

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE GALACTINOL SINTASE EM *Coffea arabica* L.

Tiago B. SANTOS¹, Elizabete K. TAKAHASHI¹, Luiz Filipe P. PEREIRA² e Luiz Gonzaga E. VIEIRA¹
E-mail: lvieira@iapar.br

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, PR, ²Embrapa – Café, Londrina, PR.

Resumo

Com a finalização do Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>), um conjunto de 150.000 seqüências expressas (ESTs) em diversos tecidos, em diferentes etapas de desenvolvimento e também em diversas condições ambientais, estão disponíveis para estudos *in silico* e *in vitro*, no qual se espera obter informações quanto ao mecanismo de resposta a estresses abióticos. Visando a caracterização dos genes relacionados ao estresse hídrico do café, através do banco de dados do Genoma Café, o objetivo deste trabalho foi identificar os genes de *galactinol sintase*. A partir de 91 seqüências foram encontrados 3 contigs (*CaGols1*, 2 e 3), dos quais foram desenhados oligonucleotídeos. A expressão dos genes foi analisada através de RT-PCR em diferentes tecidos do cafeeiro (folha, raiz, ramo e botão floral), sob condições de campo. Nas análises somente foram detectados transcritos para o gene *CaGols3*. A expressão dos genes *CaGols1* e *CaGols2* não foi observada em tecidos foliar sob condições normais, no entanto, dados de literatura e análise *in silico* das bibliotecas de cDNA indicam que esses genes são provavelmente expressos em tecidos sob estresse hídrico.

Palavra-chave: Café, estresse abiótico, *galactinol sintase*

IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF THE GALACTINOL SYNTHASE GENE IN *Coffea arabica* L.

Abstract

The Coffee Genome Project (www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/) finished the sequencing of 150.000 expressed sequences tags (ESTs) from several tissues, different stages of development and several environmental conditions. These sequences are available for *in silico* and *in vitro* studies, in which we expect to obtain information about the mechanisms of abiotic stress response. The objective of this study was to characterize genes of galactinol synthase, related to the water deficit, through the searching of Coffe Genome Database. Starting from 91 sequences we have found 3 contigs (*CaGols1*, 2 and 3), which were used to design oligonucleotides. Gene expression was analyzed through RT-PCR in different tissues of coffee growing at normal field conditions. The *CaGols2* showed transcription activity in leaves, while it was not possible to detect any transcripts from *CaGols1* and *CaGols3*. According to the literature as well as the *in silico* analysis of the Coffee Genome, *CaGols1* and *CaGols3* may be expressed in plant tissues water deficit conditions.

Key words: Coffea, drought stress, *galactinol synthase*

Introdução

Galactinol sintase (Gols), é a enzima que catalisa o primeiro passo na biossíntese dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFO) (Keller e Pharr, 1996). Esta enzima está envolvida na regulação da partição do carbono, como também está diretamente implicada em muitos processos do desenvolvimento fisiológico nas plantas e na resposta a estresses abióticos. A Gols catalisa a formação de galactinol e UDP (uridine-5-diphosphate) a partir de UDP-gal e mioinositol. Têm sido realizado muitos estudos sobre a expressão do gene *galactinol sintase* sob condições de estresse. Em *Cucumis melo* foi verificado que galactinol sintase ativa o metabolismo de RFO nas plantas sob condição de estresse hídrico, sendo que a ocorrência da expressão desse gene se dá em folhas e sementes (Volk et al., 2003). Estudos de expressão utilizando gene *gusA* sob controle do promotor de *Galactinol sintase* de *Cucumis melo*, mostraram que a expressão gênica é específica para as menores nervuras condutoras de floema em folhas de *Arabidospis thaliana* e tabaco. Este padrão de expressão é esperado, pois o principal papel de galactinol sintase é catalisar o primeiro passo da síntese de rafinose e estaquiose, açúcares que as curcubitáceas transportam no seu floema (Turgeon, 1996). Também em *Cucumis melo* foi demonstrado que o gene *CmGols1* é expresso em folhas

maduras e nas sementes durante o seu desenvolvimento, enquanto que a expressão do gene *CmGols2* foi somente observada em folhas maduras.

No genoma de *Arabidopsis thaliana*, foram encontrados sete genes *Gols*. Destes, três (*AtGols1*, 2 e 3) foram caracterizados como envolvidos na resposta ao estresse. Os genes *AtGols1* e 2 foram induzidos sob condições de estresse hídrico e salino, enquanto que o *AtGols3* foi induzido sob condições de baixas temperaturas. Os resultados obtidos mostraram que *Gols* é a enzima principal na acumulação de galactinol e rafinose sob condições de estresse abiótico, os quais possivelmente atuam como osmoprotetores em plantas tolerantes ao estresse hídrico (Taji et al., 2002).

Em *Ajuga reptans*, planta que tem servido como modelo para estudar a regulação e a importância do metabolismo de rafinose, foram identificados e isolados dois cDNAs que codificam para genes de *Gols* distintos, designados *Gols1* e *Gols2*, respectivamente (Sprenger et al., 2000). O presente trabalho teve como objetivo a exploração do banco de dados do Genoma Café para identificação e caracterização de genes que codificam a enzima *Galactinol sintase*, e estudar a expressão desses genes em diferentes tecidos do cafeeiro.

Material e Métodos

Inicialmente foram feitas buscas dentro do banco de dados do Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/café/>), para o gene *Galactinol sintase (Gols)*. Para análise e caracterização, foram escolhidos três contigs (*CaGols 1, 2 e 3*), os quais mostraram integridade e similaridade com o gene *Gols*. Esses contigs foram formados por diferentes tecidos provenientes principalmente de plantas estressadas do cafeeiro. Foi utilizado o programa TargetP, o qual realiza a predição da existência de peptídeo de direcionamento para as organelas, e SignalP 3.0, que prediz a existência e a posição de um peptídeo sinal em diferentes organismos.

A fim de analisar as expressão dos genes *CaGols1, 2 e 3*, foram construídos três pares de oligonucleotídeos, um par para cada gene, utilizando o programa PRIMER DESIGNER versão 2.0.

Para extração de RNA total utilizou-se o protocolo de Chang et al. (1993) partindo-se de diferentes tecidos de cafeeiro, cultivar IAPAR 59, sob condições de campo (folha, raiz, ramo e botão floral) e o cDNA foi sintetizado a partir de 5 µg de RNA de todos os tecidos, utilizando o ThermoScript™ oligo (dT) System (Invitrogen).

Análise por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para todos os tecidos utilizando 1µL de cDNAs sintetizados, 10 mM TRI-HCL pH8,4, 50mM de KCL, 2,5 mM MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* polimerase e 10 µM de cada iniciador específico para o gene *CaGols1, 2 e 3*. A mistura foi submetida a 40 ciclos de amplificação, após a otimização da amplificação realizada para o gradiente de temperatura (48, 52, 54, 58 e 62°C) e na concentração de MgCl₂ (1,5, 2 e 2,5 mM). O produto de amplificação do gene *CaGols3* foi isolado e clonado no vetor pCR® 2.1 – TOPO.

Resultados e Discussão

Foram obtidas 91 seqüências de diferentes bibliotecas de ESTs depositadas no banco do Genoma Café. Usando o programa ClustalW (Thompson et al., 1994), foram gerados 11 contigs e 3 singlets. Para este estudo, os três contigs maiores (Tabela 1) foram selecionados por mostrarem integridade e similaridade com o gene de *galactinol sintase (Gols)* através de análises pelos programas BlastP e BlastX (Altschul et al., 1990).

Tabela 1. Seqüências dos genes *galactinol sintase* identificados no Genoma Café

CONTIGS	Nº READS	BIBLIOTECAS
<i>CaGols1</i>	10	FR2, LV4, LV5, LV9, SH2
<i>CaGols2</i>	6	AR1, LV5, SH2
<i>CaGols3</i>	49	AR1, BP1, IA2, LV4, LV8, LV9, PC1, RM1

Bibliotecas: AR1= folhas tratadas com ácido araquidânico; BP1= células suspensão, raiz e folha com bion; FR2 = botão floral estágio 1 e 2 – curta; IA2 = linhagem embriogênica (folha *C. arabica*) com indução por 2,4 D*; LV4 = folhas ponteiro ramo ortotrópico sem bion - longa; LV5 = folhas ponteiro ramo ortotrópico sem bion – curta; LV8 = folhas ramo plagiotrópico sem bion – longa (plantas adultas); LV9 = folhas ramo plagiotrópico sem bion – curta (plantas adultas); PC1= linhagem não embriogênica (folhas *C. arabica*) com indução por 2,4*; RM1 = folha infestada com bicho mineiro e infectada com ferrugem; SH2 = estresse hídrico campo (pool de órgãos e tecidos).

As seqüências que participaram da formação dos contigs são provindas de diferentes tecidos do cafeeiro. O contig *CaGols1* foi formado por seqüências encontradas em bibliotecas de botão floral, folhas e folhas estressadas no campo. O contig é composto de 1005 pares de bases (pb), codificando para uma proteína de 335 aminoácidos. Quando BlastP foi realizado, observou-se a presença de um domínio da família de glicosil transferase (pfam01501) de 244 resíduos, o qual apresentou um alinhamento de 100% (e-value: 3e-45), foi observado uma alta similaridade com as seqüências de *galactinol sintase* de *Brassica napus* (341 aa), *Arabidopsis thaliana* (344 aa) com identidades de 79% e 75%, respectivamente e um e-value: e-148 para ambas.

O contig *CaGols2* foi formado por seqüências provindas tanto de folhas estressadas e não estressadas, é composto de 1026 pb e codificando para uma proteína de 341 aminoácidos. A seqüência de proteína também apresenta o domínio pfam01501, e um alinhamento de 100% (e-value: 2e-44). Análises de BlastP mostra uma alta similaridade com seqüências de *galactinol sintase* de *Cucumis sativus* (331 aa), 75% de identidade e e-value: 1e-145; *Cucumis melo* (331 aa), 75% de identidade e e-value: 1e-145.

O contig *CaGols3* foi constituído por seqüências provindas de células suspensão de raiz e folhas, células não embriogênicas, células embriogênicas, raiz sem bion, e bibliotecas de folhas estressadas e não estressadas. O contig é formado de 1017 pb, codifica para uma proteína de 338 aminoácidos, apresenta o domínio da família de glicosil transferase pfam01501, com alinhamento de 100% e e-value: 2e-46. Quando o BlastP foi realizado, alta similaridade foi observada com seqüências de galactinol synthase de *Ajuga reptans* (333 aa), 83% de identidade e e-value: 1e-167; *Arabidopsis thaliana* (334 aa), 82% de identidade e e-value: 1e-157.

Análises de predição da existência de peptídeo sinal em vários programas computacionais realizadas nas três seqüências preditas de proteínas *Gols* do cafeeiro não mostraram a presença de tais peptídeos para todas as seqüências analisadas.

Os resultados das análises de RT-PCR de folhas são apresentados na Figura 1. Transcritos correspondentes a galactinol sintase foram observados somente para o gene *CaGols3* em três condições de temperatura de anelamento (52, 54 e 58°C), sendo que a temperatura ótima ficou estabelecida em 54°C. O produto da amplificação obtido foi equivalente a 1400 pb, tamanho correspondente ao gene *Gols* (Figura 1). A re-amplificação do produto de PCR nessa condição foi realizada para testar diferentes concentrações de MgCl₂ (1,5, 2 e 2,5 mM), sendo o melhor resultado obtido na concentração de 2 mM. O produto resultante dessa re-amplificação foi isolado e clonado em vetor pCR® 2.1 – TOPO. O plasmídeo foi digerido com a enzima *EcoRI* que liberou um fragmento de aproximadamente 1400 pb, que estava de acordo com o tamanho esperado.

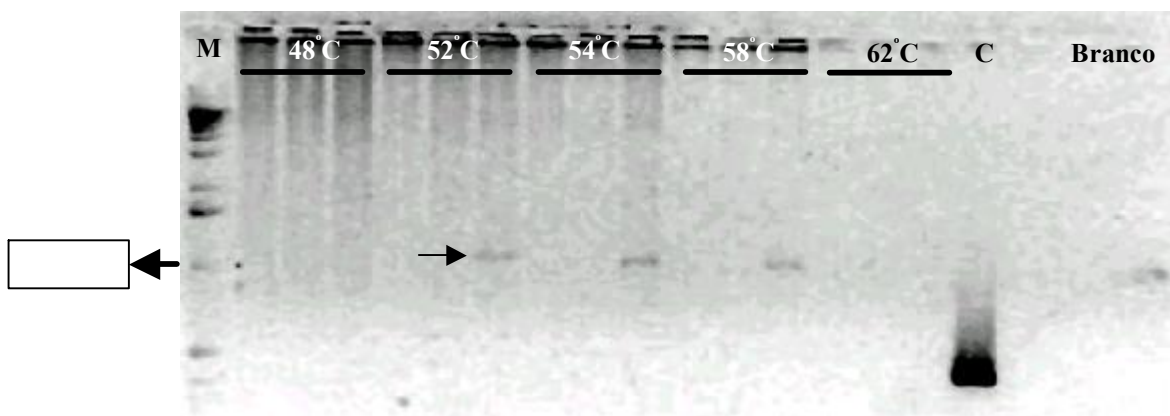


Figura 1. Perfil eletroforético do teste de gradiente de temperatura para amplificação dos genes de *galactinol sintase* em folha do cafeeiro. A seta indica o fragmento de 1400 pb. M = marcador Ladder 1Kb; C1= oligonucleotídeo específico para o gene *CaGols1*; C2= oligonucleotídeo específico para o gene *CaGols2*; C3= oligonucleotídeo específico para o gene *CaGols3*; C= controle (gene constitutivo *GOS*); Branco= três amostras sem cDNA.

A expressão dos genes *CaGols1* e *CaGols2* em materiais sob condições de campo não foi observada, no entanto, sugere que estes genes provavelmente sejam expressos em tecidos do cafeeiro em condições de estresse, uma vez que as seqüências de ESTs que formaram esses genes são provindas principalmente de tecidos estressados. Sendo assim, serão realizados experimentos de análise de expressão, como RT-PCR e Northern blot para esses genes em tecidos de plantas de cafeeiro submetidas ao estresse.

Referências bibliográficas

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** v. 215:403–410.
- Chang, S. Puryear J. Cairney, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol Biol.** v. 11, p.113–116, 1993.
- Keller, F Pharr, D.M. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides. In E Zamski, AA Schaffer, eds, Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships. Marcel Dekker, New York. p.157-183, 1996.
- Sprenger, N. Keller, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. **Plant J.** v. 21, p. 249-258, 2000.
- Taji, T. Ohsumi, C. Iuchi, S. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi, M. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** v. 29, p. 417-426, 2002.
- Turgeon, R. Phloem loading and plasmodesmata. **Trends Plant Sci.** v. 1, p. 418-423, 1996.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acid. Res.** v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- Volk, G. M. Haritatos, E.E. Turgeon, R. *Galactinol synthase* gene expression in melon. **J Am Soc Hortic Sci.** v. 128, p. 8-15, 2003.