

Prospecção *In Silico* de ESTs Potencialmente Associadas à Tolerância do Algodoeiro ao Déficit Hídrico e Análise da Família de Genes DREB

Giovani Greigh de Brito¹
Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima²
George Elton Lucena Silva³
Mariana Franco Fragoso³
Wagner Alexandre Lucena⁴
Liziane Maria de Lima⁵
Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão¹
Marleide Magalhães de Andrade Lima⁶

Estresses abióticos, especialmente a seca, afetam a produtividade e a qualidade da fibra de algodão (ARAÚJO et al., 2003), por meio de uma série de alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares na planta (LUBBERS et al., 2007). Embora o algodoeiro do tipo herbáceo seja cultivado em diversas regiões sob condições de sequeiro, inclusive nas regiões produtoras do Semi-Árido nordestino, a quantidade e a qualidade da fibra produzida relacionam-se diretamente ao volume de água absorvido pela planta, durante as suas diferentes fases de desenvolvimento. Em vista disso, a tolerância de genótipos de algodoeiro ao déficit hídrico tem sido alvo de vários estudos em nível molecular (HUANG; LIU, 2008; LUBBERS et al., 2007; QIAO et al., 2008).

Embora os estudos visando à obtenção de genótipos que apresentem alto rendimento sob condições limitantes de água tenham se intensificado, os avanços nesta área têm sido dificultados devido ao

grau de compreensão sobre as bases fisiológicas e moleculares que determinam estas respostas. Em contrapartida, a quantidade de informações geradas acerca da tolerância ao déficit hídrico em plantas tem aumentado recentemente, de forma que vários genes já foram isolados e caracterizados em diversas espécies economicamente importantes (LUBBERS et al., 2007).

A família DREB (*Dehydration-Responsive Element Binding gene*), constituída por vários genes, um dos fatores de transcrição envolvidos na resposta ao estresse hídrico, apresenta-se como tendo grande potencial para, através da seleção direcionada de genótipos, ou ainda do controle de sua expressão, aumentar a tolerância de culturas agrícolas a estresses abióticos (HUANG et al., 2007, 2008; HUANG; LIU, 2006a, 2006b; SHAN et al, 2007).

As análises efetuadas em outras espécies com vista à compreensão dos mecanismos envolvidos na

¹Eng. agrôn., D.Sc., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP: 58.428-095, Campina Grande, PB. E-mail: giovani@cnpa.embrapa.br

²Biólogo, M.Sc., Bolsista do CNPq/ Embrapa Algodão

³Graduando em Ciências Biológicas - UEPB/ Estagiário da Embrapa Algodão

⁴Biólogo, M.Sc., da Embrapa Algodão

⁵Bióloga, D.Sc., da Embrapa Algodão

⁶Eng. Flor., D.Sc., da Embrapa Algodão

resposta da planta ao estresse têm revelado a existência de uma rede complexa, constituindo a comunicação celular durante as respostas a esta condição de estresse. Assim, o emprego das ferramentas disponíveis na prospecção de novos genes e de seus produtos contribuirá para aumentar a compreensão dos mecanismos que regem a tolerância do algodoeiro ao déficit hídrico, auxiliando no melhoramento para a obtenção de cultivares mais tolerantes.

Efetou-se uma pesquisa *in silico*, visando à identificação de seqüências ESTs (*Expressed Sequence Tags*) do algodoeiro, presentes no banco de dados público CottonDB.org "Cotton Genome Database" potencialmente relacionadas à tolerância ao déficit hídrico.

Inicialmente, construiu-se uma coleção de genes envolvidos nas respostas aos estresses abióticos, já caracterizados em outras espécies vegetais, a partir da literatura. Os genes foram estratificados em três grandes grupos, de acordo com a função desempenhada na resposta aos estresses abióticos, e empregados como "iscas", na busca de seqüências presentes no banco de dados público:

1. **Sensores de sinal** - Sensores osmóticos (Fosfolipases PLD, mensageiros secundários - Ca^{+2} e ROS; Kinases dependentes de Ca^{+2} - CDPKs; sensores de Ca^{+} - SOS3).
2. **Controle transcricional** - Fatores de transcrição (DREB/CBF, ABF, HSF, bZIP, MYC/MYB).
3. **Mecanismos de resposta ao sinal** - Proteção osmótica (Prolina, Glicina betaína e açúcares), Chaperonas moleculares (Hsp, SP1, LEA, COR) e relacionados ao transporte iônico e de água (aquaporinas e transportadores iônicos).

Adicionalmente, gerou-se um conjunto de genes da família DREB agrupados nas subfamílias : DREB1/ CBF3, DREB1A, DREB2, DREB3A, DREB2A, DREB2B e DREB3 .

Para a mineração das seqüências potencialmente envolvidas com a tolerância do algodoeiro ao déficit hídrico, analisaram-se as ESTs do banco público de dados (cottonDB.org) por meio da plataforma de Bioinformática (COTTON GENOME DATABASE,

2007), utilizando a ferramenta tBlastn com *e-value* 10^{-20} , visando identificar ESTs relacionadas aos conjuntos de genes utilizados como "iscas".

Com o auxílio do tBlastn e pelo emprego de 146 seqüências protéicas, utilizadas como "iscas", evidenciou-se que 140 destas apresentaram valores de similaridade significativos (*e-value* $< 10^{-20}$). Utilizando esta estratégia foram identificadas 19.474 ESTs potencialmente associadas à tolerância do algodoeiro ao déficit hídrico. Do total, 5.830 seqüências podem estar relacionadas a sensores de sinal do estresse, 9.562 ao controle transcricional e 4.082 a mecanismos de resposta ao sinal (Figura 1A). O número elevado de seqüências identificadas pode estar relacionado à existência de seqüências primárias altamente conservadas, considerando os parálogos de proteínas pesquisadas. Outra possibilidade fundamenta-se na ocorrência de vários alelos ao longo do genoma do algodoeiro. As figuras 1B, 1C e 1D apresentam, a partir da utilização das seqüências "isca" e por meio do aplicativo tBlastn, as famílias de ESTs resultantes dentro de cada estratificação.

Pelo emprego das "iscas" DREBs, foram identificadas 161 ESTs potencialmente envolvidas na resposta do algodoeiro ao déficit hídrico. Destas, 36 seqüências estão potencialmente relacionadas a DREB1A, 78 a DREB2, 44 a DREB3 e 03 a DREB3A, todas responsivas à desidratação (Figura 2). A não obtenção de ESTs com *e-value* significativo, a partir das seqüências de DREB1/CBF3, DREB2A e DREB2B utilizados como "iscas" para a pesquisa no banco de dados, deve estar relacionada ao fato destes originarem-se de genes envolvidos também na tolerância ao frio e à alta salinidade e devido à inexistência de bibliotecas construídas sob tais estresses no banco de dados utilizado para a pesquisa. Por meio da análise das seqüências análogas obtidas, verificou-se a existência de várias ESTs potencialmente envolvidas na tolerância ao estresse (Tabela 1).

Conclui-se que a utilização da base de dados do Cottondb.org, constitui uma ferramenta adequada na busca rápida e na seleção de genes potenciais de importância agrônômica para o algodoeiro. Estas informações poderão servir como ponto de partida para estudos da caracterização funcional das

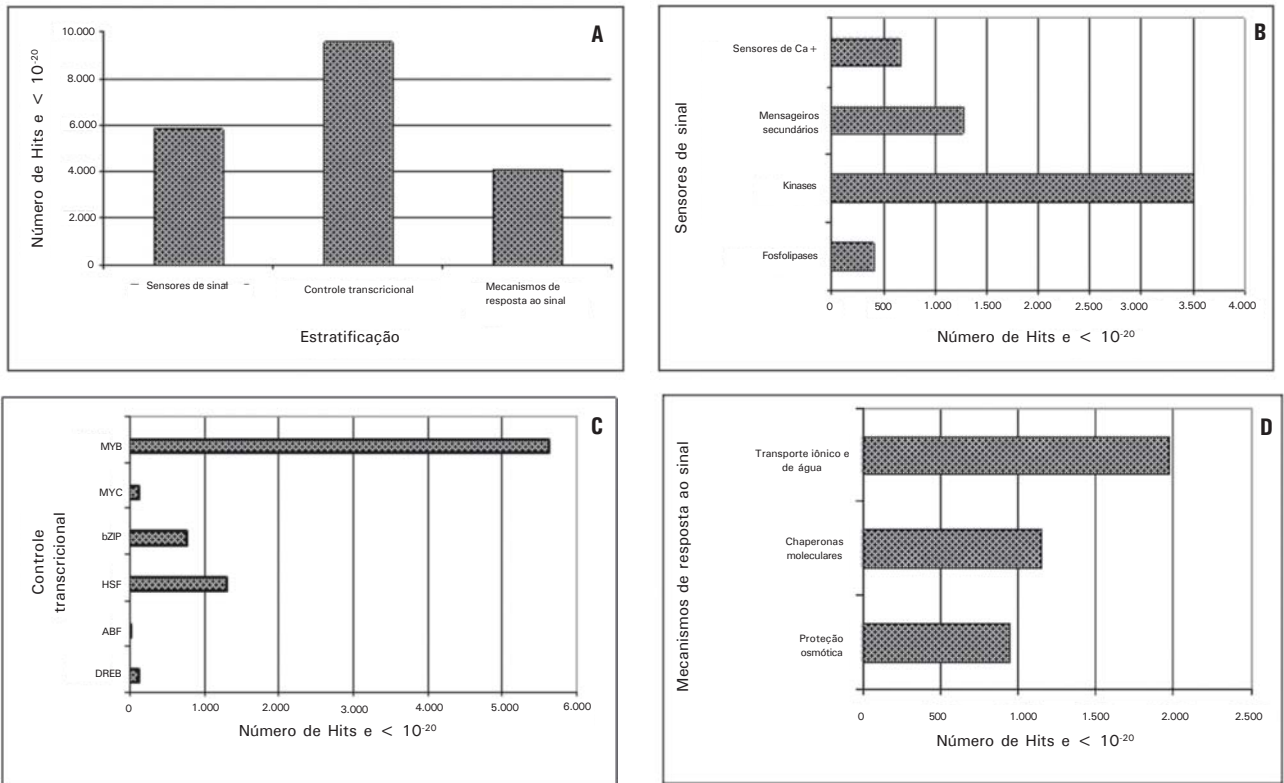


Fig. 1. Sequências ESTs potencialmente envolvidas na tolerância ao déficit hídrico identificadas no cottontdb.org

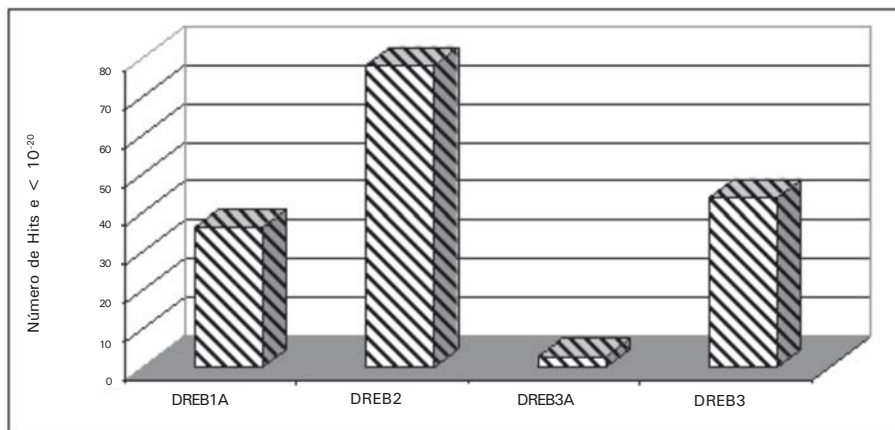


Fig. 2. Resultado total das ESTs-DREB relacionadas identificadas (*e-value* 10^{-20}), agrupadas por subfamílias protéicas potencialmente envolvidas na tolerância ao déficit hídrico.

Tabela 1. ESTs que codificam possíveis fatores transcricionais envolvidos na resposta do algodoeiro ao déficit hídrico

Proteína codificada	Organismo homólogo	Número de acesso	e-value
<i>Dehydration responsive element binding protein</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AY321150	2.10 ⁻⁴³
<i>Dehydration responsive element binding protein</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AY422828	1.10 ⁻⁴²
<i>DREB1-like transcription factor</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DQ409060	3.10 ⁻⁴²
<i>DREB-like protein.</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	GA_Ea0004G15f	2.10 ⁻²²
<i>DREB-like protein</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PUT-157a- <i>Gossypium_</i> <i>arboreum-</i> 19037	2.10 ⁻²²
<i>DREB-like protein</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PUT-157a- <i>Gossypium_</i> <i>arboreum-</i> 15410	2.10 ⁻²²
<i>DREB-like protein - Putative AP2/EREBP transcription factor</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PUT-157a- <i>Gossypium_</i> <i>arboreum-</i> 5123	2.10 ⁻²²
<i>Transcription factor DRE-binding factor 2 (DBP2)</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	AY619718	1.10 ⁻⁴³
<i>Dehydration responsive element-binding protein 2 (DBP2)</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	DQ093964	1.10 ⁻⁴³
<i>Dehydration responsive element-binding protein 2).</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	PUT-157a- <i>Gossypium_</i> <i>arboreum-</i> 20028	1.10 ⁻⁴³
<i>Dehydration responsive element-binding protein 2</i>	<i>Gossypium hirsutum</i> e <i>Glycine max</i>	PUT-157a- <i>Gossypium_</i> <i>arboreum-</i> 6375	9.10 ⁻²²

seqüências selecionadas em trabalhos futuros. Seis seqüências utilizadas como "iscas" (chaperonas moleculares) não resultaram em ESTs análogos no banco de dados pesquisado, o que pode estar relacionado ao fato de parte destas originarem-se de genes relacionados à tolerância ao frio e devido à inexistência de bibliotecas construídas sob estresse térmico.

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, A. E.; SILVA, C. A. D.; AZEVEDO, D. M. P. de; FREIRE, E. C.; RAMALHO, F. S.; ANDRADE, F. P.; FERREIRA, G. B., SANTANA, J. C. F.; AMARAL, J. A. B./ MEDEIROS, J. C.; BEZERRA, J.

R. C.; PEREIRA, J. R.; SILVA, K. L.; SILVA, L. C.; BARROS, M. A. L.; CARVALHO, M. C. S.; LUZ, M. J. S; BELTRÃO, N. E. de M.; SUASSUNA, N. D.; FERREIRA, P. F; SANTOS, R. F, FONSÊCA, R. G. **Cultivo do algodão irrigado.** Sistemas de Produção, 3 jan. 2003.

COTTON GENOME DATABASE. Disponível em: <<http://cotondb.org/cdbpages/webblast.html>>. Acesso em: 04 dez. 2007.

HUANG, B.; LIU, J.Y. A cotton dehydration responsive element binding protein functions as a transcriptional repressor of DRE-mediated gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 343, p. 1023-1031, 2006a.

HUANG, B.; LIU, J. Cloning and functional analysis of the novel gene GhDBP3 encoding a DRE-binding transcription factor from *Gossypium hirsutum*.

Biochimica et Biophysica Acta. v. 1759, p. 263-269, 2006b.

HUANG, B.; JIN, L.; LIU, J. Molecular cloning and functional characterization of a DREB1/CBF-like gene (GhDREB1L) from cotton. **Science in China Series C: Life Sciences.** v. 50, p. 7-14, 2007.

HUANG, B.; JIN, L.; LIU, J. Identification and characterization of the novel gene GhDBP2 encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*). **Journal of Plant Physiology.** v. 165, p. 214-223, 2008.

LUBBERS, E. L.; CHEE, P. W.; SARANGA, Y.; PATERSON, A. H. Recent advances and future

prospective in molecular breeding of cotton for drought and salinity stress tolerance. In: JENKS, M. A, HASEGAWA, P. M.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops.** Holanda: Springer Netherlands, 2007. p. 775-796.

QIAO, Z.; HUANG, B. LIU, J. Molecular cloning and functional analysis of an ERF gene from cotton (*Gossypium hirsutum*). **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1779, p. 122-127, 2008.

SHAN, D. P.; HUANG, G. G.; YANG, Y. T.; GUO, Y. H.; WU, C. A.; YAMG, G. D.; GAO, Z.; ZHENG, C. C. Cotton GhDREB1 increases plant tolerance to low temperature and is negatively regulated by gibberellic acid. **New Phytologist.** v. 176, p. 70-81, 2007.

Comunicado Técnico, 353

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58428-095 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Carlos Alberto Domingues da Silva
Secretário Executivo: Valter Freire de Castro
Membros: Fábio Aquino de Albuquerque
Giovani Greigh de Brito
João Luiz da Silva Filho
Maira Milani
João Luiz da Silva Filho
Maria da Conceição Santana Carvalho
Nair Helena Castro Arriel
Valdinei Sofiatti
Wirton Macedo Coutinho

Expedientes: Supervisor Editorial: Valter Freire de Castro
Revisão de Texto: Maria José Silva e Luz
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho