

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 21/09/2022.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**PASSOS INICIAIS DO METABOLISMO DE ISOPRENOIDES EM
ANGIOSPERMAS: GENÔMICA EVOLUTIVA E ANÁLISES MOLECULARES EM
*COFFEA SPP***

NATACHA SILVA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**PASSOS INICIAIS DO METABOLISMO DE ISOPRENOIDES EM
ANGIOSPERMAS: GENÔMICA EVOLUTIVA E ANÁLISES MOLECULARES EM
*COFFEA SPP***

NATACHA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Douglas Silva Domingues

Coorientadora: Prof. Dra. Suzana Tiemi Ivamoto-Suzuki

**Rio Claro - SP
2020**

S586p Silva, Natacha
Passos iniciais do metabolismo de isoprenoides em angiospermas:
genômica evolutiva e análises moleculares em Coffea spp / Natacha
Silva. -- Rio Claro, 2020
75 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Douglas Silva Domingues
Coorientadora: Suzana Tiemi Ivamoto-Suzuki

1. Botânica. 2. Biologia molecular. 3. Genômica evolutiva. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PASSOS INICIAIS DO METABOLISMO DE ISOPRENOIDES EM ANGIOSPERMAS:
GENÔMICA EVOLUTIVA E ANÁLISES MOLECULARES EM COFFEA SPP

AUTORA: NATACHA SILVA

ORIENTADOR: DOUGLAS SILVA DOMINGUES

COORIENTADORA: SUZANA TIEMI IVAMOTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), área: Biologia Vegetal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES
Departamento de Biodiversidade / IB / UNESP - Rio Claro

Prof. Dr. JORGE MAURICIO COSTA MONDEGO
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Recursos Genéticos Vegetais / Instituto Agrônomo de Campinas

Prof. Dr. LUIZ EDUARDO VIEIRA DEL BEM
Departamento de Botânica / Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Dr^a LUISA FERNANDA BERMUDEZ SALAZAR
Instituto de Biotecnología Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Argentina

Prof. Dr. IGOR CESARINO
Departamento de Botânica Instituto de Biociências Universidade de São Paulo (USP)

Rio Claro, 21 de setembro de 2020

*“Ensine-a a questionar a linguagem.
A linguagem é o repositório de nossos preconceitos,
de nossas crenças, de nossos pressupostos”
Chimamanda Ngozi Adichie*

*“Não precisamos de mais tempo,
precisamos de um tempo que seja nosso”
Mia Couto*

*“Reconhece a queda e não desanima.
Levanta, sacode a poeira, dá volta por cima”
Paulo Emílio Vanzolini*

Dedico este trabalho à minha família

AGRADECIMENTOS

Ao apoio e financiamento da FAPESP:

Processo nº 2016/10896-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À agência de fomento que tornou este trabalho possível: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão de bolsa durante o período do doutorado.

Ao meu orientador Douglas, por acreditar no meu trabalho e profissionalismo. Por ter aberto, gentilmente, as portas para me orientar. Inúmeras vezes foi paciente com as minhas dificuldades e nunca desistia de me ensinar. Levarei, com muito carinho, o seu exemplo como educador para minha atuação profissional. “Anda com fé eu vou. Café não costuma faia”

À minha coorientadora Suzana, por passar dias a fio, com extrema educação e paciência, me ensinando grande parte do desenvolvimento do trabalho. Por ser meu exemplo de força, dedicação e perseverança. Levarei de você “a marca Maria de ter fé na vida”. Você é especial!

Aos meus lindos e queridíssimos amigos de laboratório, Gian (o amuleto da sorte), Paula (a mãezona guerreira), Daniel (o papis da Disney) e Raíssa (a fada delicada), com vocês os meus dias de trabalho eram mais leves. Obrigada pelas risadas, pelas confidências trocadas e por me manter em pé em dias de muita tempestade. Com vocês pude ouvir aquela “canção do rádio, em que um antigo compositor baiano me dizia: tudo é divino, tudo é maravilhoso”.

À minha família, a minha riqueza maior do mundo. Mamis Neila, papai Aguinaldo, irmão Fili, talvez mais 70 páginas de tese descreveriam o que vocês sempre fazem por mim, mas não posso essa ousadia. Com vocês eu “Vou mastigando o mundo e ruminando. E assim vou tocando essa vida marvada. Pra todo aquele que só fala que não sabemos viver, chega lá em casa pro uma visitinha. Que num verso

ou num reverso da vida inteirinha, há de nos encontrar num caterete”. Obrigada, obrigada e obrigada. Amo vocês.

Ao meu maravilhoso parceiro de vida, Gabriel. Por ser o homem que me ampara e cuida! Assim como a música, você é vital em mim. Junto com você e com meu diploma de doutora, espero um dia poder dizer que “de quimeras mil um castelo ergui”. Amo você!

Às minhas amigas de infância, Marina, Vanessa, Amanda e Letícia (prima) por me darem total apoio e conforto nas voltas pra São Joaquim da Barra. Vocês fizeram a maior diferença!

Aos meus amigos da Unesp Rio Claro, Luís Felipe, Ana Angélica, Marina Gavassi, Artur “fininho” e Nayara por me ajudarem no “traz a saideira?”.

Aos meus amigos de Rio Claro, Teresa, Paola e Nuno, Burts, Leonel e Ju, Mari e Ralf, Ferfura e Samuca, Lara e Lincoln + Cacázinha, Clarinha, as irmãs Riani, Dani e todo o Núcleo de Samba Rio Clareense, por me oferecerem a mais pura musicalidade. Com vocês o doutorado foi bem mais tranquilo.

À Unesp de Ilha Solteira, por me apresentar as minhas joias raras, Desirée, Paola Trama e família, Felipe Negão, Lagostinha, Marilaine, Alysson, João do Milho, Vera Andrade e Felipe Andrade.

Ao professor Gustavo Habermann, por disponibilizar parte do seu laboratório de pesquisa.

À professora Alessandra Coan e a querida Celinha, por me ajudar em momentos burocráticos delicados.

Ao pesquisador Luís Filipe por disponibilizar o laboratório de pesquisa do IAPAR – Londrina.

E a todos que de alguma forma estiveram presentes neste momento...

Obrigada!

SILVA, Natacha. **Passos iniciais do metabolismo de isoprenoides em angiospermas: genômica evolutiva e análises moleculares em *Coffea* spp.** 2020. 73 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2020.

RESUMO

Os isoprenoides compõem uma classe de metabólitos especializados em plantas, com funções biológicas, ecológicas e fisiológicas. As plantas sintetizam milhares de compostos derivados dos isoprenos, com função associada a atração de polinizadores, proteção contra pragas, desenvolvimento e crescimento das plantas. Além disso, eles são muito utilizados pelas indústrias farmacêutica e de cosméticos. Existem duas vias metabólicas capazes de produzir isoprenoides em plantas: a via citoplasmática do mevalonato (MVA) e a via plastidial do metileritritol fosfato (MEP). Os objetivos do trabalho foram: i) identificar os genes iniciais da via de biossíntese de isoprenoides em *Coffea* spp.; ii) avaliar se o elicitor ácido hexanoico (Hx) é capaz de modular o perfil transcricional dos genes da via MVA e MEP em *C. arabica*; iii) analisar a evolução dos genes chave da via MVA (*HMGR* e *MVK*) e MEP (*DXS* e *DXR*). Plantas de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho (CaCV) e cv. Obatã (CaOB) foram tratadas com aplicação de ácido hexanoico (Hx - 0,55 mM) em solução nutritiva aerada, e após 48 h foram coletadas folhas e raízes para extração de RNA e análises de perfil transcricional via RNA-seq e RT-qPCR. Foram identificados mais de uma cópia para cada gene da via MVA (*HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *PMK*, *MVD*) e MEP (*DXS*, *DXR*, *CMK*, *MDS*, *HDS*, *HDR*) em *C. arabica*. *C. eugenoides* apresentou mais de uma cópia para alguns genes da via MVA (*AACT*, *HMGR*, *PMK*, *MVD*) e da via MEP (*DXS* e *HDR*). Em *C. canephora*, os genes da MVA (*AACT*, *HMGS*, *MVK*, *PMK*, *MVD*) e alguns da MEP (*DXR*, *MCT*, *CMK*, *MDS*, *HDS*) foram de cópia única. Os genes *AACT*, *HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *PMK*, *MVD*, *DXS*, *DXR*, *CMK* e *MDS* foram induzidos em folhas tratadas com Hx em CaCV. Em CaOB, os genes *MVK*, *DXS*, *DXR*, *CMK*, *MDS* e *HDS* foram induzidos em folhas tratados com Hx. Os genes *AACT*, *HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *PMK*, *DXS* e *DXR* foram reprimidos em raízes de CaCV e os genes *AACT*, *HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *MVD*, *DXS*, *DXR* e *MDS* reprimidos em raízes de CaOB tratadas com Hx. Os nossos resultados indicam que o Hx é capaz de modular a expressão dos genes das vias MVA e MEP, em folhas e raízes de café de maneira genótipo e tecido-específica, evidenciando o poder reprogramador de Hx no metabolismo de isoprenoides.

Palavras-chave: Coffee, MVA, MEP, terpenoides, ácido hexanoico

SILVA, Natacha. **Initial steps of isoprenoids biosynthesis in angiosperms: genomic evolution and molecular analysis in *Coffea* spp.** 2020. 73 p. Thesis (PhD in Biological Sciences – Plant Biology) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2020.

ABSTRACT

Isoprenoids comprise a class of specialized metabolites from plants comprising important biological, ecological and physiological functions. Plants synthesize thousands of isoprene compounds, which are related to pollinators attraction, anti-herbivory properties, plant growth and development. In addition, they are widely used by the pharmaceutical and cosmetic industries. There are two metabolic pathways responsible for isoprenoid biosynthesis in plants: the cytoplasmic mevalonate pathway (MVA) and the plastidic methylerythritol phosphate pathway (MEP). In this study our main goals were: i) to identify genes related to the initial steps of isoprenoid biosynthesis in *Coffea* spp.; ii) evaluate if hexanoic acid (Hx) can transcriptionally modulate genes of MVA and MEP pathway in *C. arabica*; iii) analyze the evolution of selected MVA (*HMGR* and *MVK*) and MEP (*DXS* and *DXR*) genes. *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho (CaCV) and cv. Obatã (CaOB) plants were treated with exogenous application of hexanoic acid (Hx - 0.55 mM) in an aerated nutrient solution, and after 48 h, leaves and roots were collected for RNA extraction and transcriptional analyses using RNA-seq and RT-qPCR. More than one copy were observed for several MVA pathway genes (*HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *PMK*, *MVD*) and MEP pathway genes (*DXS*, *DXR*, *CMK*, *MDS*, *HDS*, *HDR*) in *C. arabica*. *C. eugenoides* presented more than one copy of some genes from MVA (*AACT*, *HMGR*, *PMK*, *MVD*) and MEP (*DXS*, *HDR*) pathways. In *C. canephora*, some genes from MVA (*AACT*, *HMGS*, *MVK*, *PMK*, *MVD*) and MEP (*DXR*, *MCT*, *CMK*, *MDS*, *HDS*) pathways were classified as single copy. *AACT*, *HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *PMK*, *MVD*, *DXS*, *DXR*, *CMK* and *MDS* genes were induced in leaves under Hx-treatment in CaCV. In CaOB, *MVK*, *DXS*, *DXR*, *CMK*, *MDS* and *HDS* genes were induced in leaves by Hx exogenous application. *AACT*, *HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *PMK*, *DXS* and *DXR* genes were repressed in CaCV roots and *AACT*, *HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *MVD*, *DXS*, *DXR* e *MDS* repressed in CaOB roots under Hx treatment. Our results indicated that Hx can modulate the expression of genes involved in MVA and MEP pathways in coffee in a genotype and tissue-specific way, emphasizing that Hx is able to reprogram isoprenoid metabolism.

Keywords: Coffee, MVA, MEP, terpenoids, hexanoic acid

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 A via de biossíntese de isoprenoides	12
1.2. A importância dos genes <i>HMGR</i> e <i>DXS</i>	16
1.2. A importância dos genes <i>MVK</i> e <i>DXR</i>	16
1.3. Os isoprenoides no gênero <i>Coffea</i> spp	17
1.4. A utilização de elicitores para a indução da biossíntese de compostos especializados	18
1.5. Referencial bibliográfico	19
2. OBJETIVO GERAL	23
2.1. Objetivos específicos	23
3. CAPÍTULO 1: Análise genômica das vias de biossíntese de isoprenoides em <i>Coffea</i> spp.	24
3.1. Introdução	25
3.2 Material e métodos	27
3.2.1. Material vegetal, tratamento com ácido hexanóico e extração de RNA total	27
3.2.2. Análise do perfil transcricional dos genes das vias MVA e MEP em <i>C. arabica</i> .	28
3.2.3. Identificação dos genes das vias MVA e MEP nos genomas de <i>Coffea</i> spp	29
3.2.4. Análise filogenética dos genes <i>HMGR</i> e <i>DXS</i>	30
3.2.5. Determinação das estruturas gênicas de <i>HMGR</i> e <i>DXS</i> em plantas	30
3.3 Resultados e discussão	31
3.3.1 Identificação do número de cópias dos genes das vias MVA e MEP em <i>Coffea</i> spp	31
3.3.3 Número de cópias e análise filogenética dos genes <i>HMGR</i> e <i>DXS</i>	37
3.3.4. Estrutura éxon-íntron dos genes <i>HMGR</i> e <i>DXS</i>	42
3.4. Conclusão	44
4. CAPÍTULO 2: Low-Copy Genes in Terpenoid Metabolism: The Evolution and Expression of <i>MVK</i> and <i>DXR</i> Genes in Angiosperms	48
4.1. Introduction	48
4.2. Results	50
4.2.1. Copy Number of <i>MVK</i> and <i>DXR</i> Genes in Plants	50
4.2.2. Phylogenetic Analyses	51
4.2.3. Exon–Intron Structure of <i>MVK</i> and <i>DXR</i> Genes	54
4.2.4. Nucleotide Substitution and Selection in <i>MVK</i> and <i>DXR</i> Genes	55
4.2.5. Estimated Time of Duplication of <i>MVK</i> and <i>DXR</i> Genes	55

4.2.6. Recombination Events of MVK and DXR Genes _____	56
4.2.7. RNA-seq-Based Expression Profiles _____	57
4.2.8. RT-qPCR-Based Transcriptional Profile of MVK and DXR Genes in <i>C. arabica</i> _____	59
4.3. Discussion _____	61
4.4. Materials and Methods _____	62
4.4.1. Identification and Annotation of MVK and DXR Gene Families in Plants ____	62
4.4.2. Multiple Sequence Alignments and Phylogenetic Analysis _____	63
4.4.3. Determination of Gene Structures _____	63
4.4.4. Selection Pressure and Evolutionary Analyses _____	63
4.4.5. Gene Duplication Analysis _____	63
4.4.6. Gene Recombination Analysis _____	63
4.4.7. RNA-seq-Based Expression Profile Analysis of MVK and DXR Genes ____	64
4.4.8. Transcriptional Profiles of MVK and DXR Genes in <i>C. arabica</i> by RT-qPCR	64
4.5. Conclusions _____	65
4.6. References _____	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	75

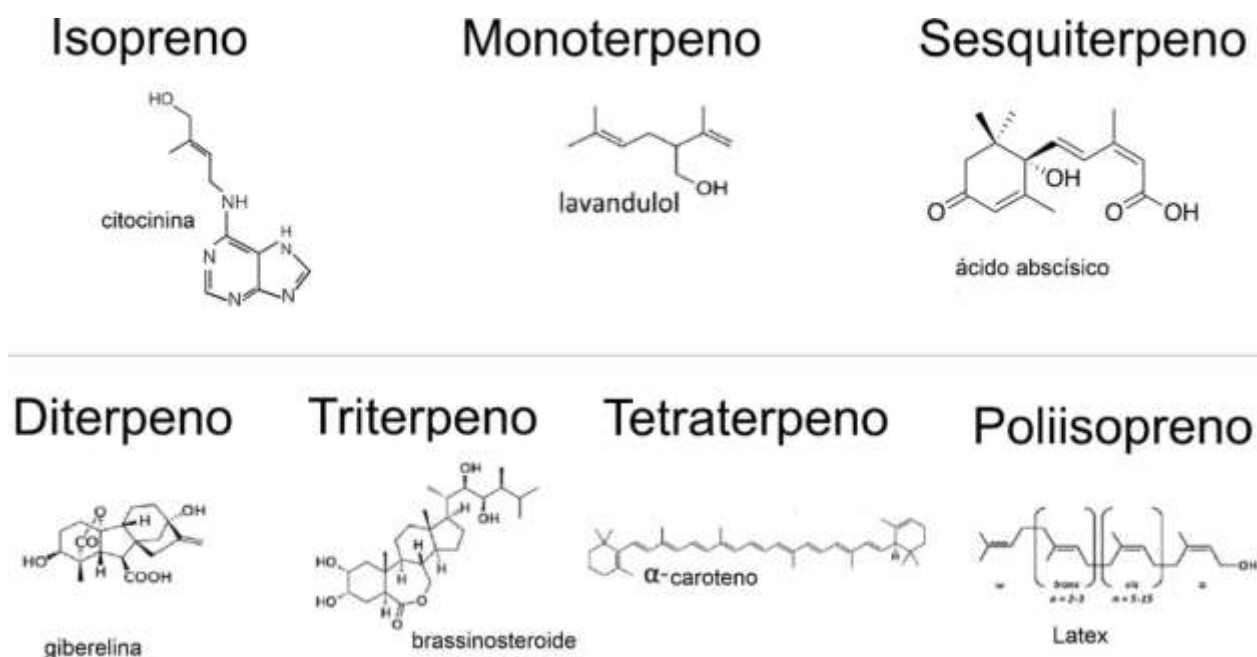
1. INTRODUÇÃO

1.1 A via de biossíntese de isoprenoides

Os isoprenoides ou terpenoides compõem uma classe de metabólitos especializados em plantas, com funções biológicas, ecológicas e fisiológicas (TAIZ et al., 2017). Os vegetais sintetizam mais de 40 mil compostos de terpenos relatados na literatura (GALATA; MAHMOUD, 2012; ZHOU; PICHERSKY, 2020). Estes compostos nos vegetais têm funções de proteção contra predadores, atração de polinizadores, controle da taxa transpiratória, proteção à luz ultravioleta, desenvolvimento e crescimento (TAIZ et al., 2017; PICHERSKY; RAGUSO, 2018).

Todos os tipos de isoprenoides derivam de precursores de cinco carbonos (C_5). Essas unidades geram moléculas de comprimento de cadeia de carbono definido (C_{10} , C_{15} , C_{20} , ... C_{5n}), que servem como ponto de partida para a produção de toda a variedade de isoprenoides (ZI et al., 2014; PICHERSKY; RAGUSO, 2018). Assim, isoprenoides são classificados como: os isoprenos - C_5 , que podem originar o hormônio citocinina (VRANOVA et al., 2013); os monoterpenos (C_{10}), que formam os compostos voláteis dos óleos essenciais de algumas plantas (hortelã, lavanda e citronela) e os piretroides presente nos crisântemos (repelente natural de insetos – PICHERSKY; RAGUSO, 2018); os sesquiterpenos (C_{15}), que originam alguns fitormônios como o ácido abscísico (ABA) e a estrigolactona (AL-BABILI; BOUWMEESTER, 2015); os diterpenos (C_{20}), que formam o hormônio giberelina (GA), o fitol presente na clorofila e estão presentes nas resinas em pinus (CHEN et al., 2011; ZI et al., 2014); os triterpenos (C_{30}), que fazem parte da composição dos hormônios brassinosteroides, dos esteroides (lipídios) presentes nas membranas vegetais e as saponinas relacionadas à defesa aos insetos (VRIET et al., 2013; ZHOU et al., 2015); os tetraterpenos (C_{40}), que originam os carotenoides, pigmentos fotossintético, presentes em cenoura, morango com propriedades antioxidantes (PICHERSKY; RAGUSO, 2018); os poliisoprenos (C_n) possuem mais de 40 carbonos em sua composição e são encontrados no látex da borracha, presente nas seringueiras (Figura 1. QU et al., 2015).

Figura 1. Estruturas químicas de exemplos de isoprenoides.



Fonte: Adaptado de Pichersky e Raguso (2018).

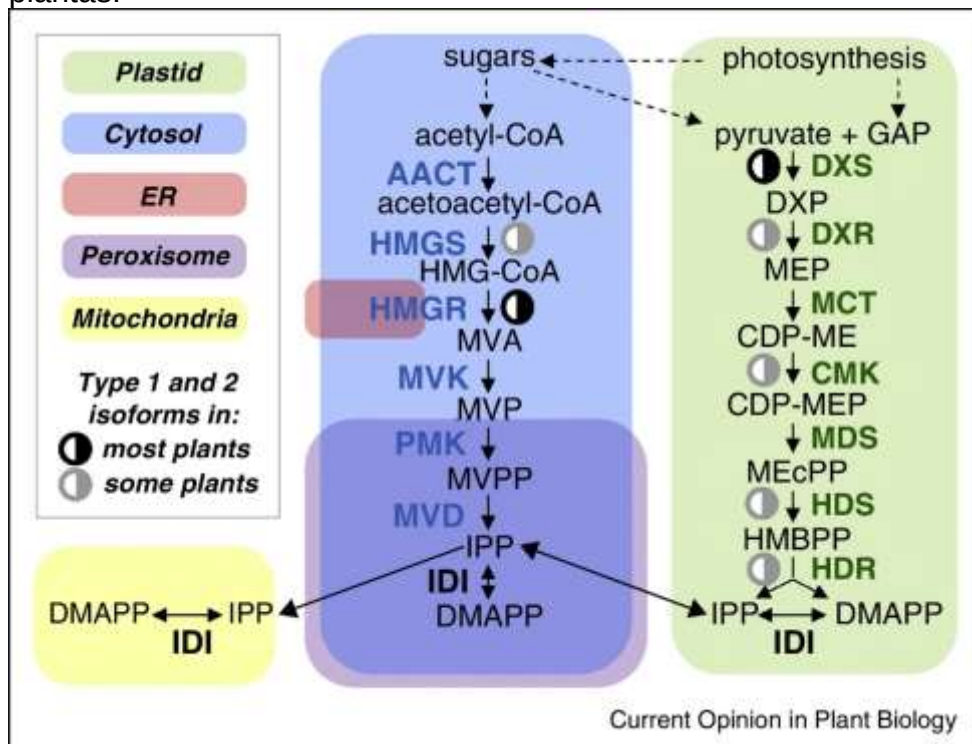
A formação dos variados tipos de isoprenoides pode ocorrer por duas rotas metabólicas: a via do ácido mevalônico (MVA), que ocorre predominantemente no citosol e a via metileritritol 4-fosfato (MEP), que ocorre nos plastídios (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONAT, 2015). As duas vias são distintas e compartimentadas separadamente para construir unidades de isopreno (HEMMERLIN et al., 2012). A coexistência dessas vias no citosol e nos plastídios pode permitir a síntese de muitos tipos de isoprenoides essenciais para um organismo sésil como as plantas, além disso as duas vias podem estar ativas em paralelo ou separadamente (HEMMERLIN et al., 2012). Por exemplo, a via MVA produz terpenos que estão diretamente relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal, e a via MEP está relacionada aos pigmentos que realizam a fotossíntese, estas funções podem ser realizadas por ambas as vias em paralelo ou ativadas separadamente dependendo da necessidade fisiológica vegetal (HEMMERLIN et al., 2012).

Assim, o início da via MVA (Figura 2) se dá pela enzima AACT (Acetoacetyl-CoA tialose) responsável pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando uma molécula intermediária, a acetoacetyl-CoA. Em seguida, a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMGS) realiza a condensação de uma molécula de acetoacetyl-CoA com uma molécula de acetil-CoA, formando o 3-hidroxi-3-metil-

glutaril-CoA (HMG-CoA). A enzima HMG-CoA redutase (HMGR) reduz a molécula de HMG-CoA e a converte em ácido mevalônico (MVA) a partir da oxidação de duas moléculas de NADPH. As enzimas mevalonato quinase (MVK), fosfomevalonato quinase (PMK) e mevalonato difosfato descarboxilase (MVD) realizam a conversão de MVA em isopentenil difosfato (IPP). A MVK fosforila o MVA, com o consumo de ATP, e produz o fosfomevalonato (MVP) e adenosina trifosfato (ADP). Em seguida, a PMK catalisa a fosforilação de MVP a partir de ATP, produzindo difosfato de mevalonato (MVPP) e ADP. Finalmente, a MVD catalisa uma reação descarboxilativa, e elimina um grupo carboxila do mevalonato com a hidrólise de ATP, formando o IPP. Posteriormente, o IPP é convertido em dimetilalil difosfato (DMAPP) pela enzima isopentenil difosfato isomerase (IDI) e, em seguida, são biossintetizados os sesquiterpenos e triterpenos, específicos da via MVA (THOLL et al., 2011; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONAT, 2015; ZHOU; PICHERSKY, 2020).

No início da via MEP (Figura 2) a enzima 1-Desoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS) é responsável pela condensação de gliceraldeído 3-fosfato (GAP) e piruvato, para produzir uma molécula 1-Desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP). Em seguida, a enzima DXP redutoisomerase (DXR) catalisa a conversão de DXP em 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), por uma redução utilizando uma molécula de NADPH. A enzima MEP citidiltransferase (MCT) então catalisa a reação de conversão do MEP à 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME). A enzima CDP-ME quinase (CMK) é responsável, em seguida, pela reação de fosforilação de CDP-ME com o consumo de ATP, e produz a molécula 4- difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato (CDP-MEP) e ADP. A enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (MDS) converte CDP-MEP à 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP) e CMP. A enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintase (HDS) catalisa a conversão de MEcPP em 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato (HMBPP) com a oxidação de um NADPH. Logo depois, a enzima HMBPP reductase (HDR) é responsável pela reação de redução da HMBPP em IPP e/ou DMAPP com oxidação de um NADPH. IPP e DMAPP são as moléculas precursoras da biossíntese dos monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos, específicos da via MEP (THOLL et al., 2011; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONAT, 2015; ZHOU; PICHERSKY, 2020).

Figura 2. Via de biossíntese de isoprenoides citosólica (MVA) e plastídica (MEP) em plantas.



As enzimas da via MVA são mostradas em azul e as enzimas da via MEP em verde. As setas marcam as etapas das vias. AACT, acetoacetyl-CoA tialose. HMGS, HMG-CoA sintase. HMGR, HMG-CoA redutase. MVA, ácido mevalônico. MVK, mevalonato quinase. MVP, fosfomevalonato. PMK, fosfomevalonato quinase. MVPP, difosfato mevalonato. MVD, mevalonato difosfato descarboxilase. IPP, isopentenil difosfato. DMAPP, dimetilalil difosfato. GAP, gliceraldeído 3-fosfato. DXS, DXP sintase. DXP, 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato. DXR, DXP redutoisomerase. MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato. MCT, MEP citidiltransferase. CDP-ME, 4- difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol. CMK, CDP-ME quinase. CDP-MEP, 4- difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2-fosfato. MDS, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase. MEcPP, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato. HDS, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintase. HMBPP, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato. HDR, HMBPP reductase. Fonte: Rodríguez-Concepción e Boronat (2015).

1.2. A importância dos genes *HMGR* e *DXS*

Os genes que codificam as enzimas *HMGR* e *DXS* são considerados genes chave para a regulação da biossíntese de isoprenoides e essenciais para as vias MVA e MEP (LI et al., 2014; PAN et al., 2019). Por exemplo, em *Artemisia annua*, gene chave *HMGR* apresentou maiores níveis de atividade transcricional em folha jovem e flor comparado aos níveis vistos em folhas velhas, caule e raízes (OLOFSSON et al., 2011), o que demonstra que a via MVA está ativa no desenvolvimento dos tecidos da planta jovem. Além do elevado número de transcritos detectados para esse gene, análises evolutivas sugeriram que a função de *HMGR* são conservadas em todo o reino vegetal (LI et al., 2014), isso mostra que *HMGR* na via MVA permanece com as mesmas funções na biossíntese de terpenos.

A expressão gênica de *DXS* foi caracterizada em *Oryza sativa*, e observou-se um elevado número de transcritos em folhas, sugerindo que esse gene tem função relevante nos tecidos fotossintéticos (YOU et al., 2020). Análises realizadas em linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* mostraram que a indução na expressão do gene *DXS*, aumentou os níveis de compostos derivados de moléculas de isoprenos, como por exemplo, clorofila, tocoferol, carotenoides, ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA) (CARRETERO-PAULET et al., 2013). Os mesmos autores observaram que o oposto ocorreu quando os níveis de *DXS* foram suprimidos, houve uma redução na quantidade desses mesmos compostos.

1.2. A importância dos genes *MVK* e *DXR*

Os genes *MVK* e *DXR* também são considerados genes importantes na via de biossíntese de isoprenoides (THOLL, 2015). Entretanto, diferentemente de outros genes dessa via, estas enzimas são codificadas por genes de cópia única em *Arabidopsis thaliana* (HEMMERLIN et al., 2012), mostrando que o gene não precisa de mais outras cópias pra realizar suas funções nas vias de terpenos.

A atividade da *MVK* está envolvida na regeneração e crescimento das plantas, e também está relacionada ao rebrote e formação de raízes em *Pinus strobes* (HEMMERLIN et al., 2012). A *DXR* também é uma enzima importante envolvida na biossíntese de terpenóides pela via plastídica do MEP, ela catalisa a segunda etapa da biossíntese dos terpenóides no cloroplasto (THOLL, 2015). A inativação de *DXR* resulta na parada do desenvolvimento e plantas albinas em *Arabidopsis* (XING et al., 2010).

As algas, plantas basais e superiores são capazes de sintetizar simultaneamente terpenoides pelas vias MEP e MVA em paralelo. A manutenção da presença dos genes de terpenoides em plantas indica que estes compostos provavelmente proporcionaram vantagens evolutivas para as espécies vegetais mais antigas e foram mantidas ao longo da evolução (KUMARI et al., 2013). Desta forma, o estudo sobre a evolução torna-se interessante para essas famílias gênicas (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONAT, 2015). A duplicação de genes, mutação e seleção natural são processos essenciais que aumentam a diversidade genética das plantas e podem facilitar a sua adaptação entre a planta e o ambiente (PANCHY et al., 2016; QIAO et al., 2019).

A análise evolutiva de genes específicos destas vias, ainda é incipiente e necessita de estudos mais aprofundados, especialmente em cafeeiros (PICHERSKY; RAGUSO, 2018). Apesar de ter sido estudados em plantas modelos, dado o grande número de terpenoides especializados produzidos por várias espécies vegetais, as principais funções da grande maioria dos genes envolvidos nestas vias ainda não foram bem determinadas para o gênero *Coffea* spp. Os estudos filogenéticos são importantes para uma compreensão dos processos evolutivos que moldaram o metabolismo de isoprenoides em cafeeiro.

1.3. Os isoprenoides no gênero *Coffea* spp

O gênero *Coffea* (Rubiaceae) possui grande importância alimentar e agrônômica (FAOSTAT, 2017). Embora existam 124 espécies descritas para esse gênero (DAVIS et al., 2011), apenas duas possuem maior interesse econômico: *C. canephora* e *C. arabica*. A espécie *C. canephora* é diploide e apresenta 22 cromossomos ($2n = 2x = 22$), enquanto que a *C. arabica* é alotetraploide e possui 44 cromossomos ($2n = 4x = 44$). *C. arabica* provavelmente originou-se de uma hibridização natural que ocorreu entre *C. canephora* e *C. eugenioides* no continente africano (LASHERMES et al., 1999; LASHERMES et al., 2016). Nos últimos anos, a sequência dos genomas de *C. canephora* (DENOEUDE et al., 2014), *C. arabica* (NCBI SRA *accession number* PRJNA497895) e *C. eugenioides* (NCBI SRA *accession number* PRJNA497891) passou a ser disponível em bancos de dados públicos, trazendo uma oportunidade única de estudos bioquímicos, evolutivos e genômicos.

Por exemplo, os estudos bioquímicos relacionados aos lipídios (triterpeno formado a partir da via MVA) são de grande interesse para a qualidade do grão em

cafeeiro (PEREIRA; IVAMOTO, 2015). Os lipídios representam aproximadamente 10-20% de os compostos químicos totais que são encontrados em *Coffea arabica* (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; PEREIRA; IVAMOTO, 2015). Os lipídios desempenham um papel importante na qualidade da bebida quanto ao sabor e aroma, principalmente por causa da hidrólise de triglicerídeos e o liberação de ácidos graxos que são oxidados e inferem sabores característicos para bebidas de café (CZECH, et al., 2016; MAHMUD; SHELLIE; KEAST, 2020).

Os estudos moleculares sobre a via de isoprenoides no gênero *Coffea* ainda é incipiente. Um estudo anterior avaliou o gene *CaHMGR1* em *C. arabica* e observou atividade transcricional em folha, botão floral, polpa e no início do desenvolvimento do perisperma (TISKI et al., 2011). Genes relacionados a biossíntese de monoterpenos em café já foram funcionalmente validados para a via MVA (DEL TERRA et al., 2013). Os níveis transcricionais dos genes das vias dos isoprenoides (MVA e MEP) já foram estudados em cafeeiros utilizando dados de sequenciamento em larga escala de RNAs mensageiros (RNA-seq), sem genoma de referência, e foi observado que esses genes apresentavam diferentes padrões de expressão de acordo com o órgão e tecido de *C. arabica* analisado (PEREIRA; IVAMOTO, 2015). Quantificações bioquímicas e de atividade transcricional de genes relacionados com a biossíntese de diterpenos em *C. arabica*, em diferentes órgãos e tecidos de cafeeiro, demonstraram que existe uma modulação genética envolvida na produção desses compostos (KITZBERGER et al., 2013; IVAMOTO et al., 2017). Porém, ainda é necessário que mais estudos sejam realizados para definir um número mais preciso de cópias existentes para cada um dos genes das vias MVA e MEP, agora que são disponíveis dados do genoma completo. A realização de análises evolutivas e a determinação do perfil transcricional desses genes nas espécies que deram origem a espécie *C. arabica* (*C. canephora* e *C. eugenoides*) irão aumentar o conhecimento sobre os processos evolutivos que possivelmente moldaram o metabolismo de isoprenoides em cafeeiros.

1.4. A utilização de elicitores para a indução da biossíntese de compostos especializados

Atualmente, sabemos que elicitores podem induzir a produção de terpenoides (ARANEGABOU et al., 2014; MANIVANNAN et al., 2016). Os elicitores são compostos orgânicos produzidos pelas plantas ou animais que atuam como um sistema de alerta da planta (ex: fitormônios) para induzir compostos relacionados a defesa contra

predadores ou patógenos (FINITI et al., 2014). Os elicitores também podem ser sintetizados artificialmente e aplicado na planta, e agem como sinalizadores celulares (ARANEGABOU et al., 2014). O ácido hexanoico ($C_6H_{12}O_2$), derivado do hexano, é reconhecido como elicitador (SCALSCHI et al., 2013). Estudos realizados em *Arabidopsis* e tomateiros mostram que o ácido hexanoico (Hx) pode proteger as duas espécies vegetais contra o fungo *Botrytis cinerea* (VICEDO et al., 2009; KRAVCHUK et al., 2011). Além disso, já foi observado que o Hx pode atuar na indução de vias da produção de terpenoides, contribuindo com o aumento da expressão de genes de terpenoides em órgãos de *Citrus* e cafeeiro. (LLORENS et al., 2016; SILVA et al., 2020).

1.5. Referencial bibliográfico

ARANEGA-BOU, Paz et al. Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 488, 2014.

CARRETERO-PAULET, Lorenzo et al. Functional and evolutionary analysis of DXL1, a non-essential gene encoding a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase like protein in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, v. 524, n. 1, p. 40-53, 2013.

CZECH, Hendryk et al. Resolving coffee roasting-degree phases based on the analysis of volatile compounds in the roasting off-gas by photoionization time-of-flight mass spectrometry (PI-TOFMS) and statistical data analysis: toward a PI-TOFMS roasting model. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 25, p. 5223-5231, 2016.

DAVIS, Aaron P. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357-377, 2011.

DENOEU, France et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n.6201, p.1181-1184, 2014.

DEL TERRA, Lorenzo et al. Functional characterization of three *Coffea arabica* L. monoterpene synthases: Insights into the enzymatic machinery of coffee aroma. **Phytochemistry**, v. 89, p. 6-14, 2013.

FAOSTAT. Exports/Commodities by Country. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/TP>

FINITI, Ivan et al. Hexanoic acid protects tomato plants against *Botrytis cinerea* by priming defence responses and reducing oxidative stress. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 6, p. 550-562, 2014.

GALATA, Mariana; MAHMOUD, Soheil. Bioactive plant isoprenoids: Biosynthetic and biotechnological approaches. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, v.37, p. 135-171, 2012.

HEMMERLIN, Andréa; HARWOOD, John L.; BACH, Thomas J. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 95-148, 2012.

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, 2017.

KITZBERGER, Cíntia Sorane Good et al. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2013.

KRAVCHUK, Zhana et al. Priming for JA-dependent defenses using hexanoic acid is an effective mechanism to protect Arabidopsis against *B. cinerea*. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 4, p. 359-366, 2011.

KUMARI, Sangita et al. Structural and biochemical perspectives in plant isoprenoid biosynthesis. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 2, p. 255-291, 2013.

LASHERMES, Philippe et al. Inter-genomic DNA exchanges and homeologous gene silencing shaped the nascent allopolyploid coffee genome (*Coffea arabica* L.). **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 6, n. 9, p. 2937-2948, 2016.

LASHERMES, Philippe et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, v. 261, n. 2, p. 259-266, 1999.

LI, Wei et al. Species-specific expansion and molecular evolution of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) gene family in plants. **PloS One**, v. 9, n. 4, 2014.

LLORENS, Eugenio et al. Priming by hexanoic acid induce activation of mevalonic and linolenic pathways and promotes the emission of plant volatiles. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 495, 2016.

MANIVANNAN, Abinaya et al. Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 399, 2016.

MAHMUD, MM Chayan; SHELLIE, Robert A.; KEAST, Russell. Unravelling the relationship between aroma compounds and consumer acceptance: Coffee as an example. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 5, p. 2380-2420, 2020.

OLOFSSON, Linda et al. Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 45, 2011.

PANCHY, Nicholas; LEHTI-SHIU, Melissa; SHIU, Shin-Han. Evolution of gene duplication in plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 4, p. 2294-2316, 2016.

PAN, Xuhao et al. Bioinformatics study of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) genes in Solanaceae. **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 5175-5184, 2019.

PEREIRA, Luiz Filipe Protasio; IVAMOTO, Suzana Tiemi. **Characterization of Coffee Genes Involved in Isoprenoid and Diterpene Metabolic Pathways**. In: Coffee in health and disease prevention. Academic Press, 2015. p. 45-51.

PICHERSKY, Eran; RAGUSO, Robert A. Why do plants produce so many terpenoid compounds? **New Phytologist**, v. 220, n. 3, p. 692-702, 2018.

QU, Yang et al. A lettuce (*Lactuca sativa*) homolog of human Nogo-B receptor interacts with cis-prenyltransferase and is necessary for natural rubber biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 1898-1914, 2015.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, Manuel; BORONAT, Albert. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. **Current Opinion in Plant biology**, v. 25, p. 17-22, 2015.

SCALSCHI, Loredana et al. Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 4, p. 342-355, 2013.

SILVA, Natacha et al. Low-Copy Genes in Terpenoid Metabolism: The Evolution and Expression of *MVK* and *DXR* Genes in Angiosperms. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 525, 2020.

SPEER, Karl; KÖLLING-SPEER, Isabelle. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TISKI, Iris et al. Characterization and expression of two cDNA encoding 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoforms in coffee (*Coffea arabica* L.). **Omics: a journal of integrative biology**, v. 15, n. 10, p. 719-727, 2011.

THOLL, Dorothea. **Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants**. In: Biotechnology of isoprenoids. Springer International Publishing Switzerland, v. 148, p.63-106, 2015.

THOLL, Dorothea; LEE, Sungbeom. **Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana***. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, v. 9, 2011.

VICEDO, Begonya et al. Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 11, p. 1455-1465, 2009.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O atual estudo apresentou informações e dados fundamentais para as futuras pesquisas, que ainda são incipientes em termos da genômica evolutiva e a biologia molecular das vias de isoprenoides em *Coffea*.

Ao identificar os genes e as cópias codificantes das enzimas dos passos iniciais da via MVA e MEP em *C. arabica* mostrou-se um maior embasamento sobre os genes responsáveis pela produção e a diversidade de terpenoides. Os levantamentos genicos poderão ser utilizados como dados comparativos para futuras pesquisas sobre terpenoides em angiospermas. Porém, nossas análises ainda levantam a necessidade de mais estudos sobre silenciamento dos quatros genes caracterizando o impacto que possivelmente poderia ter sobre o fenótipo e a produção de terpenóides em cafeeiro ou em plantas modelos.

Os estudos evolutivos dos genes-chave das vias de isoprenoides *HMGR*, *DXS*, *MVK* e *DXR* reforçam que estes genes são importantes na manutenção das funções enzimáticas de plantas.

O elicitor Hx poderá ser utilizado em futuros trabalhos, pois apresenta um potencial modulador do padrão transcricional dos genes iniciais das vias MVA e MEP, principalmente em folhas e raízes.

Por fim, o estudo genômico evolutivo e a biologia molecular de *Coffea* gera maior compreensão sobre o metabolismo de isoprenoides e a relação que integra a diversidade de terpenos e suas funções com o meio ambiente.