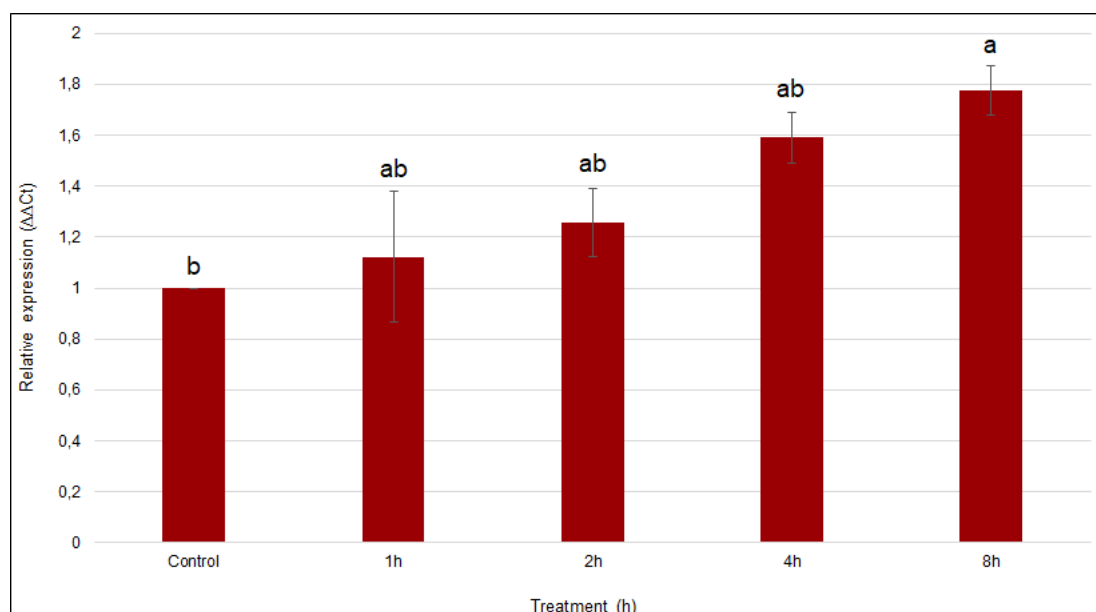
Figura 8. Plantas geneticamente modificadas de *A. thaliana* com a construção *pCcGo/S3::GUS*, submetidas à desidratação em temperatura ambiente e mantidas sobre um filtro de papel por zero, 1, 2, 4 e 8 horas.



26 Fonte: Elaboração própria autora.

1 Análise da expressão via RT-qPCR demonstrou que as plantas transgênicas
 2 de *A. thaliana* apresentaram o maior nível transcricional do gene *GUS* em 8 horas de
 3 tratamento, quando comparadas as plantas controle. Nos tempos 1, 2 e 4 horas, a
 4 atividade transcricional de *GUS* foi similar, entretanto é possível observar uma
 5 tendência no aumento dos níveis de transcritos ao longo do desenvolvimento do
 6 estresse hídrico (Figura 9).

7 Figura 9. Expressão relativa do gene *GUS* com o promotor *CcGo/S3* em plantas de *A.*
 8 *thaliana* submetidas a desidratação em filtros de papel. Barras de erro indicam o
 9 desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente
 10 (Tukey – >0,05).



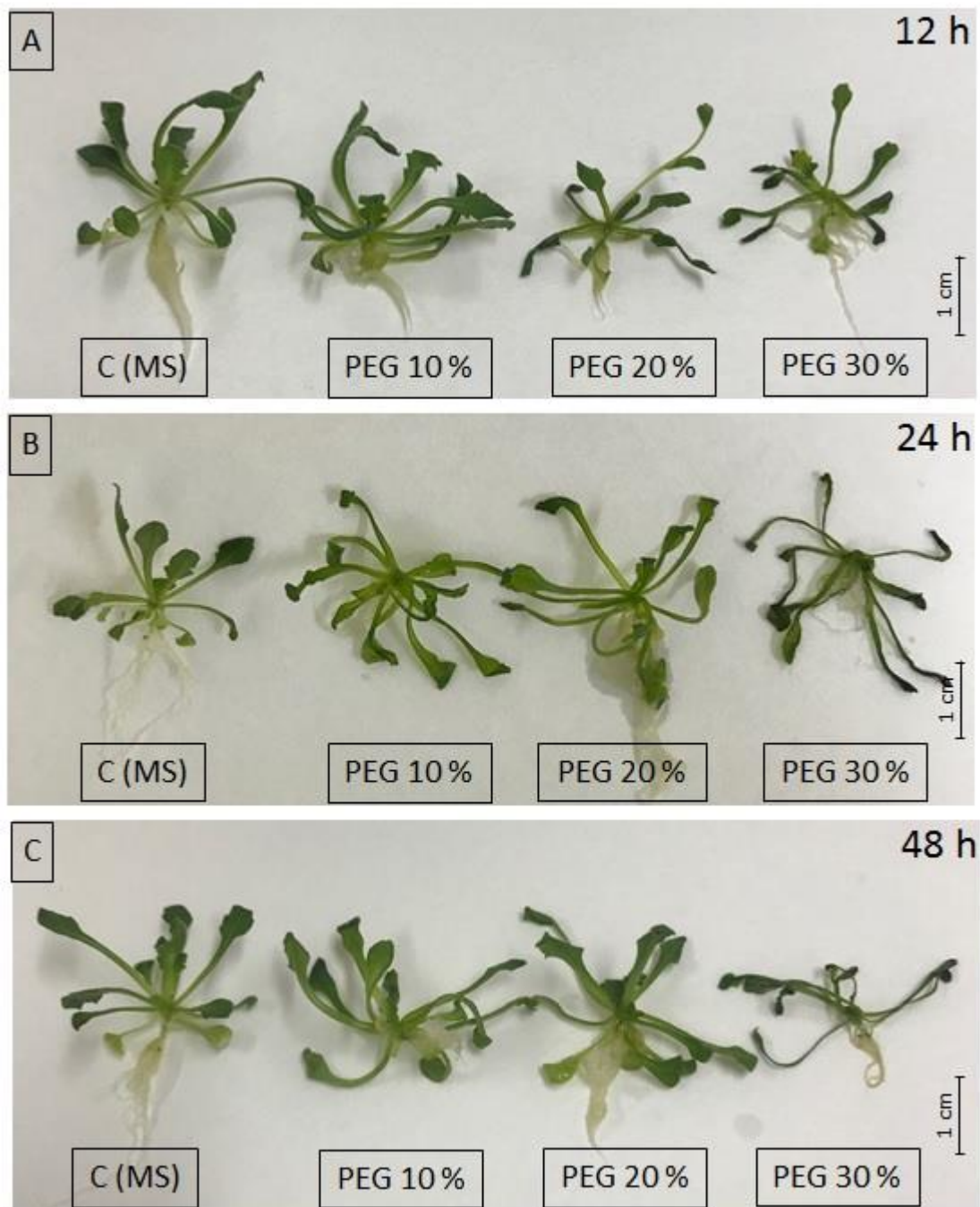
11 Fonte: Elaboração própria autora.

12 3.3.4.2 EXPERIMENTO 1.2 – DESIDRATAÇÃO *IN VITRO*

13 Para caracterizar a resposta do promotor *CcGo/S3*, em plantas transgênicas de
 14 *A. thaliana* que foram transformadas com a construção *pCcGo/S3::GUS*, foi realizado
 15 o experimento de desidratação com o agente osmótico PEG em diferentes
 16 concentrações, para simular condições de estresse hídrico *in vitro*, durante zero, 12,
 17 24 e 48 horas. O PEG foi utilizado por apresentar um alto peso molecular e por não
 18 ultrapassar a parede celular, a sua utilização resulta em um estresse osmótico na
 19 planta, em outras palavras, ele simula os efeitos do processo de desidratação que
 20 ocorre nas plantas submetidas à estresse hídrico (baseado em FU et al., 2016; VAN
 21 DER WEELE et al., 2000).

1 Similarmente ao experimento da desidratação as plantas transgênicas de *A.*
2 *thaliana* apresentaram uma murcha dos tecidos foliares ao longo do teste. Na menor
3 concentração do agente osmótico (PEG 10% (-0,05 MPa)), as plantas apresentaram
4 fenótipo semelhante ao controle (C), em todos os tempos do experimento. Na
5 concentração intermediária (PEG 20% (-0,07 MPa)) o início da murcha foliar pode ser
6 observado a partir de 12 horas (Figura 10). A maior redução no tamanho nas plantas,
7 ocorreu ao utilizarmos a concentração superior (PEG 30% (-0,12 MPa)), assim como
8 ao longo do desenvolvimento do experimento (Figura 10). As diferentes
9 concentrações de PEG (10, 20 e 30%) interfeririam, em maior grau, nos danos sofridos
10 pelas plantas, quando comparados à exposição ao estresse ao longo do tempo
11 (Figura 10).

- 1 Figura 10. Plantas transgênicas de *A. thaliana* com a construção *pCcGolS3::GUS*, em
2 cultivo *in vitro* e submetidas ao estresse hídrico *in vitro* (PEG) por zero (controle), 12
3 (A), 24 (B) e 48 horas (C).



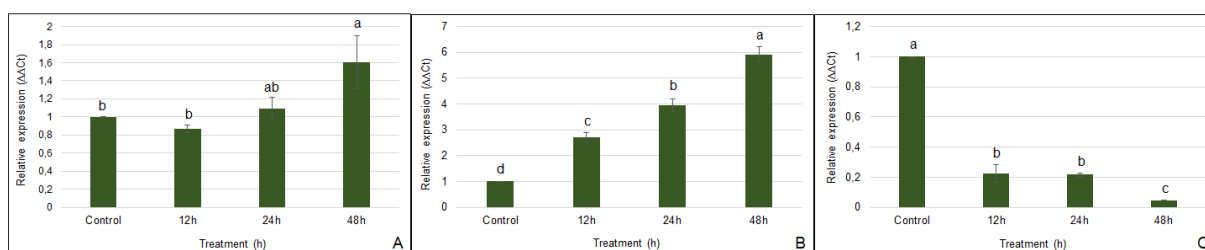
4
5 Fonte: Elaboração própria autora.

- 6 As análises de atividade transcricional de *GUS* evidenciaram que as plantas
7 transgênicas de *A. thaliana* na concentração inicial (PEG 10%) apresentaram um
8 maior nível de expressão após 48 horas de tratamento em relação ao controle, 12 e
9 24 horas, onde não houve diferenças estatísticas (Figura 11 A).

1 Para a concentração intermediária (PEG 20%) as plantas de *A. thaliana*
 2 apresentaram seus maiores níveis de transcrição em relação aos tratamentos PEG
 3 10 e 30% (Figura 11 B). Um nível de expressão crescente ocorreu ao longo do
 4 tratamento, com diferença estatística nos quatro pontos observados. O número de
 5 transcritos em 12 horas de tratamento, aumentou em relação as plantas controle.
 6 Após 24 horas, os níveis transcripcionais de *GUS* aumentaram em relação ao período
 7 de 12 horas. Com 48 horas de exposição ao estresse, as plantas aumentaram quase
 8 200% os níveis transcripcionais do gene *GUS*, em relação ao período de 12 horas e
 9 600% com relação ao controle (Figura 11 B).

10 Na concentração final deste experimento (PEG 30%), ocorreu uma redução no
 11 nível transcricional do gene *GUS* com relação ao controle, nos tempos 12 e 24 horas.
 12 Ocorreu uma maior redução de transcritos do gene *GUS* em 48 horas de experimento
 13 com um resultado muito similar as análises fenotípicas (Figura 11 C).

14 Figura 11. Expressão relativa do gene *GUS* com o promotor *CcGo/S3* em plantas de
 15 *A. thaliana* submetidas a desidratação *in vitro* com PEG. Barras de erro indicam o
 16 desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente
 17 (Tukey – $p > 0,05$). (A) PEG 10%; (B) PEG 20% e (C) PEG 30%.

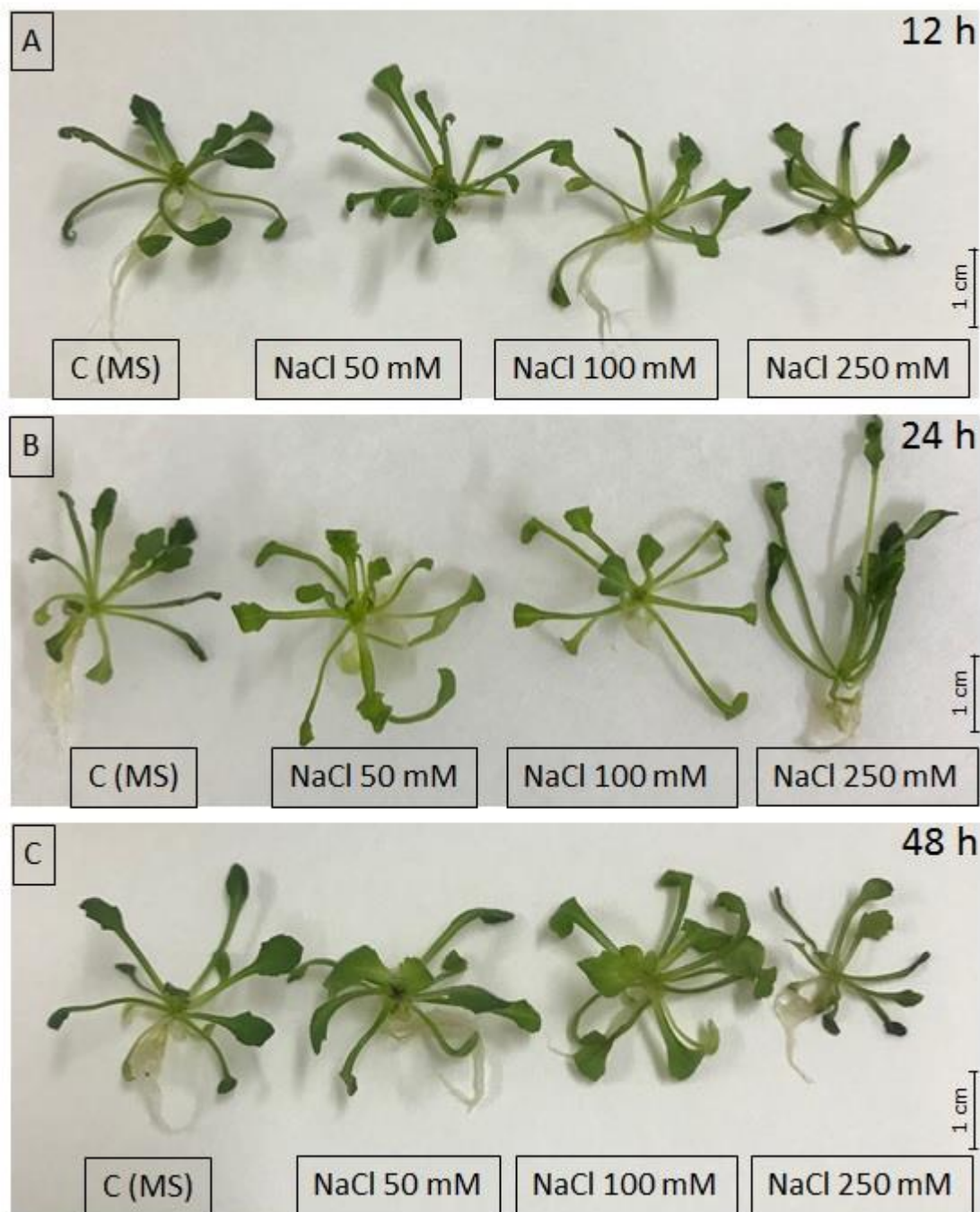


18
 19 Fonte: Elaboração própria autora.

20 3.3.4.3 EXPERIMENTO 2 - ESTRESSE SALINO *IN VITRO*

21 Plantas de *A. thaliana* com um mês de idade foram expostas ao estresse salino,
 22 em diferentes concentrações, nos tempos de zero, 12, 24 e 48 horas. Foi possível
 23 observar, que os resultados apontam para uma redução dos tecidos nas plantas
 24 transgênicas de *A. thaliana*, em especial na concentração superior, de 250 mM de
 25 NaCl, onde a proporção de área foliar, visualmente foi reduzida (Figura 12). Pode-se
 26 notar uma similaridade, entre as plantas controle e as concentrações de 50 e 100 mM
 27 de NaCl, onde a princípio, não houve diferença visual entre elas nessas condições ao
 28 longo dos tempos impostos. Porém as plantas na concentração de 250 mM
 29 apresentaram um maior nível de murcha foliar (Figura 12).

- 1 Figura 12. Plantas transgênicas de *A. thaliana* com a construção *pCcGolS3::GUS*, em
2 cultivo in vitro e submetida ao NaCl em diferentes concentrações, em ambiente
3 controlado e em diferentes períodos por zero (controle), 12 (A), 24 (B) e 48 horas (C).



- 4 Fonte: Elaboração própria autora.

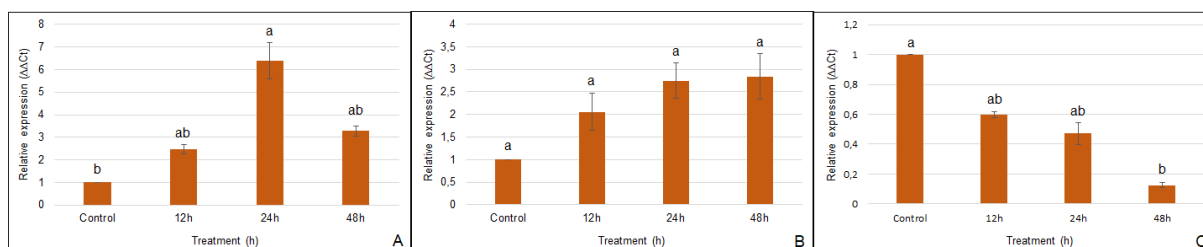
- 5 Nas análises de RT-qPCR para o estresse salino inicial (50 mM) as plantas de
6 *A. thaliana* apresentaram seus maiores níveis de transcritos em relação aos
7 tratamentos seguintes de NaCl 100 e 250 mM. No período de 24 horas com o NaCl
8 50 mM, o gene *GUS* teve seu nível de transcritos aumentado, cerca de 600% maior

1 que o controle, nesta condição de estresse salino. Nas 48h de estresse salino, o nível
 2 de expressão foi reduzido, e se manteve estatisticamente ao tratamento 12 horas
 3 (Figura 13 A).

4 Para o estresse salino médio de 100 mM, não foi possível identificar uma
 5 diferença estatística entre níveis de transcritos do gene *GUS*, que foram semelhantes
 6 aos níveis observados nas plantas controle (Figura 13 B).

7 Na concentração final deste experimento (NaCl 250 mM), ocorreu um padrão
 8 verificado no experimento de desidratação *in vitro* (PEG 30%) onde verificou-se um
 9 maior nível transcricional do gene *GUS* no tratamento controle, estatisticamente
 10 significativo em relação aos demais tempos, devido ao estresse imposto
 11 provavelmente, ter sido excessivo. Pode-se notar uma redução na expressão nos
 12 tempos 12 e 24 horas. Ocorreu uma maior redução de transcritos do gene *GUS* após
 13 48 horas de experimento, com uma semelhança com as análises fenotípicas (Figura
 14 13 C).

15 Figura 13. Expressão relativa do gene *GUS* com o promotor *CcGo/S3* em plantas de
 16 *A. thaliana* submetidas a estresse salino *in vitro*. Barras de erro indicam o desvio
 17 padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey –
 18 $p > 0,05$) (A) NaCl 50 mM; (B) NaCl 100 mM e (C) NaCl 250 mM.



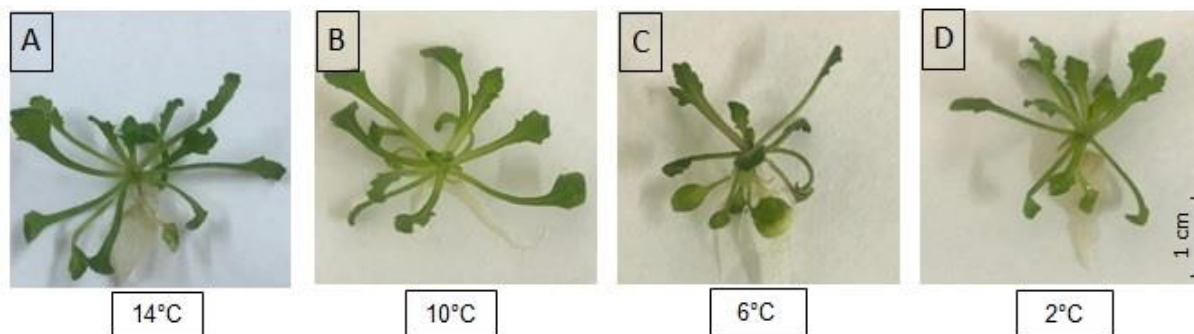
19 Fonte: Elaboração própria autora.

20 3.3.4.4 EXPERIMENTO 3 – ESTRESSE FRIO

21 Foi verificado a resposta do promotor *pCcGo/S3::GUS* diante ao estresse de
 22 frio, em plantas transgênicas de *A. thaliana*, submetidas por duas horas a temperatura
 23 de 14, 10, 6 e 2°C. Visualmente, as plantas de *A. thaliana*, não apresentaram
 24 alterações morfológicas que indicassem diferenças nos danos causados pelas baixas
 25 temperaturas (Figura 14).

26

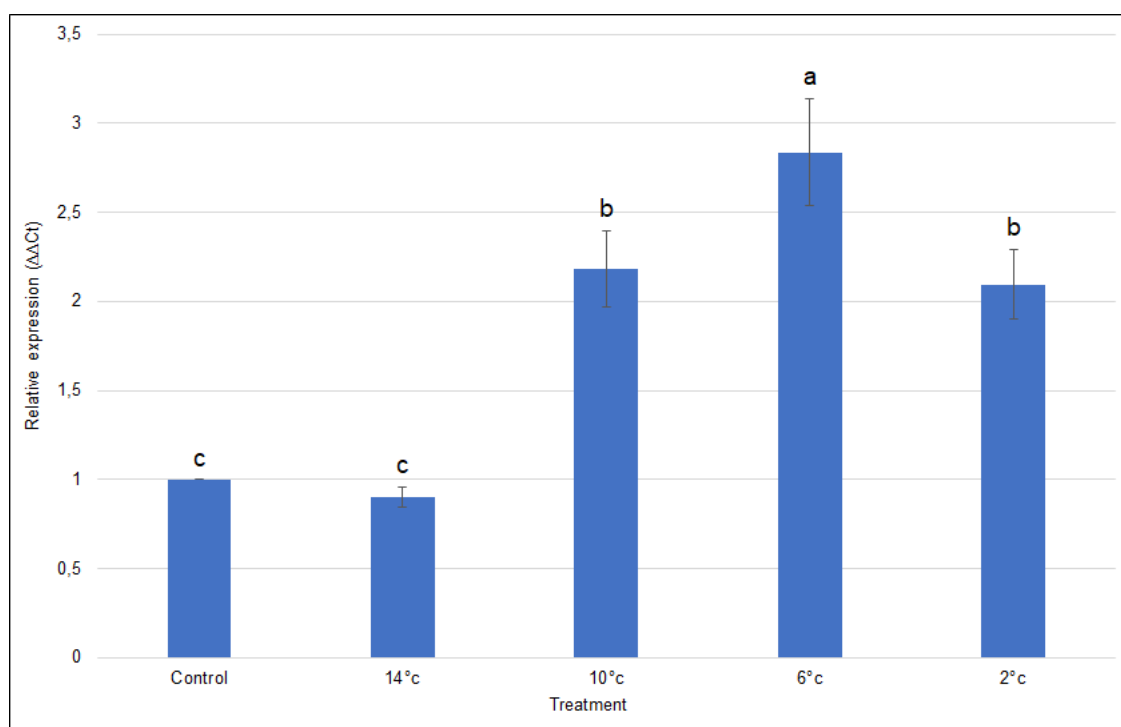
1 Figura 14. Plantas de *A. thaliana*, retiradas do cultivo *in vitro* e submetida à estresse
 2 de frio por duas horas à 14°C (A), 10°C (B), 6°C (C) e 2°C (D).



3
 4 Fonte: Elaboração própria autora.

5 Os resultados obtidos através das análises do RT-qPCR demonstraram que as
 6 plantas de *A. thaliana* a 14°C mantiveram um mesmo nível de expressão do gene
 7 *GUS* das plantas não estressadas (controle). Para as temperaturas de 10°C e 2°C, foi
 8 verificado um aumento de mais de 100% na expressão do gene *GUS*. Na temperatura
 9 de 6°C os níveis de transcritos foram 250% maiores do que as plantas não
 10 estressadas (Figura 15).

11 Figura 15. Expressão relativa do gene *GUS* com o promotor *CcGo/S3* em plantas de
 12 *A. thaliana* submetidas a estresse de frio. Plantas foram submetidas a duas horas de
 13 frios a diferentes temperaturas. Barras de erro indicam o desvio padrão. As colunas
 14 seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey – $p > 0,05$).

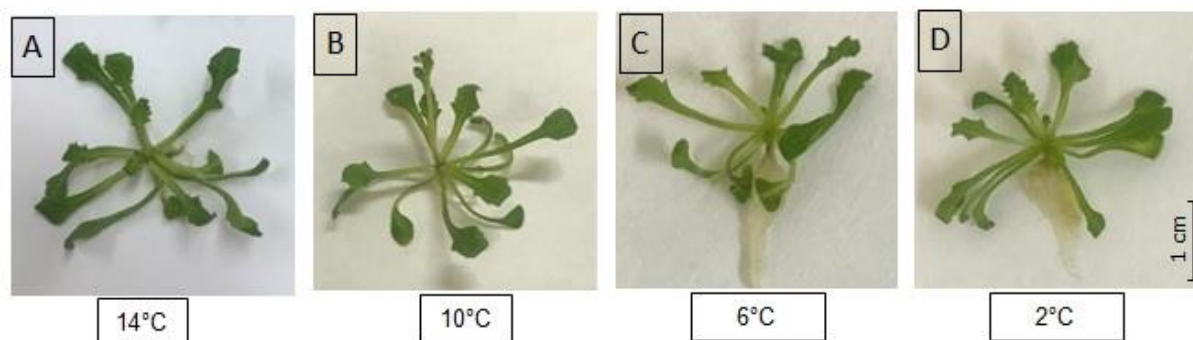


15 Fonte: Elaboração própria autora.

3.3.4.5 EXPERIMENTO 4 - ACLIMATAÇÃO A BAIXAS TEMPERATURAS

Neste experimento, procurou-se verificar o funcionamento do promotor *CcGo/S3* durante o processo de aclimação da planta a temperaturas mais baixas. A temperatura inicial no experimento foi de 14°C por duas horas. Após esse período a temperatura foi reduzida para 10°C por mais duas horas. Posteriormente, a temperatura foi diminuída para 6°C por mais duas horas e por fim 2°C por mais duas horas. Inicialmente, não houve diferença no aspecto visual entre as plantas de *A. thaliana* geneticamente modificadas contendo a construção *CcGo/S3::GUS* e nem na regulação do gene *GUS* nos diferentes tratamentos impostos (Figura 16).

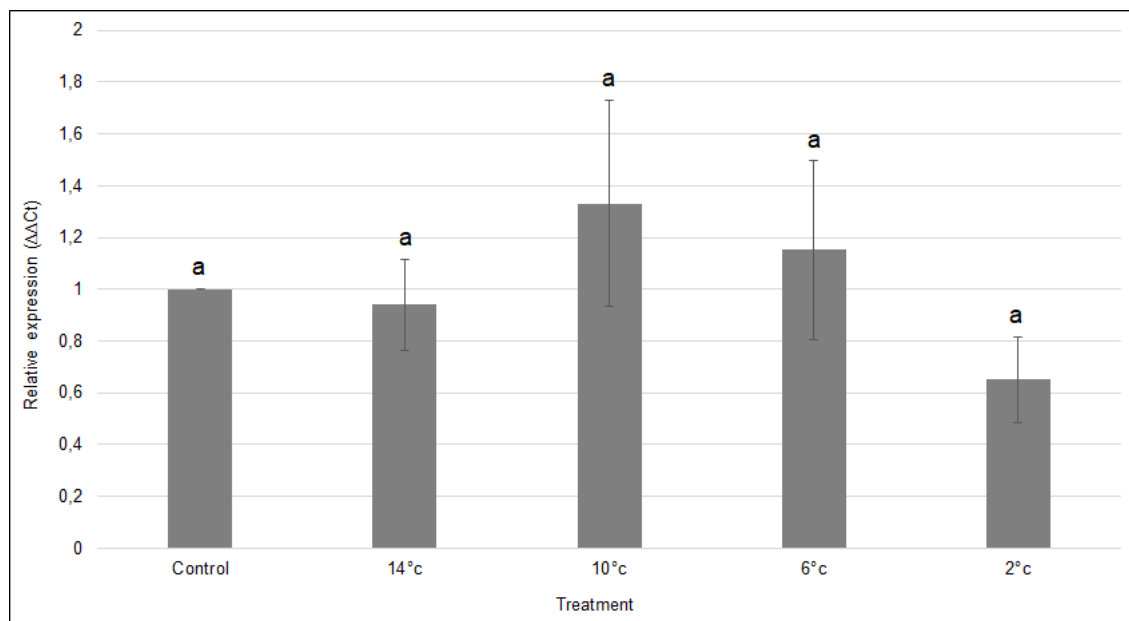
Figura 16. Plantas de *A. thaliana* com um mês de idade, retiradas do cultivo *in vitro* e submetida à aclimação em diferentes temperaturas, 14°C (A), 10°C (B), 6°C (C) e 2°C (D).



Fonte: Elaboração própria autora.

Assim como na análise morfológica, não foi observado diferenças no aumento ou redução dos transcritos durante o processo de aclimação das plantas (Figura 17).

- 1 Figura 17. Expressão relativa do gene *GUS* com o promotor *CcGo/S3* em plantas de
2 *A. thaliana* submetidas a aclimação a baixas temperaturas. Barras de erro indicam
3 o desvio padrão. As colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente
4 (Tukey – $p > 0,05$).



Fonte: Elaboração própria autora.

1 3.4 DISCUSSÃO

2 Para entender a base molecular da resposta ao estresse e identificar um
3 possível promotor candidato para o melhoramento genético do café em relação a
4 estresses abióticos como seca, salinidade e desidratação, o promotor *pCcGoIS3* foi
5 caracterizado, clonado e validado neste estudo. A seleção apropriada de um promotor
6 tornou-se cada vez mais importante para a aplicação bem-sucedida da biotecnologia
7 na transformação genética de plantas. Os promotores estresse induzido ou tecidos
8 específicos são de grande valor, pois podem eliminar gastos energéticos
9 desnecessários devidos a expressão constitutiva de outros promotores apresentando
10 uma expressão do transgene de acordo com as condições ambientais e nos tecidos
11 específicos em culturas comerciais (KORAMUTLA et al., 2016; LIU et al., 2019; YANG
12 et al., 2013).

13 Assim, os promotores podem ser classificados como constitutivos, os tecido-
14 específico e os estresses-induzidos (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014). Estes
15 dois últimos apresentam como vantagem a redução do gasto energético da expressão
16 constitutiva de um gene (AYUB et al., 2019; DE AQUINO et al., 2018; ESTRADA-
17 MELO et al., 2015). Os promotores estresse-induzido ou tecido-específico podem ser
18 inseridos em plantas com o objetivo de aumentar a tolerância das mesmas, através
19 da produção de proteínas específicas, apenas quando expostas ao estresse, evitando
20 assim o desperdício de energia pela planta (PANDEY et al., 2019; WYDRA, 2018;
21 XIONG et al., 2016).

22 Diversos estudos para o gene da *galactinol sintase*, descrevem que a sua
23 atividade transcricional é aumentada especialmente em condições de estresse hídrico
24 e salino (DOS SANTOS et al., 2011, 2015; ZHOU et al., 2014; Li et al. 2018), e isto se
25 deve principalmente pelas características (motivos e fatores de transcrição) da sua
26 região promotora. Em *A. thaliana*, as isoformas *AtGoIS1* e *AtGoIS2* foram induzidas
27 por estresse hídrico, salino e calor, mas não responderam ao estresse pelo frio. No
28 entanto, a isoforma *AtGoIS3* foi apenas induzida pelo frio (TAJI et al., 2002). Níveis
29 significativamente altos de galactinol e rafinose, foram observados durante o estresse
30 pelo frio (0 e 5°C), em plantas transgênicas de arroz (*O. sativa* L.), com o gene *TaGoIS*
31 de trigo (*Triticum aestivum* L.) revelando uma maior tolerância destas plantas por este
32 estresse (SHIMOSAKA; KENJIROU, 2015). Resultados semelhantes para os genes
33 de *GoIS* foram observados em *Ammopiptanthus nanus* positivamente regulados em

1 baixas temperaturas (LIU et al., 2016), em mandioca (*MeGoIS*) em experimentos de
2 estresse hídrico, salino e de estresse pelo frio (WANG et al., 2014).

3 Nosso estudo caracterizou a resposta da região promotora do gene de
4 *galactinol sintase* de *C. canephora* (*CcGoIS3*) para diferentes estresses abióticos. O
5 promotor seguido pelo gene repórter da β -glucuronidase (*GUS*) foi transformado em
6 plantas de *A. thaliana* que foram submetidas a estresses hídrico, salino e de baixa
7 temperatura. *CcGoIS3* é um gene ortólogo ao previamente descrito em *C. arabica*
8 (*CaGoIS3*) (DOS SANTOS et al., 2011). Segundo os mesmos autores, *CaGoIS3*,
9 apresentou um aumento acentuado de transcritos em café, quando expostos a um
10 estresse hídrico moderado e severo e salino. Além disto, este promotor foi escolhido
11 de acordo com as análises descritas no Capítulo 1 (motivos relacionados a respostas
12 a estresses abióticos), evidenciando o seu potencial uso como um promotor estresse-
13 induzido.

14 *Arabidopsis* foi escolhida para a transformação por ser um organismo modelo
15 e por ter sido utilizada por diversos estudos similares ao nosso (CARLOS-HILARIO et
16 al., 2014; HUANG et al., 2019; LIU et al., 2019). O protocolo de transformação
17 estabelecido por este trabalho foi eficiente e porcentagem de seleção de plantas
18 transformadas de 2,17%, similar a encontrada em outros trabalhos. Como descrito por
19 Clough e Bent (1999) pelo método floral dip, com a inserção do gene *GUS* esteve
20 eficiência de transformação de 0,1 a 3%. Pelo método de vácuo infiltração com o gene
21 *sod1*, a eficiência de transformação foi de 1,76% e para o método de floral *dip* foi de
22 2,09% (CHUNG; CHEN; PAN, 2000). Recentemente, a porcentagem por vácuo e floral
23 *dip* via *Agrobacterium* na planta modelo de *Bassica rapa*, resultou em uma taxa de
24 eficiência de 0,1% (por 1000 sementes na geração T1) (HU et al., 2019).

25 Neste trabalho, observamos a atividade histoquímica de *GUS* ocorreu em todos
26 os tecidos de *A. thaliana* analisados (folha, raiz e caule), ou seja, não houve expressão
27 espacial diferencial. Esta análise mostra que o promotor *CcGoIS3*, apresenta padrão
28 tecido-específico em plantas de *A. thaliana*. Isto também já foi observado em plantas
29 de tabaco transformadas com o promotor do gene da galactinol sintase
30 (*BhGoIS1::GUS*) de *Boea hygrometrica* (WANG et al., 2009), com o promotor do gene
31 DREB1 (*CcDREB1D*) de *C. canephora*, e com o gene *PtrGoIS* de *Populus trichocarpa*
32 (ZHOU et al., 2014). Porém, em um estudo anterior foi observado diferenças na
33 expressão dos genes *GoIS* de *C. arabica* nos diferentes tecidos de cafeeiros (DOS
34 SANTOS et al., 2011). Estes autores verificaram, através de PCR semi-quantitativa,

1 que a isoforma *CaGo/S1* apresentou mais transcritos em folhas, *CaGo/S2* apresentou
2 os menores níveis em quase todos os tecidos e *CaGo/S3* apresentou altos índices de
3 atividade transcricional em flores e raízes. Em *Solanum lycopersicum*, o maior nível
4 de expressão foi detectado em partes de frutos, plântulas e pericarpo (FILIZ; OZYIGIT;
5 VATANSEVER, 2015).

6 Para verificar a possibilidade do promotor *CcGo/S3* ser estresse-induzido, as
7 plantas transgênicas de *A. thaliana* foram submetidas a diversos experimentos de
8 simulação de estresses abióticos (hídrico, salino e de baixa temperatura).

9 Os resultados indicaram que o promotor *CcGo/S3* foi induzido a produzir mais
10 transcritos do gene *GUS* quando as plantas transgênicas foram expostas aos
11 estresses hídrico, salino e de temperatura (Figuras 9, 11 A, 11 B, 13 A, 13 B e 15).
12 Além disso, em alguns casos, foi observado um aumento gradual desses transcritos
13 ao longo do estresse hídrico e salino, evidenciando que este promotor foi altamente
14 responsivo a estes dois estresses. Desta forma, apesar da expressão do gene *GUS*
15 em plantas sem estresse, podemos classificar o promotor *CcGo/S3* como um promotor
16 de café estresse-induzido para os estresses hídrico, salino nas concentrações iniciais
17 e intermediárias de tratamento, e também para o estresse frio, onde a transcrição do
18 gene *GUS*, conduzido por promotor *CcGo/S3* foi o dobro das plantas sem estresse.

19 Resultados semelhantes foram obtidos com o promotor estresse-induzido
20 *OsGo/S* (*O. sativa*), em *A. thaliana*, evidenciando a expressão do gene *GUS*, duas ou
21 três vezes maior que o controle, em resposta a estresses abióticos por PEG e NaCl
22 (MUKHERJEE et al., 2019). Resultados obtidos por Liu et al. (2019) também
23 revelaram que o promotor *PsDREB2* (*Paeonia suffruticosa*) nos tratamentos com
24 NaCl, frio, PEG e ABA, desencadeou níveis transcricionais elevados de *GUS* em
25 plantas de *A. thaliana*. Além destes, um estudo com o promotor estresse-induzido
26 *OsRGLP2* (*O. sativa*) dirigindo o gene *GUS*, Ayub et al. (2019) observou uma alta
27 expressão de *GUS* em plantas tabaco, nos tratamentos realizados com estresse
28 abiótico por PEG e NaCl.

29 Nos tratamentos com a maior concentração dos agentes estressantes PEG
30 (30%) e NaCl (250 mM) onde as plantas de *A. thaliana* demonstraram uma diminuição
31 no nível de expressão do gene *GUS*, os resultados foram similares ao observado por
32 Yu et al. (2019) com o promotor estresse induzido de soja *miR169c* em *A. thaliana* e
33 Wang et al. (2017) com promotor estresse induzido de *Cucumis sativus* CsSAMs, em
34 tabaco.

1 Apesar do promotor *CcGo/S3* apresentar-se como um bom candidato para
2 regular os transcritos de genes relacionados ao aumento da tolerância das plantas
3 frente a estes estresses, faz-se necessário mencionar que também foi observado a
4 expressão do gene *GUS* nas plantas controle. Entretanto, em trabalhos prévios no
5 laboratório (DOS SANTOS et al., 2011) observou uma expressão estresse-induzido e
6 tecido-específico deste gene, em café.

7 Neste trabalho realizamos o teste de um promotor de café em plantas
8 geneticamente modificadas de *A. thaliana*, onde constatado no primeiro capítulo, a
9 identificação de *cis*-elementos no promotor *Go/S* relacionados em maior número com
10 ABA. Diversos estudos demonstram que *A. thaliana* é uma planta altamente
11 responsiva ao ABA (BENSON et al., 2015; HUANG; JANDER, 2017; SATO et al.,
12 2018). Como trabalhos anteriores com cafeeiros demonstram que o gene *Go/S*
13 apresenta atividade específica para seca (DOS SANTOS et al. 2011; 2015), é possível
14 que, devido à presença desses elementos, o promotor *CcGo/S3* se comporte diferente
15 em *A. thaliana*, ocasionando o efeito *leaky*. Este fato já foi observado para outros
16 promotores estresse-induzidos descritos na literatura, como o *rd29A* de *A. thaliana*
17 inseridos em tomate (ESTRADA-MELO et al. , 2015), *rd29A* e *rd29B* inseridos em soja
18 (BIHMIDINE; LIN; STONE, 2013) e *OsGo/S* em arroz (MUKHERJEE et al., 2019).

19 No entanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, apesar
20 desta atividade basal, houve um aumento considerado de transcritos de *GUS* em
21 diferentes estresses abióticos. Portanto o promotor *CcGo/S3*, pode ser usado em
22 futuros trabalhos de engenharia e melhoramento genético, cujo foco é a regulação da
23 expressão de determinados genes de interesse que possibilitem a planta suportar
24 melhor períodos de estresse abiótico.

25 3.5 CONCLUSÕES

26 Neste estudo, isolamos e analisamos o promotor do gene *CcGo/S3*, e
27 observamos que ele é um potencial promotor estresse-induzido pois foi ativado
28 durante os estresses abióticos, como déficit hídrico, salino e baixa temperatura em
29 plantas de *A. thaliana*. Estes resultados auxiliam o aumento na compreensão do
30 funcionamento do promotor *CcGo/S3*. Em futuros trabalhos, este promotor pode ser
31 usado para expressão de genes alvo como RFOs e possivelmente reduzir os danos
32 causados por estresses abióticos.

1 3.6 REFERÊNCIAS

- 2 AERTS, R.; HONNAY, O. Protecting coffee from intensification Measuring merit : Take
3 2 the risk Protecting coffee from intensification. **Science**. n. JANUARY, 2015.
- 4 ATKINSON, N. J.; JAIN, R.; URWIN, P. E. The Response of Plants to Simultaneous
5 Biotic and Abiotic Stress. In: MAHALINGAM, R. (Ed.). . **Combined Stresses in**
6 **Plants: Physiological, Molecular, and Biochemical Aspects**. Cham: Springer
7 International Publishing. p. 181–201, 2015.
- 8 AYUB, S. et al. *OsRGLP2* promoter derived *GUS* expression in transgenic tobacco in
9 response to salicylic acid, H₂O₂, PEG, NaCl and auxins. **Plant Gene**, v. 19, p. 100190,
10 2019.
- 11 BASHIR, K. et al. Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in
12 response to drought, salinity, heat, and cold stress. **F1000Research** vol. 8 F1000
13 Faculty Rev-658. 2019, doi:10.12688/f1000research.18424.1
- 14 BENSON, C. L. et al. Abscisic acid analogs as chemical probes for dissection of
15 abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 113, p. 96–107,
16 2015.
- 17 BIHMIDINE, S.; LIN, J.; STONE, J. M. Activity of the *Arabidopsis RD29A* and *RD29B*
18 promoter elements in soybean under water stress. **Planta**. p. 55–64, 2013.
- 19 BUNN, C. et al. **A bitter cup: climate change profile of global Arabica and Robusta**
20 **production**. (A. S. I. du Café, Ed. Paris, France: Association Scientifique Internationale
21 du Café (ASIC), 2014.
- 22 BUNN, C. et al. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and
23 Robusta coffee. **Climatic Change**, v. 129, n. 1–2, p. 89–101, 2015.
- 24 BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of 12
25 Quantitative Real-Time PCR Experiments SUMMARY. **Clin Chem**. v. 622, p. 611–622, 13
26 2009.
- 27 CARLOS-HILARIO, L. et al. Identification and Characterization of Papaya (*Carica*
28 *papaya*, L.) Promoters by Heterologous Expression as eGFP Fusions in *Arabidopsis*
29 *thaliana*. **Tropical Plant Biology**, v. 7, n. 3–4, p. 85–99, 2014.
- 30 CHUNG, M. H.; CHEN, M. K.; PAN, S. M. Floral spray transformation can efficiently
31 generate *Arabidopsis* transgenic plants. **Transgenic Research**, v. 9, n. 6, p. 471–476,
32 2000.
- 33 CLOUGH, S. J. Floral Dip: Agrobacterium-Mediated Germ Line Transformation. In: 24
34 PEÑA, L. (Ed.). **Transgenic Plants: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana 25
35 Press. p. 91–101, 2004.
- 36 CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium*-
37 mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J**. v. 16, n. June 1998, p. 735–
38 743, 1999.

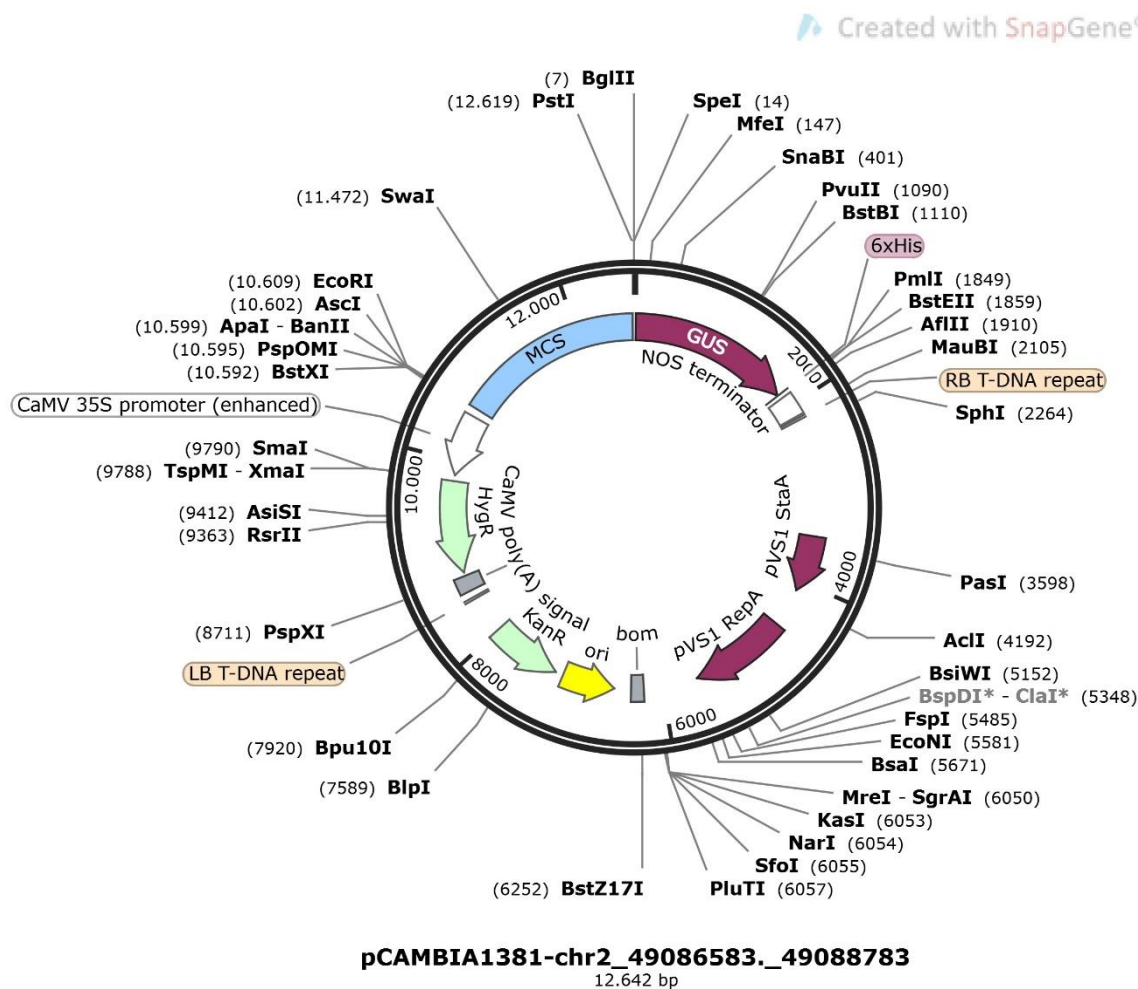
- 1 DE AQUINO, S. O. et al. Functional analysis of different promoter haplotypes of the 32
2 coffee (*Coffea canephora*) *CcDREB1D* gene through genetic transformation of 33
3 *Nicotiana tabacum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 2, p. 279–294, 34
4 2018.
- 5 DOS SANTOS, T. B. et al. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea* 37
6 *arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses.
7 38 **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 441–448, 2011.
- 8 DOS SANTOS, T. B. et al. Galactinol synthase transcriptional profile in two genotypes 41
9 of *Coffea canephora* with contrasting tolerance to drought. **Genetics and Molecular** 42
10 **Biology**, v. 38, n. 2, p. 182–190, 2015.
- 11 DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of 45
12 fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- 13 ESTRADA-MELO, A. C. et al. Overexpression of an ABA biosynthesis gene using a
14 stress-inducible promoter enhances drought resistance in petunia. **Hortic Res.** n.
15 February, p. 1–9, 2015.
- 16 FILIZ, E.; OZYIGIT, I. I.; VATANSEVER, R. Genome-wide identification of *galactinol* 2
17 *synthase (GolS)* genes in *Solanum lycopersicum* and *Brachypodium distachyon*. 3
18 **Computational Biology and Chemistry**, v. 58, p. 149–157, 2015.
- 19 FU, L. et al. Physiological Investigation and Transcriptome Analysis of Polyethylene 6
20 Glycol (PEG)-Induced Dehydration Stress in Cassava. **International Journal of** 7
21 **Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, 2016.
- 22 GOLLDACK, D. et al. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the
23 signaling networks. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 151, 2014.
- 24 GOLLDACK, D.; LÜKING, I.; YANG, O. Plant tolerance to drought and salinity: stress
25 regulating transcription factors and their functional significance in the cellular
26 transcriptional network. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 8, p. 1383–1391, 2011.
- 27 HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; FINER, J. J. Identification and validation of promoters
28 and *cis*-acting regulatory elements. **Plant Science**, v. 217–218, p. 109–119, 2014.
29
- 30 HOAGLAND, D.R. AND ARNON, D.I. The Water-Culture Method for Growing Plants
31 without Soil. **Circular & California Agricultural Experiment Station**, 347, 32, 1950.
- 32 HONG, S. M. et al. Identification and Testing of Superior Reference Genes for a
33 Starting Pool of Transcript Normalization in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**,
34 v. 51, p. 1694–1706, 2010.
- 35 HU, D. et al. *Agrobacterium*-mediated vacuum infiltration and floral dip transformation
36 of rapid-cycling *Brassica rapa*. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 246, jun. 2019.
- 37 HUANG, J. et al. OsRhoGAP2 promoter drives inflorescence-preferential expression
38 and confers responses to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis. **Acta**

- 1 **Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 5, p. 67, 2019.
- 2 HUANG, T.; JANDER, G. Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic
3 stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*.
4 **Planta**, v. 246, n. 4, p. 737–747, 2017.
- 5 IIZUMI, T.; RAMANKUTTY, N. How do weather and climate influence cropping area
6 and intensity?. **Global Food Security**, v. 4, p. 46–50, 2015.
- 7 IVAMOTO, S. T. et al. Transcriptome Analysis of Leaves, Flowers and Fruits Perisperm
8 of *Coffea arabica* L. Reveals the Differential Expression of Genes Involved in Raffinose
9 Biosynthesis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169595, 9 jan. 2017.
- 10 JAIN, A. et al. Abiotic Stress Response in Plants:A *Cis*-Regulatory Perspective. In:
11 ZARGAR, S. M.; ZARGAR, M. Y. (Eds.). . **Abiotic Stress-Mediated Sensing and**
12 **Signaling in Plants: An Omics Perspective**. Singapore: Springer Singapore. p. 183–
13 205, 2018.
- 14 JOËT, T. et al. Regulation of galactomannan biosynthesis in coffee seeds. **Journal of**
15 **experimental botany**. v. 65 p. 323-37, 2014.
- 16 KORAMUTLA, M. K. et al. Strength, Stability, and *cis*-Motifs of In silico Identified 28
17 Phloem-Specific Promoters in *Brassica juncea* (L.). **Front. Plant Sci.** v. 7, n. April, p.
18 29 1–12, 2016.
- 19 LESK, C.; ROWHANI, P.; RAMANKUTTY, N. Influence of extreme weather disasters
20 on global crop production. **Nature**, v. 529, p. 84, 6 jan. 2016.
- 21 LI, R. et al. Genome-Wide Identification and Expression Profiling Analysis of the
22 Galactinol Synthase Gene Family in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Agronomy**,
23 v. 8, n. 11, p. 250, 2018.
- 24 LIU, H. et al. Identification and characterization of *PsDREB2* promoter involved in
25 tissue- specific expression and abiotic stress response from *Paeonia suffruticosa*. 37
26 **PeerJ**. v. 7, e7052, 2019.
- 27 LIU, Y. et al. Molecular cloning and expression of an encoding galactinol synthase
28 gene (*AnGoIS1*) in seedling of *Ammopiptanthus nanus*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 41
29 36113, 2016.
- 30 MUKHERJEE, S. et al. Abiotic stress regulates expression of galactinol synthase genes
31 post - transcriptionally through intron retention in rice. **Planta**, v. 249, n. 3, p. 45 891–912,
32 2019.
- 33 MURASHIGE, T, SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with
34 tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 49
35 1962.
- 36 NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional
37 regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses

- 1 including drought, cold, and heat. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. May, p. 170,
2 2014.
- 3 PANDEY, B. et al. Chapter 10 - Regulated Gene Expression by Synthetic Modulation 2 of
4 the Promoter Architecture in Plants. In: Sing, S. P. et al (Eds.). **Current 3 Developments**
5 **in Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier. p. 235-255, 2019.
- 6 PORTO, M. S. et al. Plant promoters: An approach of structure and function. **Molecular**
7 **Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 38–49, 2014.
- 8 RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-
9 free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) 10 data.
10 **Neuroscience Letters**, v.339, p.62-66, 2003.
- 11 SALEHI-LISAR, S. Y.; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, H. Drought Stress in Plants:
12 Causes, Consequences, and Tolerance. In: HOSSAIN, M. A. et al. (Eds.). . **Drought**
13 **Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry**. Cham: Springer
14 International Publishing. p. 1–16, 2016.
- 15 SALVI, P.; KAMBLE, N. U.; MAJEE, M. Stress-Inducible Galactinol Synthase of
16 Chickpea (*CaGolS*) is Implicated in Heat and Oxidative Stress Tolerance Through
17 Reducing Stress-Induced Excessive Reactive Oxygen Species Accumulation. **Plant &**
18 **cell physiology**, v. 59, n. 1, p. 155–166, 2018.
- 19 SAMBROOK, J. and RUSSELL, D. W. Transformation of *E. coli* by Electroporation.
20 **CSH Protoc.** Jun 1; 2006.
- 21 SATO, H. et al. *Arabidopsis thaliana* *NGATHA1* transcription factor induces ABA
22 biosynthesis by activating *NCED3* gene during dehydration stress. **Proceedings of**
23 **the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 47, p. E11178--E11187, 2018.
- 24 SEMEDO, J. N. et al. Coffee Responses to Drought, Warming and High [CO₂] in a
25 Context of Future Climate Change Scenarios. In: ALVES, F.; LEAL FILHO, W.;
26 AZEITEIRO, U. (Eds.). . **Theory and Practice of Climate Adaptation**. Cham:
27 Springer International Publishing. p. 465–477, 2018.
- 28 SENGUPTA, S. et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide
29 synthesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. AuGUST, p. 1–11, 2015.
- 30 SHIMOSAKA, E. and KENJIROU, O. Overexpression of cold-inducible wheat
31 galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice. **Breeding**
32 **Science**, v. 371, p. 363–371, 2015.
- 33 TAGUE, B. W.; MANTIS, J. In Planta *Agrobacterium*-Mediated Transformation by
34 Vacuum Infiltration. In: SALINAS, J.; SANCHEZ-SERRANO, J. J. (Eds.) . **Arabidopsis**
35 **Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press. p. 215–223, 2006.
- 36 TAJI, T. et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for *galactinol*
37 *synthase* in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** v. 29, p. 417-26, 2002.

- 1 VAN DER WEELE, C. M. et al. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water
2 deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. **Journal of**
3 **Experimental Botany**, v. 51, n. 350, p. 1555–1562, 2000.
- 4 WANG, Li-wei et al. NaCl stress induces CsSAMS gene expression in *Cucumis sativus*
5 by mediating the binding of CsGT-3b to the GT-1 element within the CsSAMS
6 promoter. **Planta**, v. 245 p. 889-908, 2017.
- 7 WANG, Y. Q. et al. Cloning of MeGoIS5 Promoter from Cassava (*Manihot esculenta*
8 Crantz) and Expression Analysis in Abiotic Stress of MeGoIS5. **Applied Mechanics**
9 **and Materials**, v. 707, p. 126–132, 2014.
- 10 WANG, Z. et al. A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in
11 *Boea hygrometrica* by binding to the W-box elements of the galactinol synthase
12 (*BhGoIS1*) promoter. **Planta**, v. 230, n. 6, p. 1155–1166, 2009.
- 13 WYDRA, G. O. AND K. Advances in Plant Tolerance to Abiotic Stresses. **Plant**
14 **Genomics**, v. 2, p. 64, 2018.
- 15 XIONG, T. C. et al. Chapter 7 Spatio-Temporal Imaging of Promoter Activity in Intact
16 **Plant Tissues**. v. 1482, p. 103–110, 2016.
- 17 YANG, Z. et al. Promoter analysis reveals cis-regulatory motifs associated with the
18 expression of the WRKY transcription factor *CrWRKY1* in *Catharanthus roseus*.
19 **Planta**, v. 238, n. 6, p. 1039–1049, 2013.
- 20 YU, Y. et al. Overexpression of soybean miR169c confers increased drought stress
21 sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 285, n. April, p. 68–
22 78, 2019.
- 23 ZHUO, C. et al. A cold responsive galactinol synthase gene from *Medicago falcata*
24 (*MfGoIS1*) is induced by myo-inositol and confers multiple tolerances to abiotic
25 stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 149, n. 1, p. 67–78, 2013.
- 26 ZHOU, J. et al. Responses of *Populus trichocarpa* galactinol synthase genes to abiotic
27 stresses. **Journal of Plant Research**, v. 127, n. 2, p. 347–358, 2014.
- 28

- 1 Figura suplementar 1. Mapa do vetor pCAMBIA1381 contendo as bordas do T-DNA e
 2 o cassete para expressão em plantas do qual inclui o gene repórter β -glucuronidase
 3 (*GUS*), sob o controle do promotor do gene da galactinol sintase 3 (*GolS3*) (MCS -
 4 Multiple cloning site).



- 5 Fonte: GenOne Biotechnologies® - RJ, criado com SnapGene®.