

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE ACC OXIDASE DE CAFÉ¹

GALVÃO, R.M.²; KOBAYASHI, A.K.²; RIBAS, A.F.²; BESPALHOK FILHO, J.C.²; PEREIRA, L.F.P.² e VIEIRA, L.G.E.

IAPAR - Laboratório de Biotecnologia - Londrina-PR, Cx. Postal 481 – CEP 86000-970.

¹ Apoio financeiro: CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ; ² Autor para correspondência, <lpereira@pr.gov.br>

RESUMO: O fitorregulador etileno está associado a vários eventos fisiológicos em plantas. Em frutos climatéricos, um aumento dramático na síntese de etileno promove os passos subsequentes do amadurecimento. A enzima ACC oxidase catalisa o último passo de biossíntese deste fitorregulador, convertendo 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) em etileno. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar genes de ACC oxidase de *Coffea* spp. para serem usados subsequentemente em projetos de transformação genética visando o controle da maturação dos frutos. Oligonucleotídeos baseados em regiões conservadas de genes heterólogos de ACC oxidase foram projetados para amplificar o fragmento a partir de cDNA. Fragmentos de cDNA amplificados foram clonados no vetor pUC 18 através do SureClone™ Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Um clone completo de 0,96 Kb de *C. arabica* foi obtido. A sequência de nucleotídeos e de aminoácidos demonstrou alta homologia com ACC oxidase de *Actinidia*, *Carica*, *Prunus* e *Betula*. Para determinar o padrão de expressão do gene em diferentes tecidos e de frutos em diferentes estádios de maturação foi usada a técnica de RT-PCR. Houve diferentes níveis de expressão de ACC oxidase nos tecidos testados. Como esperado, a expressão de ACC oxidase foi elevada em frutos de café em fases iniciais de amadurecimento. O gene de ACC oxidase foi clonado em orientação anti-senso em vetores para transformação direta e em vetores binários, contendo promotor e terminador 35S CaMV.

Palavras-chave: café, ACC oxidase, etileno, maturação.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF COFFEE ACC OXIDASE GENES

ABSTRACT: The phytohormone ethylene is associated with several physiological events in higher plants. In climacteric fruits, an increase in ethylene biosynthesis promotes the subsequent steps of fruit ripening. The enzyme ACC oxidase catalyzes the last step of ethylene biosynthesis, converting 1-

aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to ethylene. Our objectives were to isolate and characterize an ACC oxidase cDNA from *Coffea* spp, that will be used subsequently in experiments related to fruit ripening control. Primers based in conserved regions from ACC oxidase sequences were designed to amplify the ACC oxidase cDNA fragment. The fragments were cloned in pUC18 vector using the SureClone™ Ligation Kit (Amershan Pharmacia Biotech). A full-length 0.96 Kb cDNA clone of *Coffea arabica* was obtained. The nucleotide and the amino acids deduced sequences showed high homology with ACC oxidase from *Actinidia*, *Carica*, *Prunus* and *Betula*. RT-PCR was used to determine the gene expression pattern from different tissues and from fruits at different ripening stages. There were different levels of ACC oxidase expression in all tested tissue. As expected, the expression ACC oxidase was higher in coffee fruits at initial stages of ripening. Meanwhile, fruits at the final stages of ripening (purple-red colour) had lower expression, and fruits at pre-ripening stages (green colour) showed the lowest expression. The ACC oxidase clone had been transferred in antisense orientation to transformation vectors. Those vectors are being used in genetic transformation experiments for control of ripening process in coffee fruits.

Key words: coffee, ACC oxidase, ethylene, ripening.

INTRODUÇÃO

A maturação desuniforme dos frutos associada com a colheita de derriça fazem com que haja queda na qualidade do café produzido, devido principalmente à presença de frutos verdes ou secos (Browning e Fischer, 1976; Camargo et al., 1985). Atualmente, para evitar que a baixa uniformidade na maturação dos frutos prejudique a qualidade do produto, é necessário utilizar a colheita parcelada e seletiva dos frutos maduros. Neste sistema, o número de colheitas em uma mesma árvore pode variar de 3 a 5, dependendo do número de floradas. Apesar de a colheita seletiva ser adotada em vários países produtores de café, é improvável que venha a ser empregada em larga escala no Brasil, em razão do seu alto custo. Uma das alternativas para uma maturação uniforme dos frutos é o controle da síntese do fitorregulador etileno. No café, assim com nos demais frutos climatéricos, ocorre grande aumento da síntese de etileno durante os estágios iniciais da maturação (Pereira et al., 2000). Hoje, já se tem um bom entendimento do metabolismo do etileno nas plantas, e os principais genes envolvidos na sua síntese, a 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-sintase e a ACC-oxidase, já foram isolados em várias espécies,

possibilitando a manipulação da produção de etileno em frutos durante a maturação (Oeller et al., 1991; Ayub et al., 1996). O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar genes de ACC oxidase de *Coffea* spp. para uso subsequente em projetos de transformação genética visando o controle da maturação dos frutos.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem molecular do cDNA de ACC oxidase de *Coffea* spp.

Dois oligonucleotídeos baseados em seqüências de genes de ACC oxidase foram usados para amplificação, utilizando como molde cDNA proveniente de RNA mensageiro extraído de frutos de *Coffea arabica* IAPAR 59 em fases iniciais de amadurecimento. Através do “SureClone Ligation Kit” (Amersham Pharmacia Biotech), o cDNA amplificado foi clonado no sítio *Sma* I do vetor pUC 18, dando origem ao clone denominado pIBI 11. Similarmente, fragmentos de cDNA amplificados por RT-PCR a partir do RNA total de folhas maduras de *Coffea canephora* e *Coffea racemosa* foram clonados em pUC 18.

Análise da seqüência do cDNA de ACC oxidase de *C. arabica*

A seqüência completa do clone pIBI 11 foi determinada. A seqüência de aminoácidos da proteína ACC oxidase de *Coffea arabica* foi deduzida a partir da seqüência codificante do cDNA clonado, utilizando-se o programa “Six Frame Translation of Sequence”. O alinhamento das seqüências de aminoácidos de diferentes ACC oxidases foi executado pelo CLUSTAL W (1.81) “Multiple Sequence Alignments”.

Construção de vetores para transformação contendo ACC oxidase de *C. arabica*

O fragmento Kpn I/Bam HI de 0,96 Kb do clone pIBI 11 foi subclonado no vetor pFF 19. Esta subclonagem deu origem ao clone pIBI 21, que contém o cDNA “anti-senso” de ACC oxidase de *Coffea arabica* unido a seqüências promotora e terminadora 35S derivadas do CaMV. O fragmento *Eco* RI/*Hind* III de 1,9 Kb deste plasmídeo foi inserido no vetor pCAMBIA 3300, dando origem ao vetor binário pIBI 23, que contém na região de transferência o cDNA anti-senso de ACC oxidase de *Coffea arabica* e o gene *bar* que confere tolerância ao herbicida Glufosinato de Amônio.

Análise da expressão de ACC oxidase em *C. arabica* por RT-PCR

Com objetivo de estudar o padrão da expressão do gene ACC oxidase em plantas de *C. arabica*, foram realizados ensaios de RT-PCR a partir do RNA total, livre de DNA, extraído de diferentes tecidos e

de três estádios distintos de maturação de frutos. Os cDNAs foram sintetizados utilizando-se o “T-Primed First Strand Kit” (Amersham Pharmacia Biotech) a partir de 1 µg de RNA total de folhas jovens, folhas maduras completamente expandidas, ramos e frutos em três estádios de maturação: verde, avermelhado e cereja. Quantidades equivalentes de cDNA foram usadas como molde para reações de PCR, utilizando os oligonucleotídeos para ACC oxidase citados anteriormente. Além dos oligonucleotídeos para o cDNA de ACC oxidase foram utilizados também nas reações de RT-PCR oligonucleotídeos para o RNA ribossomal 18S, que apresenta expressão constitutiva em todos os tecidos, servindo, portanto, para comprovar que as quantidades de cDNA contidas nas reações estavam normalizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica empregada na clonagem de seqüências de cDNA de ACC oxidase de *Coffea* spp. produziu sete clones distintos (Figura 1), sendo um de *C. arabica*, dois de *C. canephora* e quatro de *C. racemosa*. Provavelmente, os clones provenientes de *C. racemosa* não estão completos, devido ao seu tamanho reduzido. O fragmento de 965 pb correspondente ao clone derivado do cDNA de frutos de *Coffea arabica* teve sua seqüência completamente determinada (Figura 2) e analisada no “Gene Bank” através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST). O cDNA clonado apresentou alta identidade com seqüências de ACC oxidase de outras espécies vegetais. O alinhamento da seqüência deduzida da proteína ACC oxidase de *C. arabica* com as seqüências homólogas de outras espécies mostrou um nível máximo de identidade entre as seqüências alinhadas de 83% (Figura 3). A maior identidade de seqüência foi observada com a seqüência da enzima ACC oxidase de *Actinidia*. As regiões mais divergentes correspondem àquelas situadas nas extremidades do cDNA.

Visando os experimentos de transformação genética de plantas de café, foi construído um vetor binário para a transformação mediada por *Agrobacterium* (Figura 4). Neste vetor, a região de transferência possui o cDNA de ACC oxidase de *Coffea arabica* na orientação anti-senso sob o controle de seqüências promotoras e terminadoras 35S de CaMV e o gene *bar*, que confere tolerância ao herbicida Glufosinato de Amônio.

Nos ensaios de RT-PCR para análise do padrão da expressão nos tecidos mostrado na Figura 5A, foi observado que folhas maduras e frutos em estádios intermediários de maturação apresentam maior expressão, seguida pelas folhas jovens e pelos ramos que apresentaram baixa expressão. Em relação à expressão em diferentes estádios de maturação de frutos (Figura 5B), frutos em estádios intermediários de maturação apresentaram forte indução da expressão de ACC oxidase, comparada com o que ocorre em

frutos verdes. Em frutos cereja, observa-se diminuição da expressão em relação ao estágio anterior. Esse resultado vem reforçar a idéia de que a inibição deste gene poderá acarretar diminuição na produção da enzima e, conseqüentemente, na produção de etileno na planta.

CONCLUSÕES

Através de técnicas de RT-PCR foi possível identificar diferentes genes de ACC oxidase de *Coffea* spp. O gene clonado de *C. arabica* foi inserido em orientação anti-senso em vetores de transformação. A expressão do gene de ACC oxidase de *C. arabica* em frutos fortalece a hipótese de que a inibição deste gene poderá produzir plantas com maturação dos frutos mais uniforme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYUB, R.; GUIZ, M.; AMOR, M.B.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J.P.; LATSCH, A.; BOUZAYEN, M. AND PECH, J.C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nature Biotechnology**, 14:862-866.
- BROWNING, G. AND FISHER, N.M. 1976. **Kenya Coffee**, 41:209-218.
- CAMARGO, A. P; ALMEIDA, S.R.; MIGUEL, A.E. AND MATIELLO, J.B. 1985. In: Congresso Brasil. **Pesq. Caf.**, 12, p.36-37.
- PEREIRA, L.F.P.; KOBAYASHI, A.K. E VIEIRA, L.G.E. 2000. In: III Sem. Internacional Biotec. Agroind. **Cafecira**. IAPAR, Londrina, Brasil, pp 37-41.
- OELLER, P.W.; MIN-WONG, L.; TAYLOR, L.P.; PIKE, D.A. AND THEOLOGIS, A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, 254:437-439.

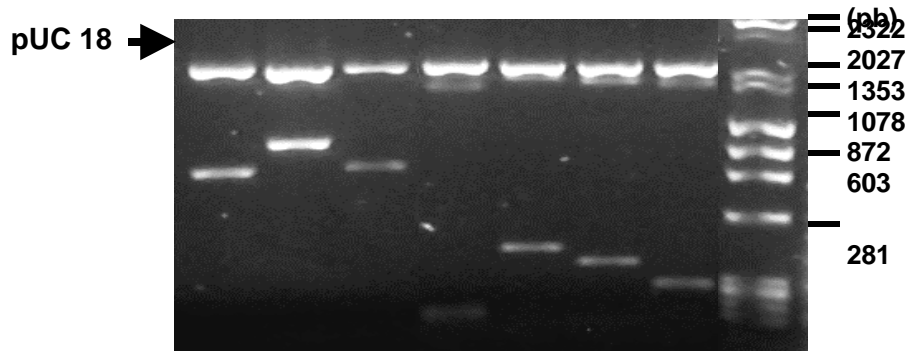


Figura 1 - Clones de cDNA de ACC oxidase de *Coffea* spp. O DNA plasmidial dos clones foi digerido com as enzimas *Eco* RI e *Bam* HI, que proporcionam a liberação completa do inserto. 1 - pIBI 11 - *Coffea arabica* IAPAR59, 2 - pIBI 13 - *Coffea canephora*, 3 - pIBI 14 - *Coffea canephora*, 4 - pIBI 16 - *Coffea racemosa*, 5 - pIBI 17 - *Coffea racemosa*, 6 - pIBI 18 - *Coffea racemosa*, 7 - pIBI 19 - *Coffea racemosa* e M - Marcador de peso molecular.

>ACC oxidase *Coffea arabica*

AAGAGAGATGGCTACATTCCCCCTAATCGACATGGAG**AAGCTT**GACGGCCNNAGAGGAAATNACTATGGGAGTCATAAAGATGCTT
 GTGAAAGCTGGGGCTTCTTTGAAAGGTAGAAATCATGGGATATCTAAT**GAGCTC**ATGGACACAGTGGAGAGGCTAACAAAGGAGCATTAC
 AAGAAATGTATGGAAGTAAAGTCAAGCAAATGGTGGAGAGCAAGGAATTGGAAGCTGTTTCCAGCTGAGATCAATGATTTGGACTGGGA
 AAGTACCTTCTTCTTGGCCATCTTCTGTTTCCAACATCTCAGAAAGTCCCTGATCTTGTATGATGAATACAGAAAGGTTATGAAGGAAT
 TTGCGTTGCAACTTGAGAACTAGCAG**GAGCTC**CTGTTGGACTTGTATGCGGAAACCTTGGCCTAGAGAAAGGCTATCTGAAGAAAGCC
 TTCTATGGCACCAAAGGACCAACCTTTGGCACCAAAGTCAGCAATTACCCTCCATGCCCTCGTCCAGAACTGATCAAGGGCCTCCGGGC
 ACACACCGATGCCGGCGGCATCATCTGCTGTTCCAGGATGACAAGGTGACGGTCTCCAGCTCCTCAAGGATGGTGAATGGGTGGATG
 TTCCGCCTATGCGCCACTCCATTGTAATCAACATCGCGCACAACCTTGGAGTAATCACAATGGAAAATACAAGAGTGTGATGCACCGG
 GTGATAGCTCAACAGATGGGAACAGAATGCTACTAGCATCATTTCAATCCAGGAAGTGTGATGATGATCTATCCAGCACCGGCATT
 GGTTGAGAAAAGGAGGACAGGACAAGCAGATATATCCCAAGTTTGTGTTCCGAGGACTACATGAAGCTCTATGTGCGCCTAAGTTCCAAG
 CTAAGAGCCAGATTTGAAGCCATGAAGGCCGTGAAAGCACCGTAAACTTGGG**TCCATCGCACTGATAACA**

Figura 2 - Sequência completa do cDNA de ACC oxidase de *Coffea arabica*. Em negrito, nas extremidades da sequência, estão destacadas as sequências dos oligonucleotídeos utilizados no RT-PCR. Em negrito sublinhado estão indicados um sítio *Hind* III (AAGCTT) e dois sítios *Sac* I (GAGCTC).

```

Betula  --MATFPVIDMEKLNGEERGATMELIEDACENWGFELVNHGISHDLLDTVEKLNKEHYR
Carica  --MENFPVIDLSKLNGEERASTMELIHDACENWGFELVNHGISHDLLDTVERLTKEHYK
Prunus  --METFPVVDLSQITGEKREAAEMKMDACENWGFELVNHGISHELMDTVEKLTKEHYK
Actinidia  ---TFPVIDMEKLTGKERSPITMEKINDACENWGFELVNHGISHELMDTVERLTKEHYK
Coffea  --MATFPVIDMEKLDGPRKXTMGVIKDACESWGFVEVN-HGISNELMDTVERLTKEHYK
      .**.:*.:.:.: * * : * :.****.*****: *****:*****:*.****:

Betula  KCMEERFKDMVASKGLEAAQSEVRDMDWESTFFLRHLPASNMSEIPDLDEDIRKAMKEFA
Carica  KCMEQRFKEMVESNGLEAVQSEINDMDWESTFFLRHLPASNMHEIPDLEDDYRKAMKEFA
Prunus  KCMEQRFKEMVASKGLEAVQSEIHDLDWESTFFLRHLPVSNISQIPDLDEDIRKVMKEFA
Actinidia  KCMEQRFKEMVATKGLEAVQSEIDDLWESTFFLRHLVPSNISEIPDLEQDHRKAMKEFA
Coffea  KCMELKFKQMVESKELEAVQTEINDLDWESTFFLRHLVPSNISEVPLDDEYRKVMKEFA
      **** :**:* * : : **.*:*: * :*****. ** : :****: :**.* ****

Betula  GNLEKLAEQLLDLLCENLGLKGYLKKSFYGSKGNFNGTKVSNYPPCPKPELIQGLRAHT
Carica  VGLQKLAEQMLDLLCENLGLKGYLKKVFYGSKGNFNGTKVSNYPPCPKPDLIKGLRAHT
Prunus  VELEKLAEQLLDLLCENLGLKGYLKKAFYGSKGNFNGTKVSNYPPCPKPDLIKGLRAHT
Actinidia  EKLEKLAEQLLDLLCENLGLKGYLKKAFYGSKGNFNGTKVSNYPPCPPELIKGLRAHT
Coffea  LQLEKLAELLLDLLCENLGLKGYLKKAFYGTGKPTFGTKVSNYPPCPPELIKGLRAHT
      * :**** :*****.***** * * :***. ***** * :**:* ****

Betula  DAGGLILLFQDDKVSGLQLLKDQKWDVPPMRHSIVINLGDQLEVITNGKYKSVLHRVLA
Carica  DAGGIILLFQDDKVSGLQLLKDQKWDVPPMKHSIVINLGDQLEVITNGKYKSVMHRVIA
Prunus  DAGGIILLFQDDKVSGLQLLKDQKWDVPPMHHSIVINLGDQLEVITNGKYKSVMHRVIA
Actinidia  DAGGIILLFQDNKVSGLQLLKEGEWIDVPPMKHSIVINIGDQLEVITNGKYKSVMHRVIA
Coffea  DAGGIILLFQDDKVSGLQLLKDGEWVDVPPMRHSIVINIGDQLEVITNGKYKSVMHRVIA
      ****:*****:*****. :*:*****:*****:*****:*****:****:*

Betula  QPDGNRMSLASFYNPGSDALIYPAPVLEKEAEK-GQVYPKFVFEDYMKLYAGLKFQAKE
Carica  QTDGNRMSLASFYNPGDDAIIYPAPSLVEKEAEK-NQIYPKFVFDDYMKLYVGLKFQAKE
Prunus  QPDGTRMSIASFYNPGDDAFICPAPALLEKETEN-ISAYPKFVFDDYMKLYSGLKFHAKE
Actinidia  QTDGNRMSIASFYNPGSDAVIYPAPALVDEEEDQQQVYPKFVFEDYMKLYAGLKFQAKE
Coffea  QPDGNRMSLASFYNPGSDAVIYPAPALVEKEAED-KQIYPKFVFEDYMKLYAGLKFQAKE
      *.**.*:*****.*.* ** ** :**.* :. . *****:***** *****:***

Betula  PRFEAMKAMESTVKLGPIATA
Carica  PRFEAMKAMESTVTPGAIATV
Prunus  PRFEAMKAMESTVNLDPVATV
Actinidia  PRFEAMKAMESAVKLGPISTI
Coffea  PRFEAMKAVESTVNLGSPH--
      *****:***. . .
    
```

Figura 3 - Alinhamento da sequência da proteína ACC oxidase de *Coffea arabica*. A sequência deduzida de aminoácidos da proteína ACC oxidase de *Coffea arabica* foi alinhada a sequências homólogas derivadas de outras espécies de plantas (dos gêneros *Betula* [acesso Y10749], *Carica* [acesso U68215], *Prunus* [acesso AF129074] e *Actinidia* [acesso AB003514]) disponíveis no “Gene Bank”.

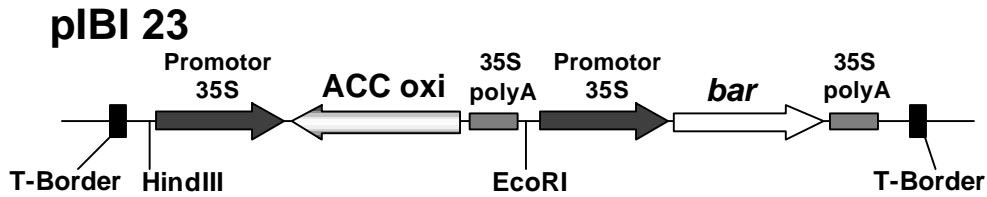


Figura 4 - Mapa da região de transferência do vetor binário de transformação contendo o cDNA anti-senso de ACC oxidase de *Coffea arabica*. O plasmídeo pIBI 23 é derivado do vetor binário pCAMBIA 3300, que contém o gene *bar* (Fosfinotricina) como gene de seleção para transformação genética de plantas. A direção da seta representa a orientação dos genes.

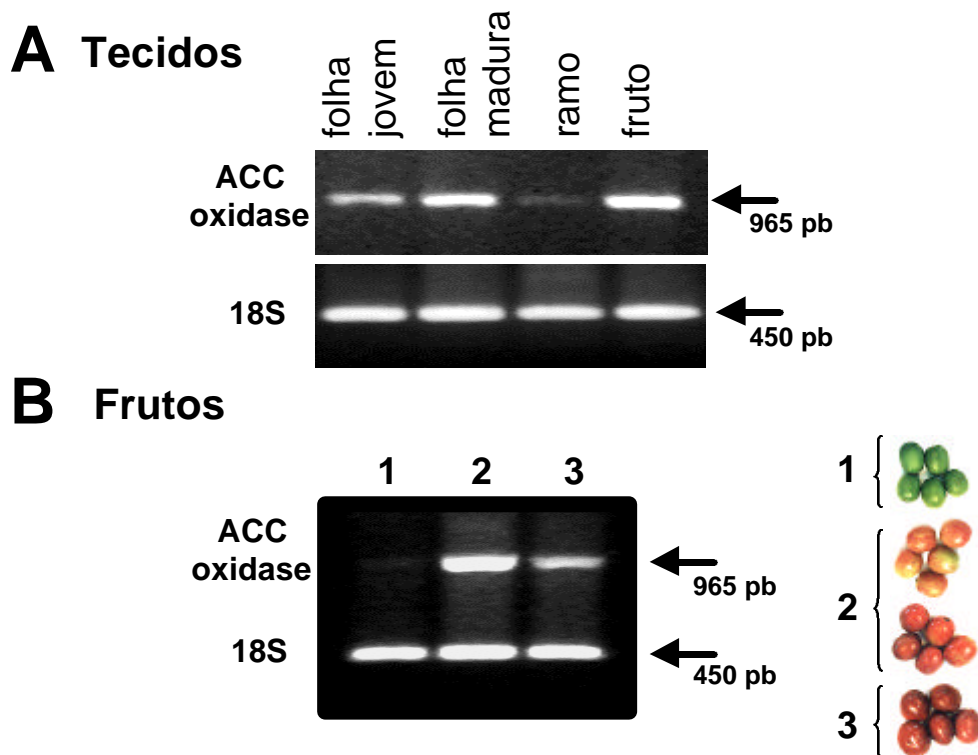


Figura 5 - Análise da expressão gênica de ACC oxidase em *Coffea arabica*. Quantidades equivalentes de cDNA de diferentes tecidos (A) e de frutos em diferentes estágios de maturação (B) foram utilizadas em ensaio de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para amplificar um fragmento de 965 pb correspondente a ACC oxidase. Para comprovar que as quantidades de cDNA empregadas foram normalizadas, oligonucleotídeos baseados na sequência do RNA 18S foram utilizados para amplificar um fragmento de 450 pb.