

# ANÁLISE *IN SILICO* DE GENES DE DEFESA DO CAFÉ EXPRESSOS EM RAMOS INFECTADOS POR *Xylella fastidiosa*.

Fernanda R. RABELLO<sup>1</sup>; Marcelo F. CARAZZOLLE<sup>2</sup>; Natália F. MARTINS<sup>3</sup>; Magnólia A. CAMPOS<sup>4</sup>; Marília S. SILVA<sup>5</sup>; Alba C. SILVA<sup>6</sup>; Angela MEHTA<sup>3</sup>, E-mail: amehta@cenargen.embrapa.br

<sup>1</sup> Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF <sup>2</sup> Universidade de Campinas – Unicamp, Campinas, SP <sup>3</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF <sup>4</sup> Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG <sup>5</sup> Embrapa Cerrados, Planaltina, DF <sup>6</sup> Embrapa Café, Brasília, DF.

## Resumo:

Um dos problemas que afetam a cultura do café é o depauperamento da folha do cafeeiro (“Coffee Leaf Scorch” - CLS), causado pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Esta bactéria forma agregados no xilema da planta, impossibilitando a passagem de água e nutrientes. Em virtude da importância econômica da cultura do café para o Brasil e das perdas causadas por *X. fastidiosa*, uma biblioteca de cDNA (RX1) foi construída utilizando ramos de cafeeiro infectados com esta bactéria e os ESTs (“Expressed sequence tags”) foram incluídos no banco de dados do CafEST (Genoma Funcional de Café). Com o objetivo de identificar genes potencialmente envolvidos nos processos de defesa de cafeeiro infectado com *X. fastidiosa*, foi realizada uma análise *in silico* dos ESTs de RX1. Foi analisado um total de 7502 seqüências, que foram agrupadas em 5483 *clusters*. A análise global baseada em ontologia de função molecular desses *clusters* revelou que a maior parte dos genes (cerca de 70%) está envolvida com metabolismo e processos fisiológicos celulares. Aproximadamente 1% dos ESTs está envolvido com estresse biótico e 2% com estresse abiótico. Foram encontrados ainda genes relacionados com a resposta a estímulos externos e ao estresse, diferenciação celular, entre outras funções. Dos 5483 *clusters* da biblioteca RX1, 2254 representam possivelmente genes únicos, pois não foram encontrados nas outras 37 bibliotecas do CafEST, construídas a partir de diferentes tecidos e condições biológicas. Muitos destes genes estão classicamente envolvidos com os processos de defesa da planta, incluindo aqueles que codificam para oxidases, peroxidases, lipoxigenases, proteínas de resistência, entre outros.

Palavras-chave: café, cDNA, ESTs, *Xylella fastidiosa*, gene de defesa.

## *In silico* ANALYSIS OF DEFENSE GENES EXPRESSED IN COFFEE BRANCHES INFECTED WITH *Xylella fastidiosa*

### Abstract:

One of the major problems that affects the coffee culture is the Coffee Leaf Scorch (CLS), caused by the phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. This bacterium blocks the passage of water and nutrients in the xylem of plants. Due to the economic importance of the coffee culture to Brazil and the losses caused by *X. fastidiosa*, a cDNA library (RX1) was constructed using infected coffee branches and the ESTs (Expressed sequence tags) were included in the coffee genome database CafEST. The objective of this study was to identify genes potentially involved in defense processes in response to *X. fastidiosa* infection, by *in silico* analysis of the RX1 ESTs. Clustering analysis grouped a total of 7502 sequences from RX1 library into 5483 clusters. The global analysis based on gene ontology of these clusters showed that most genes (approximately 70%) are involved in metabolism and physiological processes. Approximately 1% of the ESTs are involved in biotic stresses and 2% in abiotic stress conditions. Out of the 5483 clusters of the RX1 library, 2254 represented possible unique genes, since they were not found in the other 37 libraries of the CafEST, constructed by using different tissues and biological conditions. Several of these genes are classically involved in defense processes, including genes that encode oxidases, peroxidases, lipoxygenases and resistance proteins, among others.

Key words: coffee, cDNA, ESTs, *Xylella fastidiosa*, defense gene.

## Introdução

O Brasil é um grande produtor de café, sendo esta cultura de grande importância econômica para o país. Um dos problemas que afetam esta cultura é o depauperamento da folha do cafeeiro (“Coffee Leaf Scorch” - CLS), causado pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que mostrou ser o agente causal da requeima das folhas do cafeeiro (Paradella Filho et al., 1995). A *X. fastidiosa* é uma bactéria fitopatogênica, Gram-negativa que forma agregados no xilema da planta, impossibilitando a passagem de água e nutrientes, causando com isso a redução do tamanho das folhas, amarelecimento, principalmente na parte apical da planta, queima dos bordos das folhas mais velhas, encurtamento de entre-nós, frutos pequenos, podendo levar à morte de ramos e da planta (Matiello et al., 1998).

O mecanismo de patogenicidade da *X. fastidiosa* não é bem compreendido. Acredita-se que polissacarídeos e enzimas extracelulares tenham um papel importante na colonização dos vasos do xilema (Simpson et al., 2000). Entretanto, os mecanismos de interação planta-patógeno não são conhecidos. Assim, o presente trabalho objetivou identificar genes relacionados à interação compatível *Xylella*-cafeeiro suscetível, e para tal foi realizada uma análise *in silico* de genes potencialmente envolvidos com os processos de defesa expressos em uma biblioteca de EST previamente construída a partir de ramos de café infectados com *X. fastidiosa*.

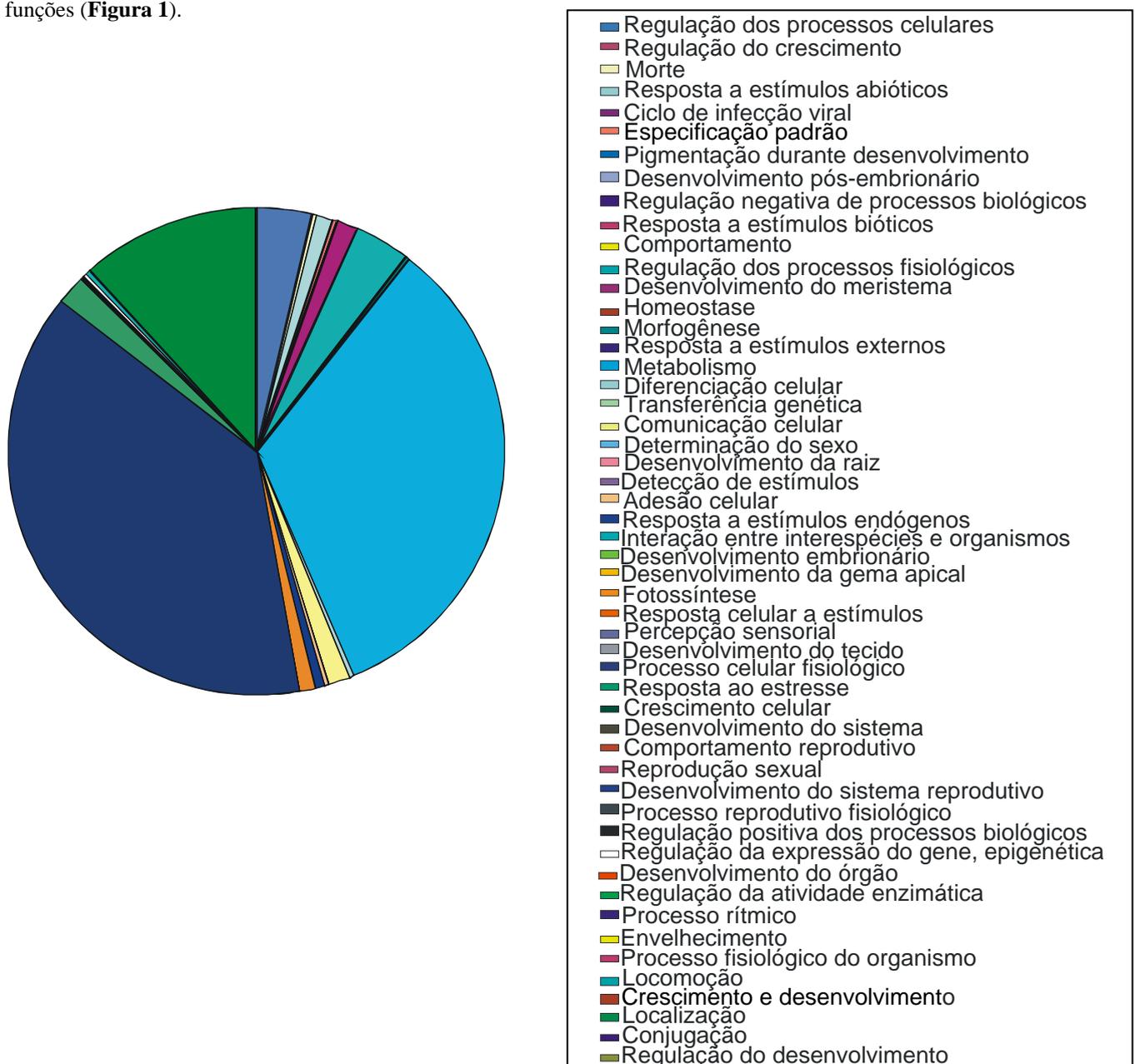
## Material e Métodos

### Análise *in silico* de genes expressos

Uma biblioteca de ESTs foi previamente construída utilizando ramos de café infectados com *X. fastidiosa* (Vieira et al., 2007). Foram analisados 5483 *clusters* de café formados por pelo menos um *read* da biblioteca RX1 (ramos de café infectados com *X. fastidiosa*) e as informações obtidas na anotação manual permitiram a construção de agrupamentos por níveis de ontologia gênica (GO, *Gene Ontology*), separados pela ontologia de função molecular. O padrão de expressão dessa biblioteca foi também comparado ao das outras 37 bibliotecas de café construídas no Projeto Genoma Café.

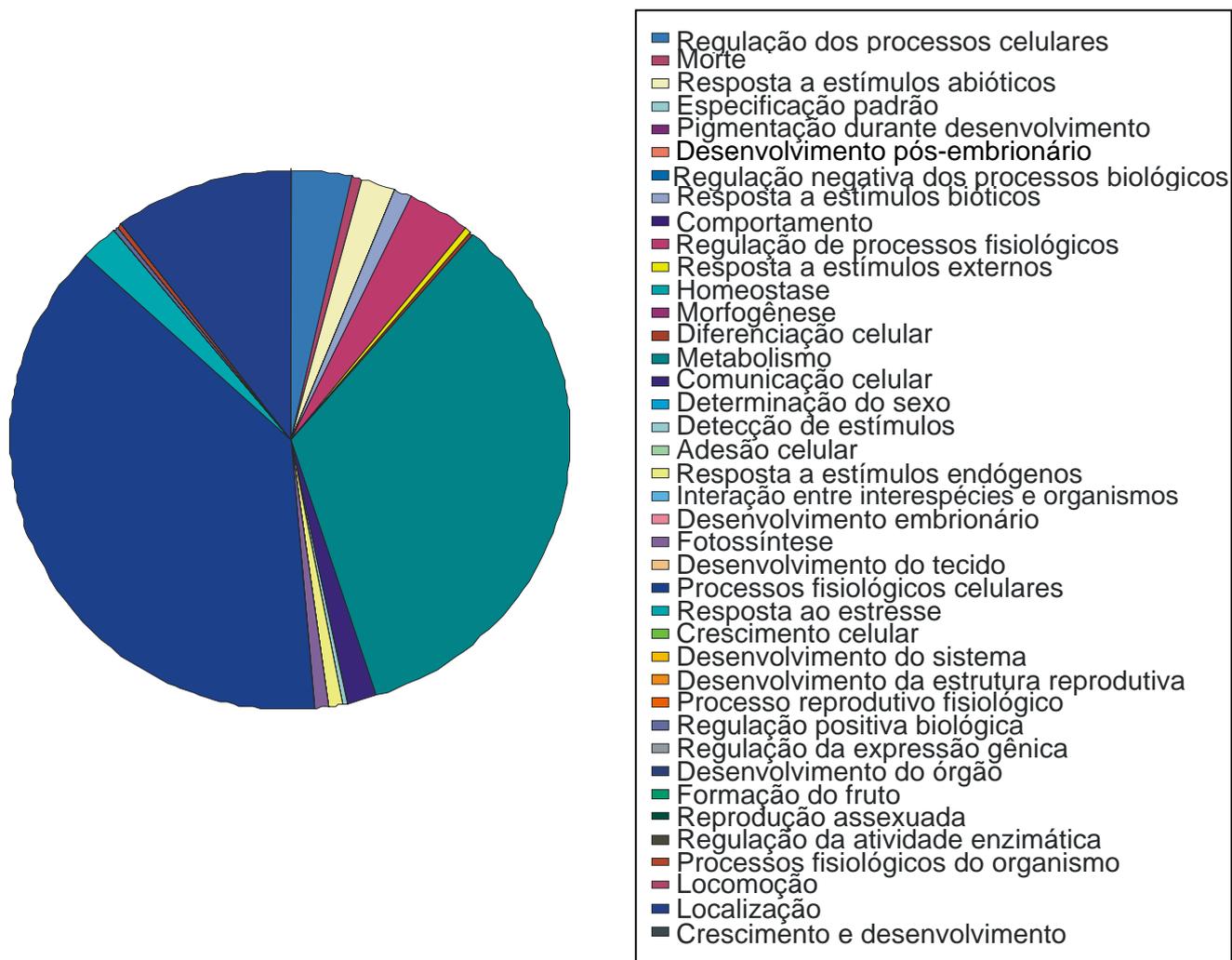
## Resultados e Discussão

A análise da biblioteca de ESTs construída revelou um total de 9696 *reads* seqüenciados, sendo que 7502 *reads* foram considerados válidos, os quais formaram 5483 *clusters*. A análise global baseada em ontologia de função molecular desta biblioteca mostrou que a maior parte dos genes (aproximadamente 33%) está envolvida com metabolismo e 38% com os processos fisiológicos celulares. Aproximadamente 1% está envolvido com estresse biótico e 1% com estresse abiótico. Foram encontrados também genes relacionados com a resposta a estímulos externos, diferenciação celular, entre outras funções (**Figura 1**).



**Figura 1** – Agrupamento de genes expressos em ramos de *C. arabica* infectados com *X. fastidiosa* baseado em ontologia de função molecular.

Dos 5483 *clusters* da biblioteca RX1, 2254 representam genes únicos, não encontrados nas outras 37 bibliotecas de café construídas a partir de diferentes tecidos e condições biológicas. A maioria destes genes (aproximadamente 38%) está relacionada com os processos fisiológicos celulares; 2% estão associados ao estímulo abiótico e 1% ao estímulo biótico (**Figura 2**).



**Figura 2** – Agrupamento de genes exclusivamente expressos em ramos de café infectados com *X. fastidiosa* baseado na função molecular, usando o GO.

A análise de genes únicos da biblioteca RX1 levou a identificação de vários genes potencialmente envolvidos com os processos de defesa da planta, incluindo oxidases, peroxidases, e lipoxigenases (**Tabela 1**). Inesperadamente, uma peroxidase estava presente apenas nesta biblioteca e foi representada por um único transcrito. Estudos futuros deverão ser realizados para confirmar o envolvimento e possíveis funções destes genes no processo de defesa da planta e na interação cafeeiro-*Xylella*.

**Tabela 1.** Genes expressos em ramos de *C. arabica* infectados com *X. fastidiosa*, possivelmente envolvidos em respostas de defesa.

Proteína codificada	Organismo Homólogo	Número de Acesso	e-value
Expressed protein	<i>A. thaliana</i>	gi  18395895	3e – 48
Putative heat shock protein	<i>A. thaliana</i>	gi  15242707	0,002
Putative glutathione S-transferase	<i>O. sativa</i>	gi  24796806	4e – 45
Elongation factor Tu family protein	<i>A thaliana</i>	gi  15221423	5e – 17
Proline-rich protein family	<i>A. thaliana</i>	gi  15219860	1e – 06
NADPH oxidoreductase homolog	<i>C. arietinum</i>	gi  4958922	8e – 16
Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>Malus x domestica</i>	gi  6969976	7e – 91
Malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxilating) (NADP)	<i>L. esculentum</i>	gi  7431232	3e – 54
Heat shock protein cognate 70	<i>O. Sativa</i>	gi  29124135	1e – 17
ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	<i>N. plumbaginifolia</i>	gi  114421	5e – 18
Tryptophan synthase alpha chain	<i>A. thaliana</i>	gi  21593559	3e – 62
Thioredoxin H-type	<i>A thaliana</i>	gi  15231958	3e – 22
Endochitinase	<i>O. Sativa</i>	gi  47497287	8e – 52
Tospovirus resistance protein D	<i>L. esculentum</i>	gi  15418713	3e – 49
Putative late blight resistance protein	<i>S. demissum</i>	gi  48057663	6e – 43
Putative disease resistance protein	<i>S. demissum</i>	gi  47900744	1e – 31
Copper methylamine oxidase precursor	<i>A. thaliana</i>	gi  30689034	2e – 76
Latex-abundant family protein/caspase family protein	<i>A. thaliana</i>	gi  30678252	4e – 59
Alternative oxidase 1a, mitochondrial [precursor]	<i>P. tremula x P. tremuloides</i>	gi  6967043	2e – 39
Putative ascorbate peroxidase (TL29)	<i>L. esculentum</i>	gi  11387206	1e – 48
Peroxidase	<i>G. max</i>	gi  4204763	1e – 91
Lipoxygenase	<i>S. tuberosum</i>	gi  7433144	3e – 67
Disease resistance-responsive protein-related/dirigent protein	<i>A. thaliana</i>	gi  15239779	8e – 32
DNA-damage-repair/toleration protein	<i>A. thaliana</i>	gi  21536600	5e – 97

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio recebido da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, da Embrapa Café e do Consórcio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil.

## Referências Bibliográficas

- Matiello, J.B.; Miranda, V.S.; Almeida S.R.; Manfio, G.P. (1998) "Amarelinho" ou requeima das folhas do cafeeiro: conheça e tome cuidado. *Boletim Informativo Fund. André Tosello-CTC/Fundecitrus. Apoio: Bayer.*
- Paradela Filho, O.; Sugimori, M.H.; Ribeiro, I.J.A.; Machado, M.A.; Laranjeira, F.F.; Garcia Júnior, A, Beretta, M.J.G.; Harakava, R.; Rodrigues Neto, J.; Beriam, L.O.S. (1995) Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citrus. *Laranja, Cordeirópolis* 16(2):127-134.
- 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.
- Vieira, L. Andrade, A.; Colombo, C.; Moraes, A.; Mehta, A. *et al.* (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol*, 18(1):95-108.