

Análise Filogenética da Família de Genes Terpeno Sintase (TPS) em *Coffea canephora*.

Vinicius Sartori Fioresi, Drielli Canal, Adésio Ferreira, Marcia Flores da Silva Ferreira

Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Agronomia, Centro de Ciências e Engenharia Agrícolas, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.
vinicius_fioresi@hotmail.com, drielliufes@gmail.com, adesioferreira@gmail.com, mflorssf@gmail.com

Resumo

Os diterpenos, como o cafestol e o kahweol, são compostos relevantes na qualidade do café, mas seus genes biossintéticos são pouco explorados. Este trabalho realizou a anotação genômica e a análise da família de genes Terpeno Sintase (TPS) no genoma de *Coffea canephora*. Foram identificados 45 genes TPS, classificados em seis subfamílias (TPSa, TPSb, TPSc, TPSd, TPSe e TPSf) por meio de análise filogenética. O grupo TPSb foi o mais representativo, com 24 genes (53,33%). A análise de localização subcelular indicou que 88,89% das proteínas atuam no citoplasma e cloroplastos. A partir da filogenia, foram identificados os genes CDP03636.1, CDP07883.1 e CDP07895.1 como fortes candidatos na via de biossíntese de diterpenos, por sua proximidade com genes já caracterizados em *C. arabica*. O estudo fornece base para futuros programas de melhoramento genético do cafeeiro

Palavras-chave: Terpeno Sintase; Anotação Genômica; Diterpenos.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Biologia Molecular

Introdução

Os genes da família de Terpenos Sintase (TPS) são divididos em sete subfamílias. As subfamílias relacionadas ao metabolismo secundário, TPS-a (sesquiterpeno), TPS-b (monoterpeno) e TPS-g (mono, sesqui e diterpenos acíclicos), que são três subfamílias específicas presentes em angiosperma. A subfamília TPS-d (mono-, sesqui-, diterpenos) que é específica para gimnospermas, e a subfamília TPS-h específica para o musgo-espinho *Selaginella moellendorffii* (diterpenos bifuncionais putativos). Além disso também podemos observar os membros associados ao metabolismo primário, as subfamílias TPS-e e TPS-f que normalmente são encontrados de forma combinados no grupo de TPS-e/f (kaurene, mono-, sesqui- e diterpenos), conservados entre plantas vasculares, e a subfamília TPS-c (diterpenos) de difosfato copal synthases das angiospermas (Chen et al., 2011).

No metabolismo geral, as diterpeno sintases (diTPS) estão envolvidas na biossíntese do fitohormônio da giberelina. Os diTPS também estão envolvidos na biossíntese de uma ampla gama de terpenos especializados com papéis na defesa das plantas (Mafu et al., 2018; Zerbe; Bohlmann, 2015) e outras interações ecológicas (Wang et al., 2016). A enzima *ent-copalyl* difosfato sintase (CPS) por exemplo, é responsável pela ciclização do geranylgeranyl difosfato (GGPP) em difosfato de *ent-copalyl* (*ent-CPP*), e o *ent-CPP* é ainda ciclizado por uma kaurene sintase (KS) para *ent-kaurene* (Keeling et al., 2010; Zerbe et al., 2013). *ent-Kaurene* é um precursor comum de vários diterpenos produzidos nos plástidos por reações de ciclização consecutivas de GGPP (Keeling et al., 2010; Mafu et al., 2016). As diTPS, pertencentes principalmente aos grupos TPSc, e TPS-e/f, são responsáveis pela produção de compostos como as giberelinas (hormônios vegetais) e metabólitos de defesa especializados (Chen et al., 2011). No cafeeiro (*Coffea arabica*), uma das culturas de maior importância econômica global, os diterpenos cafestol e kahweol são particularmente relevantes. Eles são encontrados nos óleos do grão de café e contribuem principalmente para o corpo e aroma da bebida (Ivamoto-Suzuki et al., 2023).

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

A caracterização de genes de relevância agrônômica em café é fundamental para o desenvolvimento de variedades com características desejáveis. No entanto, os genes TPS responsáveis pela biossíntese de diterpenos específicos do café ainda são pouco explorados. Neste trabalho, objetivou-se realizar a anotação estrutural e filogenia dos genes TPS em *coffea canephora*, com foco em identificar os candidatos envolvidos na via dos diterpenos, visando gerar conhecimento para futuros programas de melhoramento genético.

Metodologia

A anotação dos genes TPS foi realizada utilizando o genoma de *Coffea canephora* (Accession PRJEB4211). Para a anotação, sequências das proteínas pertencentes as famílias TPS de *Arabidopsis thaliana*, e *Vitis vinifera* foram usadas para realizar busca local usando BLAST ($e\text{-value } 10^{-25}$) no genoma de *Coffea canephora*. A presença dos domínios alvo característicos, nas sequências identificadas foi verificada utilizando o banco de dados InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

As sequências de proteínas anotadas foram alinhadas no programa MAFFT v. 7.4 (Katoh et al., 2002), juntamente com sequências de *A. thaliana*, *Eucalyptus grandis* e *Vitis vinifera*, com os parâmetros blossom 62 e thread 20. O alinhamento de sequências, foi utilizado para construir uma árvore filogenética com o método de máxima verossimilhança (ML) no programa IQ-TREE com 1000 bootstrap (Nguyen et al., 2015) posteriormente foram editadas usando o programa iTol (Letunic; Bork, 2021). O tamanho da sequência de aminoácidos (a.a.), o ponto isoelétrico teórico (pI) e o peso molecular (kDa) das sequências foram estimados pela ferramenta compute pI/Mw no ExPASy (Artimo et al., 2012). A predição de localização subcelular obtida no banco de dados WoLF PSORT (<http://wolfpsort.hgc.jp/>) (Horton et al., 2007).

Resultados

Foram anotados 45 genes da família de TPS. Na árvore filogenética construída dos genes TPS de *Coffea canephora*, os ortólogos de *A. thaliana*, *E. grandis* e *V. vinifera* (Figura 1), auxiliou na classificação dos grupos de genes da família. As 45 proteínas TPS de *C. canephora* foram categorizadas em seis grupos (grupos TPSg, TPSf, TPSe, TPSc, TPSb e TPSa), (Figura 1). O grupo que apresentou maior quantidade de representantes foi TPSb com 53,33% (24 genes) e o com menor foi os grupos TPSf e TPSe com 4,44% (2 genes).

Os menores números de aminoácidos preditos nas proteínas foram de 119 (CDP11852.1, grupo TPSg); 160 (CDP21731.1, grupo TPSa) e 191 (CDP16458.1, grupo TPSg). O maior número de aminoácidos (843) foi detectado no gene (CDO99598.1, grupo TPSf). O gene com o menor número de exon foi CDP11852.1 (TPSg) com 2 exons e o maior com 15 exons foi o gene CDP03636.1 (TPSc). Pela predição da localização subcelular, 17 genes da família de TPS de *C. canephora* apresentam localização cloroplastidial, dois genes nucleares, um gene com expressão no retículo endoplasmático, dois extracelulares e os demais (23) com localização citoplasmática indicando que a família desempenha um papel importante no controle do crescimento e desenvolvimento das plantas, principalmente no citoplasma e no cloroplasto com aproximadamente 88,89% dos genes. Os pesos moleculares estimados variaram entre 96,444 (CDO99598.1) e 27,711 (CDP11841.1) kDa. Os pontos isoelétricos variaram de 4,87 (CDP11852.1) no grupo TPSg a 6,51 (CDP11851.1) no grupo TPSb.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

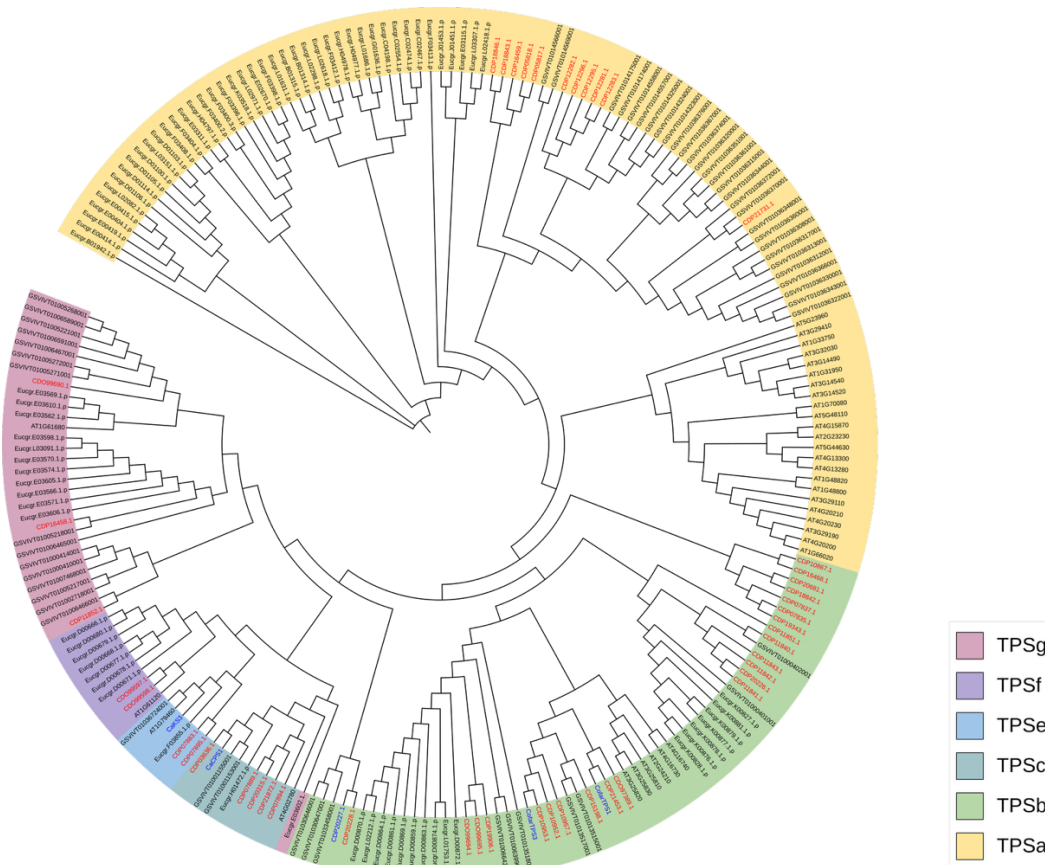


Figura 1. Filogenia dos genes de TPS de *Coffea canephora*. Árvore filogenética reconstruída pelo método de máxima verossimilhança (ML). Genes TPS (marcados em vermelho), *Arabidopsis thaliana*, *Eucalyptus grandis* e *Vitis vinifera*. Todos o TPS foram agrupados em 6 clados, marcados com cores diferentes.

Discussão

O café é uma bebida popular que tem sido cultivada em todo o mundo e fabricada desde os tempos antigos devido aos seus múltiplos efeitos estimulantes e bioativos (Esquivel; Jiménez, 2012). A composição bioquímica dos grãos de café determina a qualidade da xícara de café (4) Pesquisas determinar a cafeína, (Jeszka-Skowron et al., 2016; Scholz et al., 2016) ácido clorogênico (Jeszka-Skowron et al., 2016; Scholz et al., 2016), Oligossacarídeo (Iwamoto et al., 2017b; Joët et al., 2014), e lipídio (Iwamoto et al., 2017a; Sant'Ana et al., 2018) conteúdo em grãos de café já foram realizadas. Os diterpenos são encontrados em muitas famílias de plantas, e seus precursores são geralmente biossintetizados pela via do fosfato de metileritritol plastidial (MEP) (Gutensohn; Dudareva, 2016). Cafestol (CAF) e kahweol (KAH) são diterpenos encontrados exclusivamente em plantas de café. CAF e KAH exibem anticancerígeno, antiangiogênico, antioxidante e anti-inflamatório (Iwamoto et al., 2019; Moeenfarid et al., 2016).

Os genes CDP07883.1 e CDP07895.1 são filogeneticamente próximos do gene CaKS3, assim como o gene CDP03636.1 e próximo de CaCPS1, em *Coffea arabica* os perfis de expressão de transcrição de CaCPS1 e CaKS3 combinavam melhor com os perfis de metabólitos CAF e KAH em diferentes tecidos. As proteínas CaCPS1 e CaKS3 também foram expressas heterologicamente e funcionalmente caracterizadas. O CaCPS1 catalisa a ciclização do difosfato de geranilgeranil (GGPP) para difosfato de *ent*-copalyl (*ent*-CPP), que é convertido em *ent*-caureno por CaKS3. (Iwamoto-Suzuki et al., 2023)

Conclusão

A análise genômica permitiu a identificação e anotação de 45 genes da família Terpeno Sintase (TPS) em *Coffea canephora*, que foram categorizados em seis subfamílias distintas. A análise filogenética foi crucial para identificar os genes CDP03636.1, CDP07883.1 e CDP07895.1 como potenciais responsáveis pela síntese de precursores dos diterpenos cafestol e kahweol, dada sua homologia com as sequências CaCPS1 e CaKS3 de *Coffea arabica*. Esses achados representam um avanço significativo no entendimento da base genética da produção de importantes metabólitos secundários no café, oferecendo alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de variedades com perfis químicos desejáveis por meio de programas de melhoramento genético.

Referências

- ARTIMO, P. *et al.* ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W597–W603, 1 jul. 2012.
- CHEN, Feng *et al.* The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 212–229, 28 abr. 2011.
- ESQUIVEL, Patricia; JIMÉNEZ, Víctor M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, maio 2012.
- GUTENSOHN, M.; DUDAREVA, N. Tomato Fruits—A Platform for Metabolic Engineering of Terpenes. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 333–359.
- HORTON, P. *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W585–W587, 8 maio 2007.
- IVAMOTO, Suzana T. *et al.* Diterpenes biochemical profile and transcriptional analysis of cytochrome P450s genes in leaves, roots, flowers, and during *Coffea arabica* L. fruit development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 111, p. 340–347, fev. 2017a.
- IVAMOTO, Suzana Tiemi *et al.* Transcriptome Analysis of Leaves, Flowers and Fruits Perisperm of *Coffea arabica* L. Reveals the Differential Expression of Genes Involved in Raffinose Biosynthesis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169595, 9 jan. 2017b.
- IVAMOTO-SUZUKI, Suzana Tiemi *et al.* Functional Characterization of *ent*-Copalyl Diphosphate Synthase and Kaurene Synthase Genes from *Coffea arabica* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 42, p. 15863–15873, 25 out. 2023.
- IVAMOTO, Hiroaki *et al.* Coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol synergistically inhibit the proliferation and migration of prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 79, n. 5, p. 468–479, 19 abr. 2019.
- JESZKA-SKOWRON, Magdalena *et al.* Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 8, p. 1403–1409, 9 ago. 2016.
- JOËT, Thierry *et al.* Regulation of galactomannan biosynthesis in coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 1, p. 323–337, jan. 2014.
- KATOH, Kazutaka *et al.* MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *[S.l.: S.n.]*.
- KEELING, Christopher I. *et al.* Identification and Functional Characterization of Monofunctional *ent*-Copalyl Diphosphate and *ent*-Kaurene Synthases in White Spruce Reveal Different Patterns for

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Diterpene Synthase Evolution for Primary and Secondary Metabolism in Gymnosperms. **Plant Physiology**, v. 152, n. 3, p. 1197–1208, 3 mar. 2010.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W293–W296, 2 jul. 2021.

MAFU, Sibongile *et al.* Probing the promiscuity of *ent*-kaurene oxidases via combinatorial biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 9, p. 2526–2531, 16 mar. 2016.

MAFU, Sibongile *et al.* Discovery, Biosynthesis and Stress-Related Accumulation of Dolabradiene-Derived Defenses in Maize. **Plant Physiology**, v. 176, n. 4, p. 2677–2690, abr. 2018.

MOEENFARD, Marzieh *et al.* Anti-Angiogenic Properties of Cafestol and Kahweol Palmitate Diterpene Esters. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 12, p. 2748–2756, 8 dez. 2016.

NGUYEN, Lam Tung *et al.* IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, 1 jan. 2015.

SANT'ANA, Gustavo C. *et al.* Genome-wide association study reveals candidate genes influencing lipids and diterpenes contents in *Coffea arabica* L. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 465, 11 jan. 2018.

SCHOLZ, Maria Brígida dos Santos *et al.* Chemical composition in wild ethiopian Arabica coffee accessions. **Euphytica**, v. 209, n. 2, p. 429–438, 8 maio 2016.

WANG, Qiang *et al.* Identification of a Dolabellane Type Diterpene Synthase and other Root-Expressed Diterpene Synthases in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 25 nov. 2016.

ZERBE, Philipp *et al.* Gene Discovery of Modular Diterpene Metabolism in Nonmodel Systems. **Plant Physiology**, v. 162, n. 2, p. 1073–1091, 31 maio 2013.

ZERBE, Philipp; BOHLMANN, Jörg. Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 419–428, jul. 2015.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brasil), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) — Código de Financiamento 001, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, Vitória—ES, Brasil) pelo apoio financeiro concedido a este estudo.