

ANÁLISE *IN SILICO* DE AQUAPORINAS POTENCIALMENTE ENVOLVIDAS COM O ESTRESSE HÍDRICO NAS INTERAÇÕES CAFÉ- E CITROS-*Xylella fastidiosa*

Fernanda R. RABELLO¹; Marcelo F. CARAZZOLLE²; Natália F. MARTINS³; Magnólia A. CAMPOS⁴; Marília S. SILVA⁵; Alba C. SILVA⁶; Alessandra A. DE SOUZA⁷; Alexandre M. do AMARAL^{3,7}; Angela MEHTA³

¹ Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF ² Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP ³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CENARGEN, Brasília, DF ⁴ Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG ⁵ Embrapa Cerrados – CPAC, Planaltina, DF ⁶ Embrapa Café, Brasília, DF ⁷ Centro APTA Citrus Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP

Resumo:

No Brasil, um dos importantes problemas enfrentados por produtores de café e citros envolve os danos causados pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Esta bactéria causa o entupimento dos vasos do xilema e impede a passagem de água e nutrientes, o que causa uma condição biológica de estresse hídrico. Os genomas de citros e café têm sido investigados funcionalmente e várias seqüências expressas (ESTs) foram identificadas a partir de diversas condições biológicas. Bibliotecas de EST utilizando folhas e ramos infectados com *X. fastidiosa* foram construídas em citros e café, respectivamente. A análise *in silico* das ESTs nesses tecidos revelou genes comuns expressos em ambas as culturas. Alguns destes genes codificam para proteínas relacionados com a resposta de estresse hídrico, incluindo a aquaporina, a “drought-induced protein Di19-like protein DIP” e a “fiber protein Fb2”. Estes genes foram analisados neste estudo.

Palavras-chave: EST, filogenia, aquaporina, “drought-induced protein Di19-like protein DIP”, “fiber protein Fb2”.

In silico ANALYSIS OF AQUAPORINS POTENTIALLY INVOLVED WITH WATER STRESS IN COFFEE- AND CITRUS-*Xylella fastidiosa* INTERACTIONS

Abstract:

Currently, one of the important problems faced in Brazil by coffee and citrus producers involves the losses caused by the phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. This bacterium colonizes xylem vessels probably resulting in reduced hydraulic conductance and thus, causing typical symptoms of water stress and deficiency in mineral nutrition. Functional genomic analyses have been performed in coffee and citrus and several ESTs were obtained from different biological conditions. The EST libraries from leaves and stems infected with *X. fastidiosa* were constructed in citrus and coffee, respectively. The *in silico* analysis of the expressed sequences in these tissues revealed genes commonly expressed in both cultures. Some of these genes are involved in water stress, including aquaporin, drought-induced protein Di19-like protein (DIP) and fiber protein Fb2. These genes were analyzed in this study.

Key words: EST, phylogeny, aquaporin, drought-induced protein Di19-like protein DIP, fiber protein Fb2.

Introdução

Xylella fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica Gram-negativa, limitada aos vasos do xilema e transmitida para as plantas através de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). No Brasil, esta bactéria está associada à escaldadura das folhas da ameixeira (French & Feliciano, 1982), clorose variegada dos citros (Rosseti et al., 1990) e requeima das folhas do cafeeiro (ou atrofia dos ramos do cafeeiro) (Paradella Filho et al., 1995), além de ter sido detectada em várias espécies de plantas invasoras (Lopes et al., 1999) e ornamentais (Ueno et al., 1998; Kitajima et al., 2000).

A primeira ocorrência da bactéria *X. fastidiosa* em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) foi relatada na cultivar Mundo Novo no Estado de São Paulo em 1995 (Paradela et al., 1995). Cafeeiros infectados pela bactéria apresentavam ramos com internódios curtos, folhas cloróticas, pequenas e deformadas, abscisão foliar e seca de ramos (Paradela et al., 1995). Sintomas de queima de bordas de folhas também têm sido associados com a infecção de cafeeiro por *X. fastidiosa* (Lima et al., 1996). A presença da bactéria associada ao cafeeiro tem sido relatada nas diferentes regiões produtoras de café dos principais estados produtores, como São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo e Bahia (Paradela et al., 1995; Lima et al., 1996; Ueno & Leite, 1996), e esses relatos têm se restringido às cultivares de *C. arabica*.

A clorose variegada do citros é outra doença causada por *X. fastidiosa*, cujos sintomas nas laranjeiras incluem manchas evidentes nas folhas mais velhas, com áreas cloróticas, desbotadas em sua face superior e lesões de cor marrom clara na face inferior. A consequência econômica deste processo no Brasil, produtor de quase metade do suco de laranja concentrado presente no mercado internacional, são prejuízos estimados em US\$ 100 milhões anuais.

A *X. fastidiosa* adere à parede dos vasos que transportam a seiva devido à goma que produz, resultando na obstrução desses vasos, o que causa sérios danos à planta, impossibilitando a passagem de água e nutrientes (Simpson et al., 2000). Desta forma esta bactéria pode promover uma condição de estresse hídrico, ocasionando a indução ou a repressão de determinados genes que estão relacionados a esse processo.

O presente trabalho teve por objetivo identificar mecanismos comuns de resposta à *X. fastidiosa*, em café e citros.

Material e Métodos

Análise *in silico* das ESTs de café e citros

Bibliotecas de ESTs foram previamente construídas utilizando RNA extraído de ramos de café (Vieira et al., 2006) e folhas de citros, ambos infectados com *X. fastidiosa* (de Souza et al., no prelo), sendo que ambas as plantas são suscetíveis à bactéria. Foi realizada uma comparação de seqüências dessas duas bibliotecas, presentes nos bancos de dados CafEST (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe>) e CitEST (<http://citest.centrodecitricultura.br>), respectivamente, utilizando o programa Blastn (Altschul et al., 1997). Os 5483 unigenes da biblioteca de café foram confrontados com as 6495 seqüências de citros para a identificação de mecanismos comuns de resposta à *X. fastidiosa*. Alguns genes relacionados com estresse hídrico foram identificados em ambas as bibliotecas.

As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos *contigs* de café foram comparadas com as seqüências de outras plantas disponíveis no GenBank. Os alinhamentos foram obtidos utilizando o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw). A partir desses alinhamentos foi construída a árvore filogenética das aquaporinas pelo programa MEGA 3.0 (Kumar et al., 2004) com o método de *Neighbour Joining*, sendo que os ramos foram testados por *bootstrapping*.

Resultados e Discussão

A análise dos genes comuns entre as duas bibliotecas revelou genes potencialmente envolvidos com a resposta de estresse hídrico. Alguns destes genes foram selecionados para análise incluindo a aquaporina, “fiber protein Fb2” e “drought-induced protein Di19-like protein” (DIP).

A aquaporina representa uma classe de proteínas integrantes da membrana que facilitam a difusão passiva da água através da membrana das células. As aquaporinas da planta são divididas em quatro grupos ou classes baseados na similaridade da seqüência de aminoácidos: “plasma membrane intrinsic proteins” (PIPs), “tonoplast intrinsic proteins” (TIPs), “nodulin-like intrinsic proteins” (NIPs) e “small basic intrinsic proteins” (SIPs). As aquaporinas são encontradas na membrana das células de todos os organismos vivos, incluindo fungos, bactérias, plantas e animais. (Tyerman et al. 2002) e podem aumentar a condutibilidade hidráulica osmótica da membrana (Preston et al. 1992; Siefritz et al. 2002).

O estresse hídrico apresenta uma forte influência na expressão do gene que codifica a aquaporina (Baiges et al. 2002), seja na sua indução ou na sua repressão. A indução deste gene está relacionada ao aumento da permeabilidade da membrana ao transporte da água quando esta está em baixa disponibilidade (Yamada et al. 1997), ou seja, em condições de déficit hídrico. Já a repressão deste gene pode incentivar a conservação da água da célula durante períodos de estresse hídrico (Li et al. 2000; Smart et al. 2001).

Neste estudo foram identificados 20 *contigs* e 4 *singlets* apresentando similaridade com aquaporinas. Todos estes *clusters* foram também encontrados na biblioteca de citros, indicando que a expressão deste gene pode estar relacionada a um mecanismo comum de resposta a *X. fastidiosa* em café e citros. Os *clusters* apresentando seqüências completas foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética que revelou 4 grupos principais (Figura 1).

Outro gene analisado foi o “drought-induced protein Di19-like protein DIP”. A família de proteínas Di19 consiste em diversas proteínas induzidas por esse tipo de estresse hídrico (Asamizu, et al., 1998). Di19 foi encontrado sendo fortemente expresso em raízes e folhas de *Arabidopsis thaliana* durante a seca progressiva e foi descrito anteriormente como um gene induzido pela desidratação, ABA-independente em *Arabidopsis*, mas a função precisa desta proteína é desconhecida (Milla et al., 2006). Neste estudo, apenas 1 *contig* relacionado à proteína Di19 foi encontrado na biblioteca RX1, o qual foi também expresso em citros.

O terceiro gene analisado foi o “fiber protein Fb2”, de função desconhecida, porém apresentando expressão induzida por seca (Sasaki, et al., 2002), condição oferecida pela infecção por *X. fastidiosa*. Foram obtidos 2 *contigs* e 1 *singlet* apresentando similaridade com a proteína Fb2 em café. Novamente, essas seqüências foram também encontradas em citros.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a resposta ao estresse hídrico causado por *X. fastidiosa* é um mecanismo de defesa comum utilizado por genótipos suscetíveis de cafeeiro e citros.

Referências Bibliográficas

Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Mille W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402

Asamizu, E.; Sato, S.; Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Kotani, H.; Miyajima, N. & Tabata, S. (1998) Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. VIII. Sequence features of the regions of 1,081,958 bp covered by seventeen physically assigned P1 and TAC clones. *DNA Res.* 5 (6):379-391.

Baiges, I.; Schaffner, A.R.; Affenzeller, M.J.; Mas, A. (2002) Plant aquaporins. *Plant Physiol* 115:175–182

- de Souza, A.A.; Takita, M.A.; Colleta-Filho, H.D.; Targon, M.L.P.N. et al. (2007) Analysis of expressed sequence tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. *Gen Mol Biol*, no prelo.
- French, W.J. & Feliciano, A. (1982) Distribution and severity of plum leaf scald disease in Brazil. *Plant Disease* 66:515-516.
- Jang, J.K.; Kim, D.G.; Kim, Y.O.; Kim, J.S.; Kang, H. (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 54:713–725
- Kitajima, E.W.; Coletta Filho, H.D.; Machado, M.A. et al. (2000) Escaldura das folhas em *Hibiscus schizopetalus* associada à infecção por *Xylella fastidiosa* em Brasília-DF. *Fitopatologia Brasileira* 25:323.
- Kumar, S.; Tamura, K. & Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Li, L.; Li, S.; Tao, Y.; Kitagawa, Y. (2000) Molecular cloning of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Sci* 154:43–51
- Lima, J.E.O.; de Miranda, V.S.; Coutinho, A.; Roberto, S.R. & Carlos, E.F. (1996) Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro nas regiões cafeeiras, e seu isolamento *in vitro*. *Fitopatologia Brasileira* 21:392-393.
- Milla, M.A.R.; Townsend, J.; Ing-Feng Chang & John C. Cushman. (2006) The Arabidopsis AtDi19 gene family encodes a novel type of Cys2/His2 zinc-finger protein implicated in ABA-independent dehydration, high-salinity stress and light signaling pathways. *Plant Molecular Biology* 61:13-30.
- Lopes, A.S.; Roberto, G.P. & França, S.C. (1999) Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* dos citros. *Fitopatologia Brasileira* 24:250 (Supl.).
- Paradela Filho, O.; Sugimori, M.H.; Ribeiro, I.J.A. et al. (1995) Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. *Laranja* 16(2):135-136.
- Preston, G.M.; Carroll, T.P.; Guggino, W.B.; Agree, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385–387
- Rossetti, V.; Garnier, M.B.; Bové, J.M. et al. (1990) Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *C.R.S. Academy Sciences Paris*, 310:345-349.
- Sasaki, T.; Matsumoto, T. & Yamamoto, K. (2002) *Oryza sativa* nipponbare(GA3) genomic DNA, chromosome 2, PAC clone:P0572A04. *Database*.
- Siefritz, F.; Tyree, M.T.; Lovisolo, C.; Schubert, A.; Kaldenhoff, R. (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell*, 14:869–876.
- Simpson, A. J.; Reinach, F. C.; Arruda, P. et al. (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature*, 406:151-157.
- Smart, L.B.; Moskal, W.A.; Cameron, K.D.; Bennett, A.B. (2001) MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiology*, 42:686–693
- Tyerman, S.D.; Niemietz, C.M.; Bramley, H. (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environment*, 25:173–194.
- Ueno, B.; Funada, C.K.; Yorinori, M.A. & Leite Junior, R.P (1998) Primeiro relato da ocorrência da *Xylella fastidiosa* em *Catharanthus roseus* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 23:217. Suplemento.
- Yamada, S.; Komori, T.; Myers, P.N.; Kuwata, S.; Kubo, T.; Imaseki, H. (1997) Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiology*, 38:1226–1231
- Vieira, L.; Andrade, A.; Colombo, C.; Moraes, A.; Mehta, A. et al. (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1):95-108.

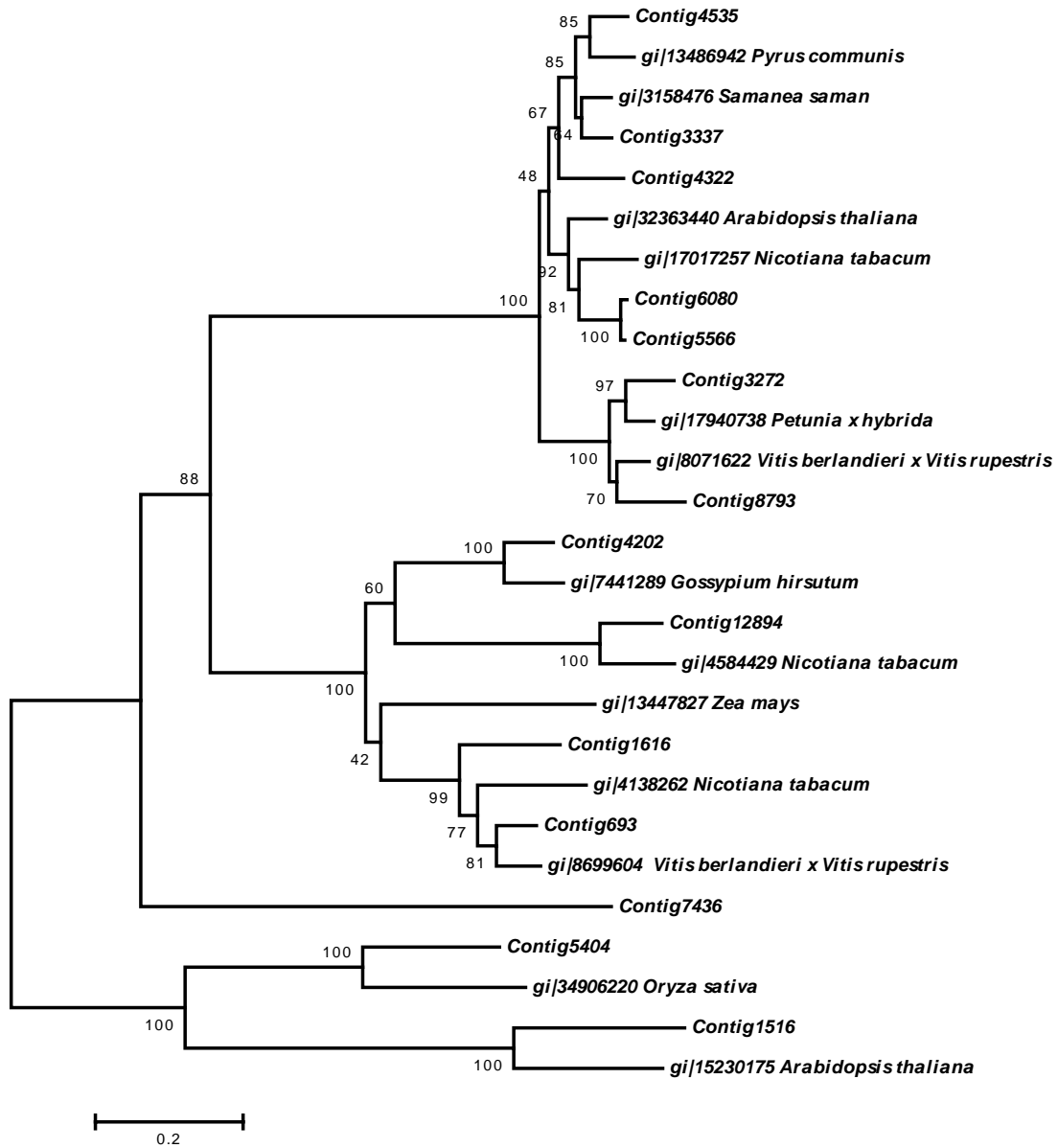


Figura 1 – Árvore filogenética de seqüências de aminoácidos de aquaporinas de café e de homólogos encontradas no GenBank, construída utilizando o programa Mega 3.0 (Kumar et al., 2004), com o método de *Neighbour Joining*.