

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO *IN SILICO* DE RECEPTORES DO ETILENO EM CAFÉ (*Coffea arabica*)

ANDRÉ ALMEIDA LIMA¹, SOLANGE APARECIDA SÁGIO²; ANTONIO CHALFUN-JÚNIOR³

RESUMO

O fitormônio etileno está envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos e do desenvolvimento como na maturação de frutos, abscisão de órgãos vegetais e respostas à patógenos e estresses ambientais. Por se tratar de um fitormônio gasoso, o controle de sua sensibilidade atua como um fator crítico na regulação de sua ação sob células alvo. Alguns estudos têm sugerido ser o café um fruto climatérico, no entanto pouco se sabe sobre a regulação da biossíntese e percepção deste fitormônio em café. Assim, este trabalho teve como objetivo a caracterização *in silico* dos prováveis receptores de etileno em café no banco de dados CAFEST. Foram realizadas buscas por palavra chave e similaridade no banco CAFEST, e as sequências selecionadas foram clusterizadas, anotadas e analisadas quanto à presença de domínios conservados. Posteriormente realizaram-se alinhamentos múltiplos envolvendo as sequências encontradas no banco CAFEST e sequências de outras espécies, sendo a filogenia avaliada através de árvores filogenéticas geradas pelo programa MEGA4. A análise de expressão foi avaliada por *Northerns* Eletrônico, construídos pelos programas Cluster e Treeview. A análise filogenética mostrou que o contig C22 apresentou uma alta similaridade para com receptores da subfamília *ETR1-like* e o *Northern* eletrônico mostrou que este provável receptor de etileno é expresso em diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições ambientais.

Palavras-chaves: Bioinformática, rota de transdução de sinal, CAFEST.

INTRODUÇÃO

O fitormônio etileno desempenha um importante papel em uma grande variedade de processos fisiológicos e do desenvolvimento vegetal como a germinação de sementes, alongamento do caule, maturação de frutos, senescência, e também nas respostas a estresses bióticos e abióticos. A participação em processos de tão grande importância agrônoma tem feito deste fitormônio um alvo de intensos estudos relacionados a sua regulação e ação (Chen et al., 2005).

Uma vez produzido, por se tratar de um fitormônio gasoso, o etileno se difunde facilmente entre os espaços intercelulares e tecidos adjacentes. Sem a possibilidade de haver uma regulação do mecanismo de seu transporte, o controle de sua sensibilidade é um fator crítico na limitação de sua resposta em células alvo (ALONSO & ECKER, 2001),

As mudanças morfológicas apresentadas por plântulas crescidas no escuro na presença de etileno (Resposta tríplice), junto a análises genéticas e moleculares, permitiram a identificação de muitos componentes chave da rota de transdução de sinal do etileno (*ETR1*, *ETR2*, *EIN4*, *ERS1*, *ERS2* → *CTR1* → *EIN2* → *EIN3* → *ERF*), que vão desde a percepção do etileno até a regulação transcricional.

Alguns estudos têm sugerido ser o café um fruto climatérico, apontando para um importante papel do fitormônio etileno na maturação dos frutos do cafeeiro, a qual se caracteriza por uma grande desuniformidade, tendo em vista o florescimento sequencial apresentado nesta espécie. Entretanto, pouco se sabe sobre a regulação da biossíntese e da percepção celular do etileno nesta espécie.

Com a criação do banco de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) CAFEST, gerado pelo sequenciamento do transcriptoma do cafeeiro (Vieira et al., 2006), tornou-se possível a realização de buscas por sequências formadoras de prováveis genes relacionados às mais diversas características de

¹ Mestrando em Agronomia/Fisiologia Vegetal, DBI/ UFLA, andrelima4@yahoo.com.br

² Doutoranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal, DBI/ UFLA, solsagio@gmail.com

³ Professor Adjunto, DBI/UFLA, chalfunjunior@dbi.ufla.br

interesse, permitindo também a determinação dos possíveis tecidos em que estes genes são expressos, além de uma estimativa desta expressão.

Desta forma, visando um melhor entendimento da rota de transdução de sinal do etileno em café, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização *in silico* dos prováveis receptores de etileno em café (*Coffea arabica*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Busca por sequências

Primeiramente o banco de dados CAFEST foi investigado através dos critérios de busca por palavra chave e similaridade [tblastn utilizando sequências homólogas publicadas no banco de dados públicos *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov)], para identificação dos prováveis receptores do etileno. As sequências apresentando similaridade confiável ($e\text{-value} > 10^{-4}$) foram depositadas no sistema de gerenciamento e manipulação de sequências, o *GeneProject*, e clusterizadas, utilizando o programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). Após a clusterização, os EST-contigs e EST-singlets, foram anotados e comparados contra bancos de dados públicos de proteínas para se obter maiores informações sobre as prováveis proteínas codificadas por estas sequências e eliminação de sequências falsas. Após esta etapa, as sequências selecionadas foram ainda utilizadas como moldes para uma nova procura no próprio banco de dados CAFEST, processo denominado de saturação, com intuito de estender ou completar estas sequências, ou mesmo encontrar novas sequências.

Análise filogenética

A caracterização dos prováveis receptores foi realizada através de um alinhamento múltiplo entre as sequências selecionadas no CAFEST e sequências homólogas publicadas. Os alinhamentos foram realizados através do programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) com os parâmetros padrões (*default*) e utilizando-se de sequências de nucleotídeos traduzidas em aminoácidos as quais foram deduzidas através da ferramenta *translate*, encontrada no site do banco de proteínas ExPASy (www.expasy.ch), sendo suas ORFs (*Open Reading Frames*) obtidas através da ferramenta ORF finder, encontrada no site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). A partir destes alinhamentos, árvores filogenéticas foram geradas através o programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007), com o modelo de comparação *Neighbor-joining* (SAITOU & NEI, 1987), método de distância p e supressão *pair-wise*. A validade das árvores quanto à distância filogenética dos clusters, pôde ser medida pelo teste probabilístico de *bootstraps* (SITNIKOVA et al., 1995).

Análise da expressão *in silico*

As análises de expressão *in silico* foram determinadas pela construção de *Northern* Eletrônico, gerados a partir da construção de uma tabela contendo o número de vezes que cada *read* formador de um EST-contig apareceu expresso em cada biblioteca. Esses dados foram então normalizados para obtenção do grau de expressão exata dos prováveis genes em cada biblioteca. Posteriormente, foi feita uma matriz, relacionando os prováveis genes e as bibliotecas em que estes foram expressos, a qual foi submetida a um agrupamento hierárquico pelo programa Cluster (EISEN et al., 1998) e, os resultados obtidos foram então visualizados pelo programa TreeView (EISEN et al., 1998), utilizando uma escala do preto ao vermelho, onde quanto mais próximo à cor vermelha maior o grau de expressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises no banco de dados CAFEST geraram 231 reads relacionados aos receptores de etileno, os quais foram clusterizados em 28 EST-Contigs e 89 EST-Singlets. A análise de domínios conservados demonstrou que somente o contig C22 apresentou o domínio de ligação ao etileno conservado, sendo assim utilizado para as análises posteriores.

O Contig C22 apresentou um total de 12 *reads*, compreendendo uma sequência com 2110 pares de bases (pb) e uma ORF (*Open Reading Frame*) de 1848 pb, codificando para uma proteína de 615 aminoácidos. De acordo com estudos anteriores realizados em *Arabidopsis*, onde os receptores de

etileno, de acordo com suas similaridades estruturais e de sequência, foram divididos em duas subfamílias, subfamília ETR1-like (*ETR1* e *ERS1*) e subfamília ETR2-like (*ETR2*, *ERS2* e *EIN4*). A proteína codificada pelo contig C22 demonstrou uma maior similaridade para com os receptores da subfamília ETR1-like, o que pôde ser confirmado pelo resultado obtido pela árvore filogenética gerada, envolvendo as sequências dos receptores de etileno de *Arabidopsis* e de café (*Coffea canephora*), as quais foram obtidas no banco de dados do NCBI. Ao nível de aminoácidos, C22 demonstrou uma identidade de 96%, 84% e 70% com os receptores, CcETR1, AtETR1 e AtERS1, respectivamente, enquanto que em relação aos receptores da subfamília ETR2-like, esta não foi superior a 40% (Figura 1).

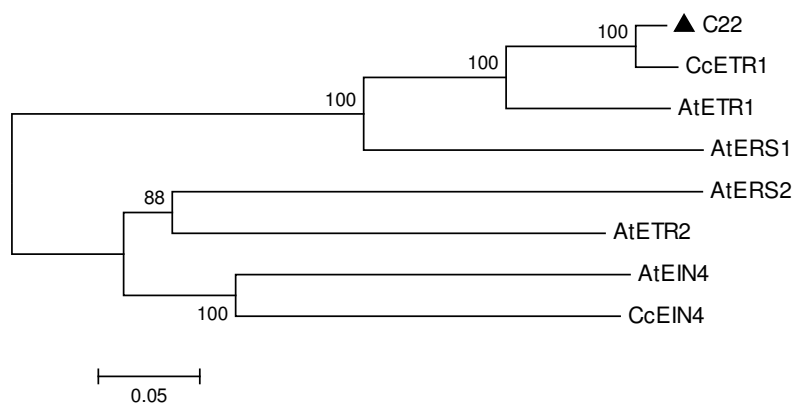


FIGURA 1 - Árvore filogenética envolvendo as sequências de aminoácidos do provável receptor de etileno encontrado no banco de dados CAFEST, C22 (▲), e de *Arabidopsis* [*Arabidopsis thaliana* (*AtETR1*, *AtERS1*, *AtEIN4*, *AtERS2*, *AtETR2*)] e café [*Coffea canephora* (*CcETR1*, *CcEIN4*)]. As sequências de *Arabidopsis* e café foram obtidas no banco de dados do NCBI, e os números de acesso são como segue: *AtETR1*(P49333), *AtERS1*(Q38846), *AtEIN4*(Q9ZTP3), *AtERS2*(P93825), *AtETR2*(O82429), *CcETR1*(ABL63471). Valores de *bootstrap* menores que 50% foram omitidos.

O *Northern* eletrônico mostrou que C22 apresenta uma expressão variável de acordo com o tecido, estágio de desenvolvimento e condição ambiental, sendo observada em situações onde presume-se que o fitohormônio etileno possivelmente esteja envolvido, como nas bibliotecas contendo células sob estresse causado por alumínio (RT8), estresse hídrico (SH2), sementes em germinação (SI3) e folhas maduras (LV8, LV9), o que demanda a presença de receptores para que o etileno possa exercer seus efeitos (Figura 2).

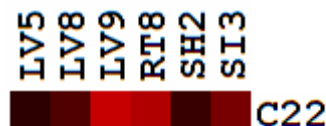


FIGURA 2 - *Northern* Eletrônico representando os níveis de expressão do contig C22 nas diferentes bibliotecas, em uma escala de cor do preto ao vermelho, onde quanto mais próximo ao vermelho maior o nível de expressão. Bibliotecas (Vieira et al., 2006): Folhas maduras de ramos ortotrópicos (LV5); Folhas maduras de ramos plagiotrópicos (LV8 e LV9); Células em suspensão em estresse com alumínio (RT8); Plantas estressadas por déficit hídrico (*Pool* de tecidos) (SH2); Sementes em germinação (Sementes inteiras e embriões zigóticos) (SI3).

CONCLUSÃO

A similaridade estrutural e o padrão de expressão de C22 sugerem a sua classificação como um provável receptor de etileno de café.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALONSO, J. M.; ECKER, J. R. The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction. **Science STKE**, v. 70, RE1. 2001.

CHEN, Y. F.; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, E. Ethylene signal perception. **Annals of Botany**, v. 95, p. 901-915, 2005.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, (USA), 95: 14863-8, 1998.

HUANG, X, MADAN, A. CAP3: A DNA assembly program. **Genome Research**, v. 9 p. 868-877, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406– 425, 1987.

SITNIKOVA, T.; RZHETSKY, A.; NEI, M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 319-33, 1995.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24 , p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

VIEIRA, L. G. E. ; ANDRADE, A. C. ; MONTE, D. C. ; ALMEIDA, E. R. P. ; SA, M. F. G. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 01, p. 95-108, 2006.