

ANÁLISE *IN SILICO* DE PECTINAMETILESTERASES DE *COFFEA SPP.*

Thiago Falda LEITE¹, E-mail: thiagofalda@ig.com.br; Ilara G. F. BUDZINSKI¹; Sandra Maria B. CAÇÃO¹; Luiz Filipe P. PEREIRA²; Luiz Gonzaga E. VIEIRA¹

¹Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), PR. ²Embrapa Café, Brasília, DF.

Resumo:

A maturação desuniforme dos frutos do cafeeiro, associada a práticas inadequadas de colheita e pós-colheita, pode prejudicar a qualidade final do café. Visando compreender melhor os genes envolvidos na maturação de frutos do cafeeiro foram iniciados estudos *in silico* e *in vivo* da atividade da pectinametilesterase (PME-EC 3.2.1.11). A PME é a enzima responsável por catalisar a desmetilação de ésteres metílicos dos ácidos poligalacturônicos e se encontra distribuída em raízes, caules, folhas e frutos da grande maioria das plantas superiores. Essa enzima tem um importante papel no amaciamento de frutos pelo aumento da susceptibilidade das pectinas a poligalacturonase (PG) durante o amadurecimento. A análise *in silico* foi realizada através de buscas no banco de dados disponibilizados pelo projeto Genoma Café, assim como de outros bancos de domínio público. Foram identificados inicialmente 31 *contigs*, mas apenas oito destes apresentavam seqüências provenientes de bibliotecas de frutos de café. Comparação dos *contigs* obtidos nos bancos de dados do Genoma Café e do HarvEST Coffea, permitiu a caracterização *in silico* da expressão de alguns dos *contigs* nos diferentes estágios de maturação dos frutos. Análise da expressão *in vivo* destes *contigs* está sendo realizada para validação dos dados obtidos *in silico*.

Palavras-chaves: genoma, maturação de frutos, pectinametilesterase, café, qualidade.

IN SILICO ANALYSIS OF PECTIN METHYLESTERASES OF *COFFEA SPP*

Abstract:

The quality of coffee is directly related to the ripening stage of fruits during harvesting. Non uniform maturation of the coffee fruits, combined with inadequate harvest and post harvest practices, may negatively affect final quality of the product. Pectinmethylesterase (PME EC 3.2.1.11) catalyzes the methyl esterification of esters from poligalacturonic acid. This enzyme has an important role in fruit softening increasing the susceptibility of pectins for the activity of polygalacturonases during fruit ripening. In order to study the changes occurring in coffee fruit maturation, the *in silico* characterization of PME was performed. The analysis of ESTs from the Brazilian Coffee Genome project identified 31 *contigs* of PME, but only eight had ESTs from fruit libraries. Comparison of those *contigs* with ESTs from *C. canephora* allowed the characterization of temporal expression of PME during fruit maturation.

Keywords: genome, fruit maturation, pectinmethylesterase, coffee, quality

Introdução

As substâncias pécnicas, polissacarídeos de alto peso molecular constituídos por unidades de ácido D-galacturônico, sofrem ação de pectinases, como a pectinametilesterase (PME EC 3.2.1.11). A PME catalisa a desmetilação dos ésteres metílicos dos ácidos poligalacturônicos (PIMENTA *et al.*, 2000) e tem um importante papel no amaciamento de frutos pelo aumento da susceptibilidade das pectinas a poligalacturonase (PG) durante o amadurecimento (KOCH, NEVIS 1989). No início do processo de maturação, as protopectinas sofrem hidrólise ácida ou ação de protopectinases, formando ácidos pécnicos que sofrem eliminação de grupos metílicos por ação da PME, originando assim metanol e pectinas com poucos grupos metílicos. Essas pectinas então sofrem ação da despolimerase que irão degradá-las, originando assim ácidos pécnicos (poligaracturônico), que por ação da PG originam o ácido D-galacturônico nos estágios finais de amaciamento da polpa. A ação da PME faz-se necessária, uma vez que a PG é inativa na presença de grupos metílicos. Através de estudos *in silico*, o objetivo deste trabalho foi caracterizar genes de PME presentes no banco de dados do projeto Genoma Café visando elucidar o seu papel no amadurecimento de frutos de café.

Material e Métodos

Inicialmente foi realizada a seleção de ESTs na plataforma de bioinformática do LGE (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) utilizando PME como palavra-chave. As seqüências encontradas foram inicialmente clusterizadas utilizando ferramentas da própria plataforma do projeto Genoma Café e, posteriormente, com o auxílio dos programas Sequencher 4.5, Bio Edit e Blast (NCBI) para obtenção e análise dos *contigs*. Para obtenção das seqüências deduzidas de aminoácidos foi utilizado o programa ORF Find (NCBI), e para a construção de dendrogramas de similaridade o programa Clustal W. Também foram selecionados *contigs* de PME de *C. canephora* do banco de dados HarvEST Coffea.

Os *contigs* contendo seqüências obtidas em bibliotecas de frutos nos dois bancos de dados foram comparados e analisados quanto à expressão temporal

Resultados e Discussão

Trinta e um *contigs* foram formados após clusterização de seqüências de PME obtidas no banco de dados do Genoma Café. Destes, em apenas oito foram observadas seqüências provenientes de bibliotecas de frutos. A distribuição das seqüências destes *contigs* com relação às bibliotecas pode ser observada na Tabela 1. As bibliotecas FR1 e FR2 são formadas por seqüências expressas em frutos e botão floral e a biblioteca FR4 é única com seqüências expressas exclusivamente em frutos, mas de *C. racemosa*.

Cada *contig* teve sua seqüência protéica analisada usando o algoritmo BlastP para identificação dos domínios característicos de PMEs. Com esse procedimento foi possível verificar a presença de quatro diferentes domínios (Tabela 2), sendo dois relacionados a PME (pfam01095, COG4677), um à inibição de PME (pfam04043) e um a Cu-Oxidase (pfam00394). No dendograma contendo todas os *contigs* de PME de *C. arabica* e *C. racemosa*, observa-se que aqueles identificadas com o mesmo domínio apresentam maior similaridade.

Através da clusterização entre os *contigs* dos bancos de dados HarvEST Coffea e Genoma Café, dois *contigs* de *C. canephora* (866 e 5931) foram inseridos nos *contigs* 03 e 01 de *C. arabica*, respectivamente (Figura 2). A expressão temporal no desenvolvimento de frutos de café foi feita baseada na comparação com as seqüências extraídas da plataforma HarvEST. Cinco *contigs* apresentam expressão maior no final dos estágios de maturação, enquanto que outros três apresentam expressão constitutiva, durante o desenvolvimento dos frutos (Figura 3). Análise da expressão *in vivo* destes *contigs* está sendo realizada para validação dos dados obtidos *in silico* e comparação com dados bioquímicos de atividade enzimática.

Tabela 1- Northern *in silico* de *contigs* de PME selecionados no Genoma Café

<i>Contigs</i>	Bibliotecas**																	TOTAL
	CA1	CB1	CL2	CS1	EA1	FB	FB4	FR1	FR2	FR4	IA2	LV	PA1	PC1	RM1	RT8	RX1	
<i>Contig 01</i>	1*	1		2	2	2	3	1	2	1		4	1					20
<i>Contig 02</i>	1	2			2	1		1	5		1			1				14
<i>Contig 03</i>		3		3		2	1			1							1	11
<i>Contig 04</i>										1	1	1			1			4
<i>Contig 05</i>			2	2		5	3		2			1				2		17
<i>Contig 06</i>	1			1		2		1	2			2					1	10
<i>Contig 07</i>	2			1		9		3	1					1		2		19
<i>Contig 08</i>						2				1								3
Total	5	6	2	9	4	23	7	6	12	4	2	8	1	2	1	4	2	98

*Número de ESTs em cada biblioteca nos referidos *contigs*.

**CA1: Calo não-embriogênico, CB1: Células em suspensão com bion e brassinoesteróides, CL2: Colo (hipocótilo) com e sem bion, CS1: células em suspensão com manose, NaCl e KCl, EA1: Calo embriogênico, FB1: Botão floral estágio 1 e 2 longa, FB: Botão floral estágio 1 e 2 FR1: Botão floral nº 6, chumbinho nº 1, frutos estágio 1 e 2 longa. FR2: Botão floral nº 6, chumbinho nº 1, frutos estágio 1 e 2 curta, FR4: Frutos de *C. racemosa*, IA2: Linhagem embriogênica sem indução por 2-4,D, LV: Folha; PA1: Não definido, PC1: Linhagem não-embriogênica com indução por 2-4,D, RM1: Folha infestada com bicho mineiro e infectada com ferrugem, RT8: Raiz e células em suspensão com alumínio, RX1: Ramos infectados com *Xilella ssp.* Em vermelho, bibliotecas e seqüências expressas de frutos.

Tabela 2- Caracterização de *contigs* de PME com relação aos domínios

<i>Contigs</i>	Domínios	E-value (Domínio)
<i>Contig 01</i>	pfam01095	1e-122
	COG4677	3e-22
<i>Contig 02</i>	pfam01095	1e-134
	COG4677	8e-29
<i>Contig 03</i>	pfam04043	7e-23
	pfam04043	2e-28
<i>Contig 04</i>	pfam01095	3e-134
	COG4677	2e-36
	pfam04043	5e-27
<i>Contig 05</i>	pfam00394	3e-33
<i>Contig 06</i>	pfam00394	3e-33
<i>Contig 07</i>	pfam00394	2e-35
<i>Contig 08</i>	pfam01095	8e-60
	COG4677	4e-18

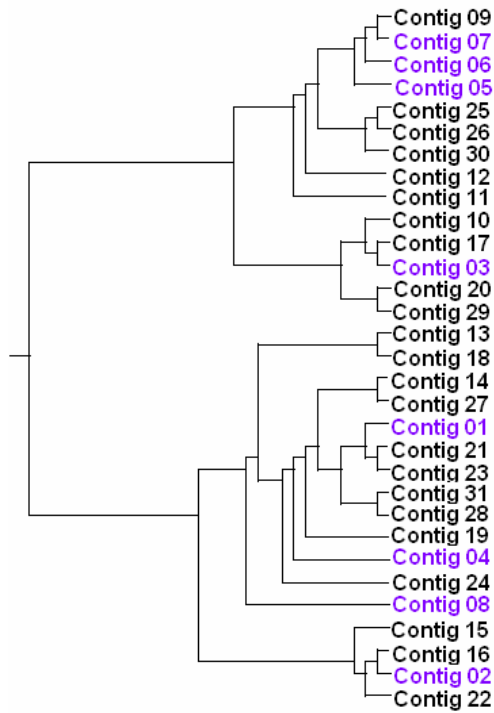


Figura 1: Dendrograma de similaridade entre seqüências nucleotídicas dos *contigs* de PME selecionados no Genoma Café. *Contigs* marcados em azul apresentam bibliotecas com seqüências expressas em frutos.

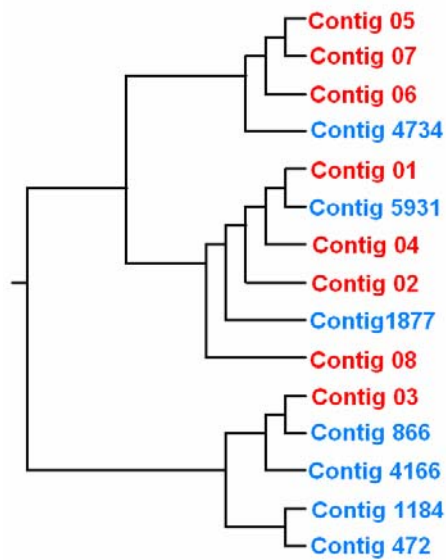


Figura 2: Dendrograma de similaridade entre os *contigs* de *C. canephora* selecionados no programa HarvEST Coffea e os *contigs* selecionados no Genoma Café (em vermelho).

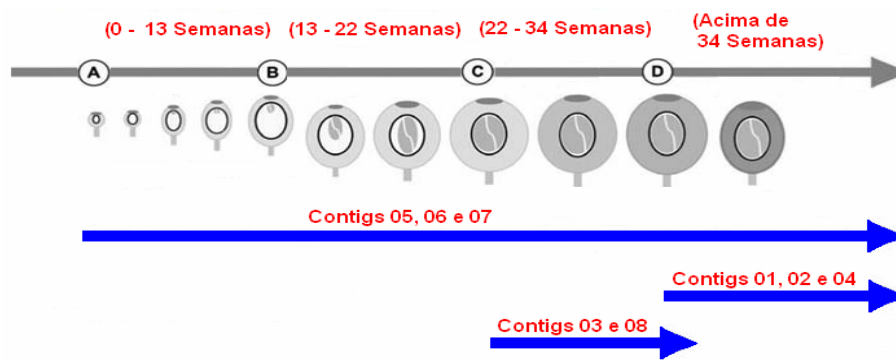


Figura 3: Estádios do desenvolvimento do fruto de café com expressão *in silico* de genes de PME. Setas azuis indicam a expressão temporal dos *contigs* de acordo com dados fornecidos pelo HarvEST Coffea. (modificado de De Castro e Marraccini, 2006).

Referências Bibliográficas

De Castro, R.D.; Marraccini, P.R. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. (2006) Braz. J. Plant Physiol., vol.18, no.1, p.175-199.

Koch, J.L.; Nevins, D.J. Tomato fruit cell wall. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. (1989). Plant Physiol. v. 91, p.816-822.

LGE – CAFÉ – AEG – Página de Serviços. Disponível em: <<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>> Acesso no período de 03/2006 a 10/2006.

NCBI Home Page. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso no período de 03/2006 a 10/2006.

Pimenta, C. J.; Chagas, S.J.R.; Costa. L. Pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica*) colhido em quatro estádios de maturação. (2000). Ciência. Agrotec., v.24, p. 1079-1083.