

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS
CALMODULINA-LIKE DE *Cajanus cajan***

Lucas Oliveira Lara

Unai
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS
CALMODULINA-LIKE DE *Cajanus cajan***

Lucas Oliveira Lara

Orientador: **Prof. Dr. Wellington Ferreira Campos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Agrárias, como parte dos requisitos
exigidos para a conclusão do curso.

Unai
2018

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS
CALMODULINA-LIKE DE *Cajanus cajan***

Lucas Oliveira Lara

Orientador: **Prof. Dr. Wellington Ferreira Campos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Agrárias, como parte dos requisitos
exigidos para a conclusão do curso.

APROVADO em ... / ... / ...

Prof.^a Dr^a Tânia Pires da Silva - UFVJM

Prof. Dr. Gustavo Leão Rosado– FACISA

Prof. Dr. Wellington Ferreira Campos- UFVJM

RESUMO

O cálcio (Ca^{2+}) é um elemento fundamental como mensageiro secundário participando de vários processos biológicos e em resposta a estímulos bióticos e abióticos. A proteína calmodulina-like (CML) atua como um sensor de Ca^{2+} em plantas, participando da cascata de sinalização celular, pois contém domínios EF-hand que tem papel de ligação com o elemento Ca^{2+} . Apesar da sua importância as proteínas CML de *Cajanus cajan* ainda não foram identificadas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar a família de proteínas (CML) no genoma de *C. cajan*, que logo após foram feitas análises físico-químicas e de expressão proteínas calmodulina-like nos tecidos radicular e foliar em *Cajanus cajan*. No total foram identificadas 65 proteínas CML em *C. cajan*. Caracteristicamente, as CML de *C. cajan* são proteínas ácidas, tendo entre 80 a 365 aminoácidos e podem estar localizadas em diversos compartimentos intracelulares e no ambiente extracelular. Seus genes são expressos nos tecidos radicular e foliar em diferentes estágios do desenvolvimento em *Cajanus cajan*. Tais resultados lançam a base para o estudo dos papéis destas proteínas nos diferentes mecanismos biológicos de *C. cajan*.

Palavras-chave: cálcio; feijão-guandu; sinalização.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 6 |
| 2. OBJETIVOS | 7 |
| 2.1. Objetivo geral | 7 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 8 |
| 3.1. Identificação de genes CML no genoma de <i>Cajanus cajan</i> | 8 |
| 3.2. Caracterização bioquímica e localização subcelular das proteínas CcCML | 9 |
| 3.5. Análise de expressão <i>in silico</i> | 9 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 10 |
| 5. CONCLUSÃO | 16 |
| 6. REFERÊNCIA | 17 |

1. INTRODUÇÃO

O cálcio (Ca^{2+}) atua como um mensageiro secundário para mediar uma variedade de processos biológicos em resposta a vários estímulos bióticos e abióticos (Sanders et al., 1999; Batistič and Kudla, 2012). O Ca^{2+} está envolvido em várias funções celulares responsáveis pelas respostas biológicas (Perochon et al., 2011) e regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas (Boonburapong e Buaboocha, 2007; Reddy, 2001). Em plantas o sinal de Ca^{2+} é decodificado e transmitido por proteínas denominadas Calmodulina (CaM) e Calmodulina-Like (CML), dentre outras como a Calcineurina B (CBL) e Proteínas Quinases Dependentes de Ca^{2+} (CDPK) (Munir et al., 2016). Estas proteínas contêm o domínio EF-hand que atua ligando-se ao Ca^{2+} e desencadeando uma resposta sinalizatória (Sanders et al., 1999; Batistič and Kudla, 2012). E uma proteína CML contêm, pelo menos, dois domínios identificáveis de EF-hand (McCormack e Braam, 2003).

Diversos membros de proteínas CaM e CML em diferentes espécies estão envolvidas com respostas aos estresses abióticos, por exemplo, a super expressão do gene CaM4 de *Glycyne max* aumentou a tolerância de plantas de soja ao estresse salino (Rao et al., 2014), e a participação ativa dos SICMLs no desenvolvimento de plantas de tomateiro e respostas ao estresse abiótico (Munir et al., 2016). Assim, a elucidação dos mecanismos que envolvem as proteínas CML nas respostas aos distintos tipos de estresse tem gerado grande interesse. Entretanto, as proteínas CML são desconhecidas em *Cajanus cajan*.

C. cajan, popularmente conhecida como feijão-guandu, é uma espécie tolerante ao calor, à seca e baixa fertilidade do solo, tornando-a uma opção para os sistemas agrícolas onde há pouco capital ou adoção de tecnologias. Além disso, apresenta alto teor de proteínas e carboidratos, possui um sistema radicular cuja raiz principal pode alcançar 3 metros de profundidade, apresentando grande potencial para resistir ao estresse hídrico tem certa rusticidade e multifuncionalidade (Odeny, 2007; Khoury et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi identificar e analisar a expressão da família de proteínas Calmodulina-Like (CML) de *Cajanus cajan*.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar as proteínas CML de *C. cajan* (CcCML);
- Caracterizar bioquimicamente as proteínas CcCML;
- Predizer a localização subcelular das proteínas CcCML;
- Caracterizar a expressão dos genes *CcCML* nos tecidos radicular e foliar em diferentes estágios de desenvolvimento de plantas de *C. cajan*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação de proteínas CML em *Cajanus cajan*

As sequências de aminoácidos das proteínas CaM de *Arabidopsis thaliana* (AtCaM) e *Glycine max* (GmCaM) foram coletadas nos respectivos bancos de dados: “The Arabidopsis Information Resource” (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>) (Lamesch et al., 2012), Phytozome V12 (<http://www.phytozome.net>) (Goodstein et al., 2012). Em seguida, as sequências foram usadas como *queries* no BLASTp (Altschul et al., 1997) para procurar as sequências de proteínas CML de *Cajanus cajan* (CcCML) no banco de dados “Legume Information System” (LIS, <http://legumeinfo.org>) (Dash et al., 2016). Os parâmetros estatísticos usados no BLASTp foram: alvo, proteoma; Expect value threshold, 1e-5; e Matriz de comparação, BLOSUM62.

Os números de identificação de domínios EF-hand (SM00054, IPR011992, IPR018247, IPR003299, IPR002048, IPR007330, IPR001751, PF13499, PF13405, PF13803, PF13833, PF13202, PF00036, PD00012, PS00018, PS50222, PS00303 e SSP47473) e palavras-chave (‘Calmodulin-like’ e ‘EF-hand’) foram usados no banco de dados LIS para uma procura complementar por proteínas CcCML. As sequências coletadas foram analisadas por similaridade para remover as sequências redundantes.

As sequências não redundantes foram submetidas à análise de domínios de proteína usando os Modelos Hidden Markov dos programas SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl.de>) (Letunic e Bork, 2017), Pfam (<http://pfam.xfam.org>) (Finn et al., 2016) e InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Finn et al., 2017). Em seguida, as sequências foram comparadas com as proteínas CaM2 de *A. thaliana* (AtCaM2) usando o programa ClustalW (Thompson et al., 1994). As sequências de *C. cajan* que tinham pelo menos dois domínios EF-hand e apresentaram no mínimo de 16% de identidade com as sequências de AtCaM2 foram consideradas como proteínas CcCML e nomeadas de acordo com a sua similaridade com proteínas CaM de *A. thaliana*.

3.2. Caracterização bioquímica e localização subcelular das proteínas CcCML

Parâmetros bioquímicos tais como ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (kDa), foram feitos usando a ferramenta *ExPASy ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2003). As ferramentas *Wolf PSORT* (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) (Horton et al., 2007) e *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson et al., 2007) foram usadas para prever a localização subcelular das proteínas CcCML.

3.3. Análise de expressão *in silico*

A análise de expressão gênica utilizou os dados de RNA-Seq disponibilizados no banco de dados “Legume Information System” (LIS, <http://legumeinfo.org>) (Dash et al., 2016). Tais dados foram obtidos por (Pazhamala et al. 2017), onde podem ser encontrados maiores detalhes experimentais. O programa “Bio-Analytic Resource for Plant Biology (BAR) HeatMapper Plus” (<http://bar.utoronto.ca/>) foi usado para gerar os heatmaps nos diferentes estádios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conjunto gênico constituído de 48.680 genes (Varshney et al., 2011) foi utilizado para procurar os genes CML de *C. cajan*, usando as sequências de aminoácidos das proteínas AtCaM2/3/5 e GmCaM2, adicionalmente, foi realizada uma procura utilizando as palavras chave “calmodulin” e “EF-hand”. Todas as sequências homólogas foram removidas após comparação de repetição nas respectivas buscas. Uma análise de domínio foi realizada para todas as sequências não redundantes, conforme informado na seção Material e Métodos. No total foram coletadas 85 sequências não redundantes. Após análise de domínios foram selecionadas 71 sequências que continham apenas domínios EF-hand. Destas, apenas 65 sequências apresentavam no mínimo dois EF-hand e pelo menos 16% de identidade com as proteínas AtCaM2 (Tabela 1). As CML de *C. cajan* foram nomeadas de acordo com a sua porcentagem de identidade com AtCaM2, como demonstrado na Tabela 1.

As CML de *C. cajan* contém entre 80 a 365 aminoácidos e possuem entre 2 e 5 domínios EF-hand (Tabela 1). Tais proteínas são pequenas (9344.25 a 42917.10Da) e de natureza ácida (pI 3,79 a 5,95), a exceção das CcCML17 e CcCML34, cujos pIs são 8.93 e 7.69, respectivamente (Tabela 1). A porcentagem média de resíduos de Met nas CcCML é de 4,84% (Tabela 1). Todas estas características bioquímicas das proteínas CcCML são semelhantes aquelas já encontradas para *Arabidopsis* (McCormack e Braam, 2003) e *Solanum lycopersicum* (Munir et al., 2016), indicando que a família de CML de *C. cajan* seja composta por 65 membros.

Tabela 1: Características físico-químicas das proteínas CMLs de *C. cajan*.

| Gene | Locus ^a | % AtCaM2 ^b | Ef-hand ^c | AA ^d | pI ^e | PM (Da) ^f | %Met ^g |
|---------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| CcCML1 | cajca.C.cajan_36799.1 | 83 | 3 | 175 | 4.06 | 19974.43 | 5.1 |
| CcCML2 | cajca.C.cajan_20364.1 | 80 | 4 | 150 | 4.01 | 16925.86 | 6 |
| CcCML3 | cajca.C.cajan_07108.1 | 78 | 4 | 150 | 4.07 | 17061.05 | 5.3 |
| CcCML4 | cajca.C.cajan_10766.1 | 67 | 4 | 149 | 4.07 | 16960.04 | 6.7 |
| CcCML5 | cajca.C.cajan_00951.1 | 67 | 4 | 148 | 4.15 | 16806.79 | 6.1 |
| CcCML6 | cajca.C.cajan_35777.1 | 66 | 3 | 148 | 4.17 | 16748.76 | 6.1 |
| CcCML7 | cajca.C.cajan_06948.1 | 61 | 3 | 149 | 4.30 | 17145.56 | 7.4 |
| CcCML8 | cajca.C.cajan_30381.1 | 53 | 3 | 149 | 4.34 | 17112.20 | 7.4 |
| CcCML9 | cajca.C.cajan_13123.1 | 53 | 2 | 135 | 4.86 | 15277.41 | 3.7 |
| CcCML10 | cajca.C.cajan_15574.1 | 50 | 4 | 189 | 4.35 | 20617.88 | 5.8 |
| CcCML11 | cajca.C.cajan_02626.1 | 48 | 3 | 147 | 4.86 | 16652.02 | 4.1 |
| CcCML12 | cajca.C.cajan_25288.1 | 47 | 4 | 162 | 4.60 | 18135.28 | 3.1 |
| CcCML13 | cajca.C.cajan_32155.1 | 46 | 4 | 199 | 4.5 | 21433.91 | 5.0 |
| CcCML14 | cajca.C.cajan_18717.1 | 46 | 2 | 205 | 4.46 | 23906.89 | 2.4 |
| CcCML15 | cajca.C.cajan_17088.1 | 45 | 4 | 170 | 4.89 | 19757.84 | 5.3 |
| CcCML16 | cajca.C.cajan_11893.1 | 44 | 4 | 158 | 4.22 | 17714.79 | 7.0 |
| CcCML17 | cajca.C.cajan_20856.1 | 43 | 2 | 139 | 8.93 | 15924.57 | 3.6 |
| CcCML18 | cajca.C.cajan_19575.1 | 43 | 4 | 139 | 4.95 | 15486.41 | 5.8 |
| CcCML19 | cajca.C.cajan_13440.1 | 43 | 4 | 139 | 4.25 | 15718.67 | 6.5 |
| CcCML20 | cajca.C.cajan_05519.1 | 42 | 4 | 140 | 4.56 | 15910.76 | 5.0 |
| CcCML21 | cajca.C.cajan_02935.1 | 42 | 4 | 156 | 4.43 | 17074.47 | 5.1 |
| CcCML22 | cajca.C.cajan_20244.1 | 42 | 2 | 102 | 3.99 | 11549.95 | 4.9 |
| CcCML23 | cajca.C.cajan_01910.1 | 40 | 4 | 222 | 4.66 | 24951.41 | 3.6 |
| CcCML24 | cajca.C.cajan_05517.1 | 40 | 2 | 84 | 4.24 | 9344.25 | 3.6 |
| CcCML25 | cajca.C.cajan_11420.1 | 39 | 3 | 106 | 4.31 | 11770.96 | 3.8 |
| CcCML26 | cajca.C.cajan_43706.1 | 38 | 4 | 159 | 4.33 | 17509.77 | 5.0 |
| CcCML27 | cajca.C.cajan_25254.1 | 38 | 4 | 160 | 4.27 | 17652.90 | 6.9 |
| CcCML28 | cajca.C.cajan_37352.1 | 37 | 4 | 201 | 4.96 | 23162.39 | 6.5 |
| CcCML29 | cajca.C.cajan_18521.1 | 37 | 4 | 212 | 4.80 | 24156.72 | 6.6 |
| CcCML30 | cajca.C.cajan_30492.1 | 37 | 2 | 102 | 3.79 | 11632.98 | 5.9 |
| CcCML31 | cajca.C.cajan_45879.1 | 34 | 4 | 147 | 4.13 | 15939.72 | 3.4 |

Tabela 1. Continuação

| Gene | Locus ^a | % AtCaM2 ^b | Ef-hand ^c | AA ^d | pI ^e | PM (Da) ^f | %Met ^g |
|---------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| CcCML32 | cajca.C.cajan_20000.1 | 34 | 4 | 185 | 5.97 | 21279.05 | 7.0 |
| CcCML33 | cajca.C.cajan_37169.1 | 34 | 4 | 187 | 4.83 | 21009.66 | 6.4 |
| CcCML34 | cajca.C.cajan_12771.1 | 34 | 4 | 184 | 7.69 | 20585.29 | 4.9 |
| CcCML35 | cajca.C.cajan_46780.1 | 34 | 3 | 191 | 5.06 | 21158.57 | 3.2 |
| CcCML36 | cajca.C.cajan_23008.1 | 34 | 2 | 80 | 4.27 | 2560776 | 3.8 |
| CcCML37 | cajca.C.cajan_34469.1 | 33 | 3 | 191 | 5.06 | 21614.13 | 5.8 |
| CcCML38 | cajca.C.cajan_08517.1 | 33 | 3 | 108 | 4.39 | 12016.91 | 10.2 |
| CcCML39 | cajca.C.cajan_38788.1 | 32 | 3 | 143 | 4.39 | 16374.73 | 9.8 |
| CcCML40 | cajca.C.cajan_20339.1 | 32 | 3 | 154 | 4.21 | 17580.89 | 5.2 |
| CcCML41 | cajca.C.cajan_20153.1 | 32 | 3 | 142 | 4.23 | 16220.37 | 9.2 |
| CcCML42 | cajca.C.cajan_11198.1 | 32 | 4 | 137 | 4.53 | 15573.73 | 5.8 |
| CcCML43 | cajca.C.cajan_06935.1 | 32 | 2 | 128 | 4.67 | 14008.01 | 4.7 |
| CcCML44 | cajca.C.cajan_17425.1 | 31 | 3 | 107 | 4.21 | 11826.32 | 7.5 |
| CcCML45 | cajca.C.cajan_29177.1 | 31 | 3 | 96 | 4.49 | 10813.44 | 7.3 |
| CcCML46 | cajca.C.cajan_34937.1 | 31 | 3 | 182 | 4.39 | 20402.85 | 4.4 |
| CcCML47 | cajca.C.cajan_38503.1 | 30 | 3 | 190 | 4.52 | 21202.01 | 4.2 |
| CcCML48 | cajca.C.cajan_43041.1 | 29 | 4 | 140 | 4.40 | 15819.99 | 5.7 |
| CcCML49 | cajca.C.cajan_09115.1 | 29 | 2 | 193 | 4.54 | 21326.21 | 5.7 |
| CcCML50 | cajca.C.cajan_00514.1 | 29 | 3 | 258 | 5.02 | 29664.73 | 1.9 |
| CcCML51 | cajca.C.cajan_30659.1 | 29 | 3 | 223 | 4.70 | 25472.81 | 2.2 |
| CcCML52 | cajca.C.cajan_08954.1 | 28 | 3 | 153 | 4.53 | 17676.05 | 3.3 |
| CcCML53 | cajca.C.cajan_27206.1 | 27 | 3 | 215 | 4.80 | 24647.04 | 1.9 |
| CcCML54 | cajca.C.cajan_04564.1 | 27 | 3 | 343 | 4.53 | 39922.69 | 2.9 |
| CcCML55 | cajca.C.cajan_07991.1 | 26 | 3 | 205 | 4.85 | 23588.67 | 1.5 |
| CcCML56 | cajca.C.cajan_28568.1 | 25 | 4 | 229 | 4.58 | 26141.65 | 4.8 |
| CcCML57 | cajca.C.cajan_17297.1 | 25 | 3 | 213 | 4.65 | 24425.75 | 1.9 |
| CcCML58 | cajca.C.cajan_24608.1 | 24 | 3 | 226 | 4.72 | 25852.39 | 1.8 |
| CcCML59 | cajca.C.cajan_07971.1 | 24 | 5 | 365 | 4.76 | 42917.10 | 1.9 |
| CcCML60 | cajca.C.cajan_02961.1 | 24 | 3 | 175 | 4.58 | 19978.67 | 3.4 |
| CcCML61 | cajca.C.cajan_13025.1 | 24 | 3 | 212 | 4.76 | 24507.07 | 2.8 |

Tabela 1. Continuação

| Gene | Locus ^a | % AtCaM2 ^b | Ef-hand ^c | AA ^d | pI ^e | PM (Da) ^f | %Met ^g |
|---------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| CcCML62 | cajca.C.cajan_27951.1 | 23 | 3 | 208 | 4.79 | 24048.50 | 1.9 |
| CcCML63 | cajca.C.cajan_14220.1 | 23 | 4 | 220 | 5.16 | 25291.81 | 3.2 |
| CcCML64 | cajca.C.cajan_16865.1 | 23 | 3 | 226 | 5.38 | 26043.77 | 2.2 |
| CcCML65 | cajca.C.cajan_26013.1 | 22 | 2 | 164 | 4.95 | 18936.65 | 3.7 |

^aLocus anotado no banco de dados LIS; ^b Porcentagem de identidade com a CaM2 de *Arabidopsis*; ^c Número de domínios EF-hand baseado no InterProScan; ^d Número total de aminoácidos; ^e pI Ponto isoelétrico; ^f PM, Peso Molecular, Da; ^g M% = Porcentagem de aminoácidos Metionina.

As 65 CcCML estão distribuídas em diferentes compartimentos intracelulares e no ambiente extracelular (Figura 1). De acordo com a predição com a ferramenta Target P, 49 CcCML estão em algum compartimento intracelular ou fora da célula, enquanto 5 CcCML foram preditas estarem no cloroplasto, 5 na mitocôndria e 6 no ambiente extracelular (Figura 1). Por outro lado, a ferramenta WoLF PSORT predisse a sub-localização com maiores detalhes abrangendo maior quantidade de organelas, com a distribuição em maior número de CML no núcleo (Figura 2). A CcCML 7 foi predita ter dupla localização sub-celular, no citoplasma e núcleo (Figura 2). Enquanto as CcCML 50, 54 e 63 foram preditas estarem localizadas no Retículo Endoplasmático (Figura 2).

Comparando os dois resultados entre as diferentes ferramentas tem-se que, as CcCML 10, 13 e 15 evidenciaram a mesma predição de sua localização celular, sendo CcCML 10 localizada no cloroplasto e CcCML 13 e 15 na mitocôndria. Em conjunto estes dados indicam que as CMLs de *C. cajan* podem atuar em diferentes compartimentos intracelulares e no ambiente extracelular. Recentemente, foi demonstrado que a CML38 de *Arabidopsis* é uma proteína secretada para que possa interagir com seu alvo no ambiente extracelular e assim participar dos eventos que regulam o crescimento radicular (Campos et al. 2018).

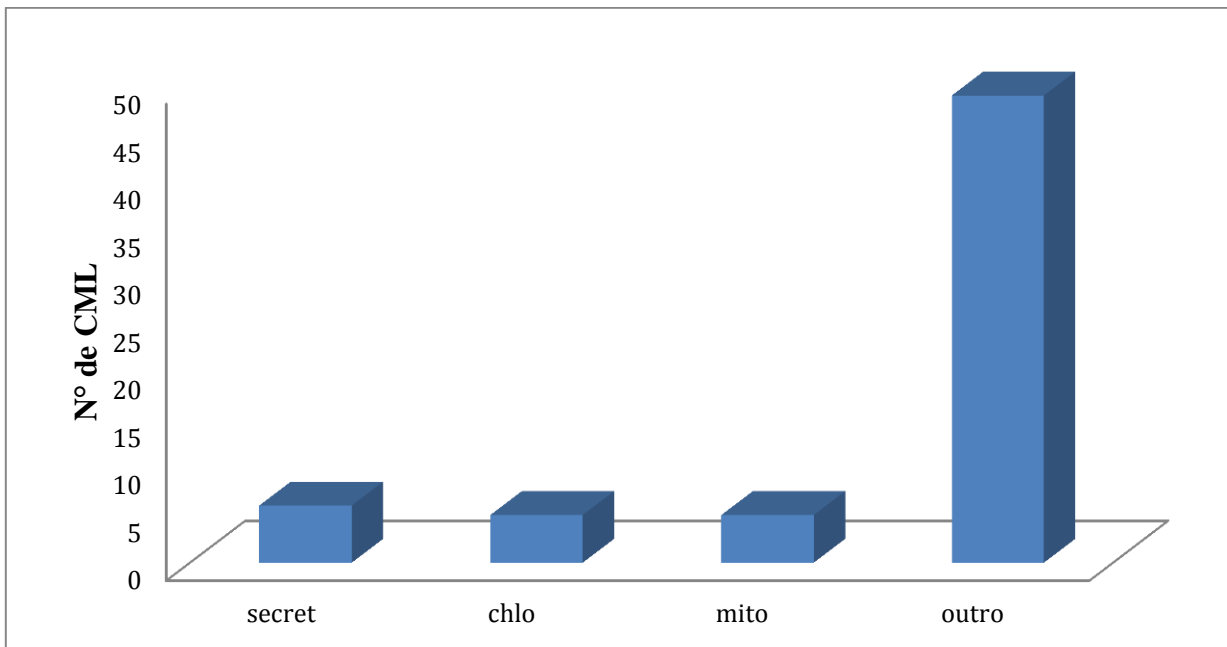


Figura 1: Distribuição das 65 CcCML em diferentes organelas. A predição foi feita usando a ferramenta Target P; Legenda: secret, secretado; chlo, cloroplasto; mito, mitocôndria, outro, qualquer outro compartimento.

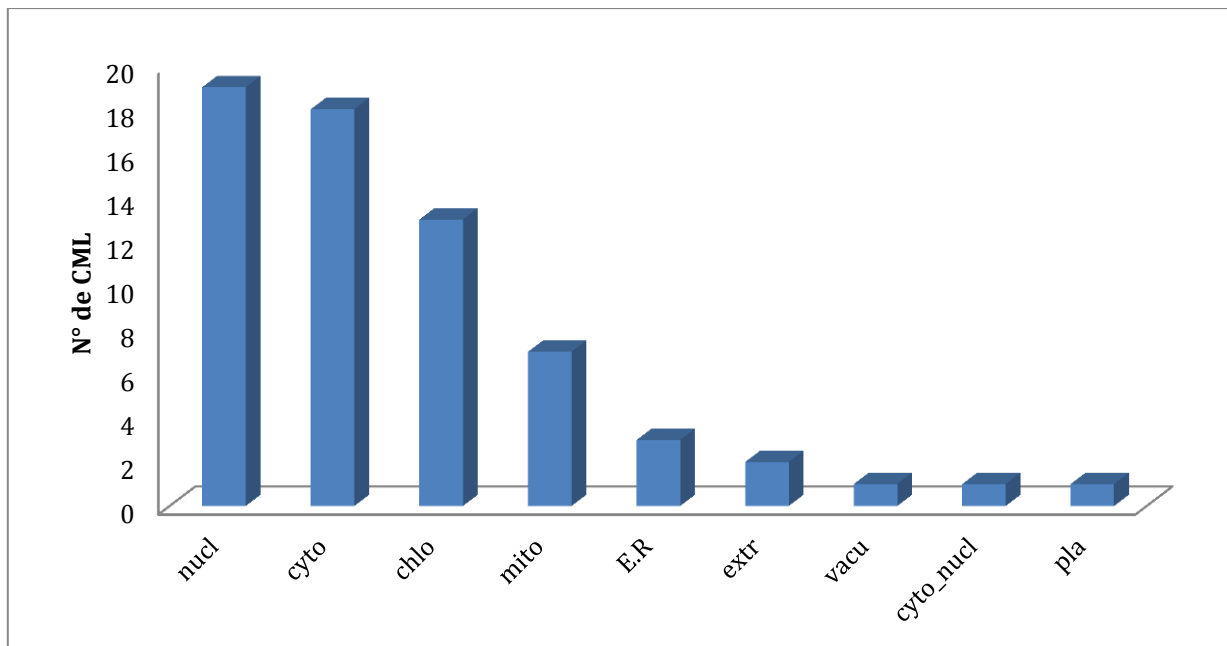


Figura 2: Distribuição das 65 CcCML entre os diferentes compartimentos intracelulares e no ambiente extracelular. A predição da localização subcelular foi feita usando a ferramenta WoLF PSORT. Legenda: nucl., núcleo; cyto, citoplasma; chlo cloroplasto, mito, mitocôndria; E.R, Retículo Endoplasmático; extr, extracelular, vacu, vacúolo; cyto_nucl, citoplasma e núcleo; pla, plastídeo.

O perfil de expressão dos genes CcCML foi analisado no tecido foliar e radicular de plantas de *C. cajan* durante vários estádios de desenvolvimento: plântula, vegetativo, reprodutivo e senescência (Figura 3). Os resultados revelaram que as CcCML 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 17, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 36, 38, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 53, 54, 55, 57 a 65 apresentaram expressão relativamente baixa nos dois tecidos analisados e nos diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 3). Por outro lado as CcCML 1, 3, 9, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 39, 40, 41, 43, 49, 51, 52 e 56 foram mais relevantes em suas expressões, variando entre os tecidos radiculares e foliar e nos diferentes estádios fenológicos de *C. cajan* (Figura 3).

As proteínas CcCML 1, 9, 14, 20, 33 e 35 foram mais expressivas no tecido foliar e radicular no estágio reprodutivo (Figura 3), sugerindo que proteínas estejam envolvidas nos mecanismos de sinalização celular nos tecidos radiculares e foliar durante estágio reprodutivo em *C. cajan*. No tecido foliar no estágio vegetativo as CcCML que tiveram maior expressão foram as CcCML 1, 9, 20, 35 e 39 (Figura 3). No estágio de senescência em tecido foliar de *C. cajan* as CcCML 1, 33 e 39 foram as que mais se expressaram; já no tecido radicular, também no estágio de senescência as proteínas CcCML que tiveram maior expressão foram as CcCML 1, 18, 20 e 35 (Figura 3). Levando em consideração estes dados podemos sugerir a participação destas CcCML 1, 33 e 39 em etapas do mecanismo de sinalização celular em *C. cajan* no tecido foliar em estágio de senescência. No tecido radicular no estágio de senescência podemos apontar o envolvimento das CcCML 18, 20 e 35 em mecanismos de sinalização celular em *C. cajan*, devido sua alta expressão no estágio de senescência em tecido radicular.

Alguns genes codificadores de proteínas que contém EF-hand foram preferencialmente expressos em nódulo de raiz de soja, como CML45, CML63, CML73, CML110 que foram responsivos à inoculação de rizóbio (*Bradyrhizobium japonicum*) (Zeng et al., 2017). Isto pode sugerir que as CcCML 1, 9, 18, 20 e 35, devido a sua alta expressão no tecido radicular, (Figura 3) possam estar relacionadas com a interação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio e a espécie de *C. cajan* ou na formação dos nódulos.

O perfil de expressão da família de calmodulina-like em *C. cajan* evidenciou divergência nas funções dos genes nos tecidos radiculares e foliar, durante o crescimento e desenvolvimento desta espécie. Quando comparado em outro trabalho, conduzido em tomate (*Solanum*

lycopersicum) (Munir et al., 2016) e em soja (*Glycine max*) (Zeng et al., 2017) observamos resultados bem semelhantes. Devido os resultados obtidos no presente trabalho a família de calmodulina-like em *Cajanus cajan* merece pesquisas adicionais.

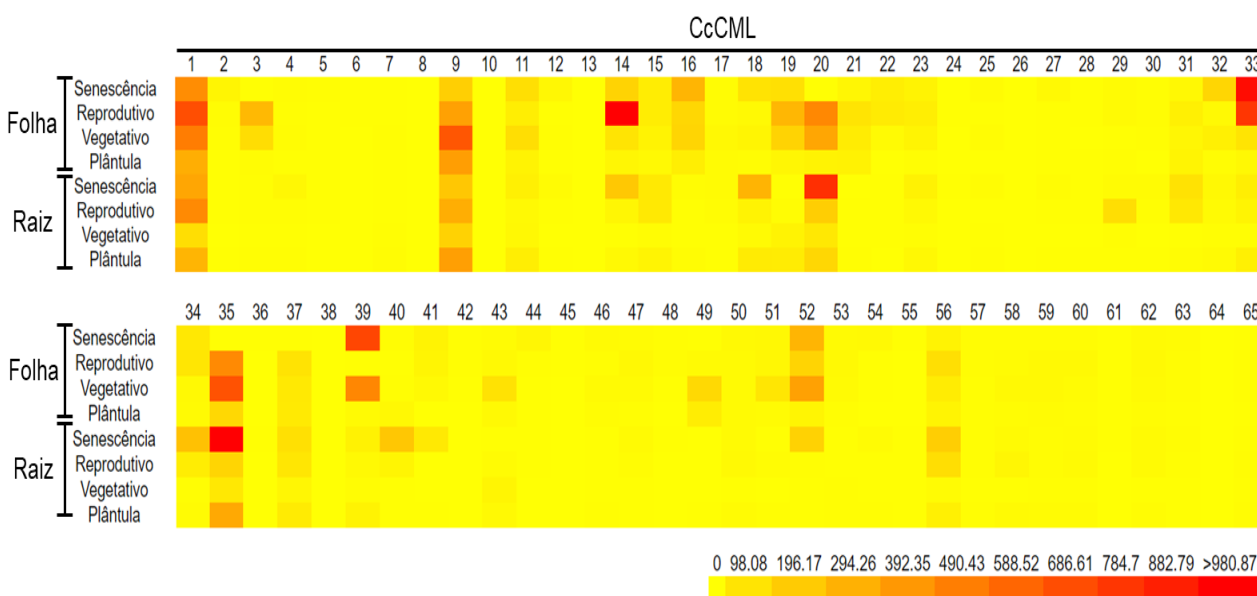


Figura 3: Perfis de expressão dos genes de CML nos tecidos radicular e foliar em diferentes estádios de desenvolvimento de *C. cajan*. A barra de cores representa os valores de expressão, com vermelho representando altos níveis de expressão e amarelo representando baixos níveis de expressão.

6. CONCLUSÃO

- De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho a família de proteínas CML em *C. cajan* é constituída por 65 membros.
- As 65 CcCML encontradas neste trabalho estão distribuídas em diferentes compartimentos intracelulares e no ambiente extracelular.
- Os genes *CcCML* são expressos no tecido foliar e radicular, em todos os estádios fenológicos da planta, com alta expressão de determinadas CcCML nos tecidos radiculares e foliar, ambos no estágio de senescência e reprodutivo, porém seus papéis ainda deverão ser estudados.

7. REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F., ET AL. (1997) **Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- BATISTIČ, O.; KUDLA, J. (2012) **Analysis of calcium signaling pathways in plants.** *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820: 1283–1293..
- BOONBURAPONG, B.; BUABOOCHA, T. (2007) **Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins.** *BMC Plant Biol.* 7.
- CAMPOS, W.F. (2018) ***Arabidopsis thaliana* rapid alkalization factor 1–mediated root growth inhibition is dependent on calmodulin-like protein 38.** *J. Biol. Chem.*, 293: 2159–2171.
- DASH, S. ET AL. (2016) Legume information system (LegumeInfo.org): **A key component of a set of federated data resources for the legume family.** *Nucleic Acids Res.* 44: D1181–D1188.
- EDGAR, R.C.. (2004) MUSCLE: **Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res.* 32: 1792–1797.
- EDGAR, R.C., BATZOGLOU, S. (2006) **Multiple sequence alignment.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 368–373.
- EMANUELSSON, O., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G., AND NIELSEN, H. (2007). **Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools.** *Nat. Protoc.* 2: 953–971.
- FINN, R.D. ET AL. (2017) **InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations.** *Nucleic Acids Res.* 45: D190–D199.

- FINN, R.D. ET AL. (2016) **The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future.** *Nucleic Acids Res.* 44: D279–D285.
- GASTEIGER, E., GATTIKER, A., HOOGLAND, C., IVANYI, I., APPEL, R.D., BAIROCH, A. (2003) **ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.** *Nucleic Acids Res.* 31: 3784–3788.
- GOODSTEIN, D.M., SHU, S., HOWSON, R., NEUPANE, R., HAYES, R.D., FAZO, J., MITROS, T., DIRKS, W., HELLSTEN, U., PUTNAM, N., ROKHSAR, D.S. (2012) **Phytozome: A comparative platform for green plant genomics.** *Nucleic Acids Res.* 40: 1178–1186.
- HASHIMOTO, K., KUDLA, J. (2011). **Calcium decoding mechanisms in plants.** *Biochimie* 93: 2054–2059.
- HORTON, P., PARK, K.J., OBAYASHI, T., FUJITA, N., HARADA, H., ADAMS-COLLIER, C.J., NAKAI, K. (2007) **WoLF PSORT: Protein localization predictor.** *Nucleic Acids Res.* 35: 585–587.
- HU, B., JIN, J., GUO, A.Y., ZHANG, H., LUO, J., GAO, G. (2015) **GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server.** *Bioinformatics* 31: 1296–1297.
- KAWAHARA, Y. ET AL. (2013) **Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data.** *Rice* 6: 4.
- KHOURY, C.K., CASTAÑEDA-ALVAREZ, N.P., ACHICANOY, H.A., SOSA, C.C., BERNAU, V., KASSA, M.T., NORTON, S.L., VAN DER MAESEN, L.J.G., UPADHYAYA, H.D., RAMÍREZ-VILLEGAS, J., JARVIS, A., STRUIK, P.C. (2015) **Crop wild relatives of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]: Distributions, ex situ conservation status, and potential genetic resources for abiotic stress tolerance.** *Biol. Conserv.* 184: 259–270.

- KUDLA, J., BATISTIC, O., HASHIMOTO, K. (2010) **Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing**. *Plant Cell* 22: 541–563.
- KUMAR, S., STECHER, G., AND TAMURA. (2016) K. MEGA7 **Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets**. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.
- LAMESCH, P. ET AL. (2012) **The Arabidopsis Information Resource (TAIR): Improved gene annotation and new tools**. *Nucleic Acids Res.* 40: 1202–1210.
- LETUNIC, I., BORK, P. (2017) **20 years of the SMART protein domain annotation resource**. *Nucleic Acids Res.:* 1–4.
- MCCORMACK, E., BRAAM, J. (2003) **Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis**. *New Phytol.* 159: 585–598.
- MOHANTA, T.K., KUMAR, P., BAE, H. (2017) **Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants**. *BMC Plant Biol.* 17: 38.
- MUNIR, S., KHAN, M.R.G., SONG, J., MUNIR, S., ZHANG, Y., YE, Z., WANG T. (2016) **Genome-wide identification, characterization and expression analysis of calmodulin-like (CML) proteins in tomato (*Solanum lycopersicum*)**. *Plant Physiology and Biochemistry* 102 167-179.
- ODENY, D.A. **The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Africa**. (2007) *Nat. Resour. Forum* 31: 297–305.
- PAZHAMALA, L.T., PUROHIT, S., SAXENA, R.K., GARG, V., KRISHNAMURTHY, L., VERDIER, J., VARSHNEY, R.K. (2017) **Gene expression atlas of pigeonpea and its application to gain insights into genes associated with pollen fertility implicated in seed**

formation. J. Exp. Bot. 68: 2037–2054.

PEROCHON, A., ALDON, D., GALAUD, J.-P., RANTY, B (2011) **Calmodulina and calmodulinlike proteins in plant calcium signaling.** Biochimie 93, 2048e2053.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.07.012>. The Calcium signal: a universal carrier to 520 code, decode and transduce information..

RAO, S.S., EL-HABBAK, M.H., HAVENS, W.M., SINGH, A., ZHENG, D., VAUGHN, L., HAUDENSHIELD, J.S., HARTMAN, G.L., KORBAN, S.S., GHABRIAL, S.A. (2014) **Overexpression of GmCaM4 in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress.** Mol. Plant Pathol. 15: 145–160.

SANDERS, D., BROWNLEE, C., AND HARPER, J. (1999) **Communicating with calcium.** Plant Cell 11: 691–706.

SANG HYOUNG LEE, JONG CHEOL KIM, MAL SOON LEE, WON DO HEO, HAE YOUNG SEO, HAE WON YOON, JONG CHAN HONG, SANG YEOL LEE, JEONG DONG BAHK, HWANG, I., MOO JE CHO. (1995) **Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes.** J. Biol. Chem. 270: 21806–21812.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994) **ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acids Res. Acids Res 22: 4673–4680.

VARSHNEY, R.K. ET AL. (2011) **Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers.** Nat. Biotechnol. 30: 83.

ZENG, H., ZHANG, Y., ZHANG, X., PI, E., ZHU, Y. (2017) **Analysis of EF-Hand Proteins in Soybean Genome Suggests Their Potential Roles in Environmental and Nutritional Stress Signaling.** Original Research *frontiers in Plant Science* doi: 10.3389/fpls.2017.00877.

ZHAO, Y., LIU, W., XU, Y.-P., CAO, J.-Y., BRAAM, J., CAI, X.-Z (2013) **Genome-wide identification and functional analyses of calmodulin genes in *Solanaceous species*.** *BMC Plant Biol.* 13: 1–15.