

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**FÁBIO EDUARDO SEVERINO**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA  
UMA ISOFLAVONA REDUTASE LIKE DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)  
E ANÁLISE DE SUA REGIÃO PROMOTORA.**

**BOTUCATU – SP**

**2008**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA  
UMA ISOFLAVONA REDUTASE LIKE DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)  
E ANÁLISE DE SUA REGIÃO PROMOTORA.**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade Estadual  
Paulista - Botucatu (SP), para a obtenção do  
Título de Mestre em Ciências Biológicas,  
Área de Concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

**BOTUCATU – SP**

**2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Severino, Fábio Eduardo.

Isolamento e caracterização de um gene que codifica uma isoflavona redutase like de café (*Coffea arabica* L.) e análise de sua região promotora / Fábio Eduardo Severino. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Assunto CAPES: 20203004

1. Café - Cultivo - Melhoramento genético 2. Genética vegetal

CDD 581.15

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., Estress; Isoflavona Redutase Like, PCR em tempo real, Promotor órgão/tecido específico

A todos, que tornaram  
possível a realização desse projeto

## Agradecimientos

Especialmente aos meus pais, Sílvio e Sônia Severino pela confiança, apoio e compreensão.

Ao meu ilustríssimo orientador Dr. Ivan de Godoy Maia, pelo voto de confiança, ensinamentos prestimosos e toda ajuda cedida desde o primeiro momento.

A Dra. Mirian Perez Maluf, ao Dr. Marcos Brandalise e a todos do Centro de Café “Alcides Carvalho” no IAC pela colaboração essencial na execução deste trabalho.

Aos pós-graduandos: Roberto, Regiane, Akemi, Negin, Rodrigo, Edmárcia, Carla, Marcelo, Júlio, Vanusa e ao pós-doc Antônio, pela amizade e pelos conselhos. E um agradecimento particular ao doutorando Flávio pelo auxílio inefável dentro do laboratório.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Genética e do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, a EMBRAPA – Café, a FAPESP e a CAPES pelo auxílio financeiro as pesquisas e pela bolsa de estudo.

## Sumário

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xiii
Resumo.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Taxonomia e genética do cafeeiro.....	2
1.2. Importância.....	3
1.3. A ferrugem alaranjada do cafeeiro.....	5
1.4. A biotecnologia e o café.....	7
1.5. Promotores.....	11
1.6. Os fenilpropanóides.....	13
1.7. A Isoflavona Redutase-Like específica de folhas de <i>C. arabica</i> e sua seqüência promotora.....	18
2. Objetivos.....	20
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Material vegetal.....	23
3.2. Extração de RNA total de café e tabaco.....	23
3.3. Quantificação do RNA e síntese de cDNA.....	24
3.4. Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real.....	25
3.5. Extração de DNA genômico de tabaco.....	27
3.6. Amplificação da região 3' do cDNA que codifica uma IRL em café	

pelo método 3' RACE.....	28
3.7. Isolamento, purificação e clonagem da região 3' do cDNA da IRL de café.....	29
3.8. Minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina e seqüenciamento do inserto.....	30
3.9. Análise das seqüências, identificação de sítios regulatórios e filogenia.....	33
3.10. Construção do cassete de expressão em pCAMBIA-1381z.....	34
3.11. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4044 por choque térmico.....	36
3.12. Obtenção de plantas transgênicas de tabaco.....	37
3.13. Análise dos transformantes via PCR e ensaio enzimático de GUS.....	38
3.14. Ensaios de agroinfiltração.....	39
3.15. Análise da expressão do gene repórter <i>uidA</i> em plantas transgênicas transformadas com os cassetes de expressão para as duas versões do promotor específico de folha em resposta a estresse abiótico (dano mecânico).....	40
3.16. Análise da expressão do gene <i>IRL</i> de café em resposta a estresse biótico (infecção por fungo) e a estresse abiótico (dano mecânico).....	41
4. Resultados.....	44
4.1. Caracterização do cDNA que codifica uma Isoflavona Redutase-Like específica de folha em café.....	45

4.2. Análise filogenética da <i>CaIRL</i> .....	47
4.3. Análise da expressão relativa do gene <i>CaIRL</i> em folhas de café em resposta a estresse biótico (infecção por fungo).....	49
4.4. Análise da expressão relativa do gene <i>CaIRL</i> em folhas de café em resposta a estresse abiótico (dano mecânico).....	50
4.5. Análise funcional da versão reduzida do promotor do gene <i>CaIRL</i> em folhas de tabaco transformadas por agroinfiltração.....	52
4.6. Análise das plantas de tabaco transgênicas transformadas com o cassete contendo a versão reduzida do promotor <i>CaIRL</i> específico de folha.....	53
4.7. Análise da expressão relativa do gene repórter <i>uidA</i> em folhas de tabaco transgênico transformadas com o cassete contendo a versão maior do promotor <i>CaIRL</i> em resposta a estresse abiótico (dano mecânico).....	56
4.8. Análise da expressão relativa do gene repórter <i>uidA</i> em folhas de tabaco transgênico transformadas com o cassete contendo a versão menor do promotor <i>CaIRL</i> em resposta a estresse abiótico (dano mecânico).....	58
4.9. Comparação da expressão relativa do gene repórter <i>uidA</i> em folhas de tabaco transgênico entre as duas versões do promotor <i>CaIRL</i> e o promotor <i>CaMV 35S</i> .....	59
4.10. Elementos <i>cis</i> -regulatórios ausentes na versão reduzida do promotor <i>CaIRL</i> de café.....	60

5. Discussão.....	63
5.1. O gene <i>CaIRL</i> com expressão específica em folhas de café é induzido por estresse biótico e a abiótico.....	64
5.2. Relacionamento filogenético da <i>CaIRL</i> específica de folhas de café com outras redutases.....	67
5.3. Análise funcional das regiões promotoras do gene <i>CaIRL</i> em plantas transgênicas de tabaco e caracterização dos elementos regulatórios.....	69
6. Conclusão.....	74
7. Referências.....	76
8. Apêndice.....	89
8.1. Apêndice A – Lista com as abreviaturas das proteínas e número de acessos ao banco de dados do NCBI usados na árvore filogenética das IRLs.....	90

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Via biossintética dos mais importantes flavonóides derivados em leguminosas.....	14
<b>Figura 2</b> – A reação enzimática catalizada pela IFR de <i>M. sativa</i> .....	17
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA 1381z (Cambia, Austrália) utilizado na construção dos cassetes de expressão para agroinfiltração e transformação estável de tabaco empregando <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	35
<b>Figura 4</b> – Seqüência completa do cDNA que codifica uma IRL de <i>Coffea arabica</i> (denominado <i>CaIRL</i> ) e os respectivos aminoácidos deduzidos.....	46
<b>Figura 5</b> – Relações filogenéticas da proteína IRL de <i>Coffea arabica</i> e outras redutases de várias plantas.....	48
<b>Figura 6</b> – Expressão relativa do gene <i>CaIRL</i> em folhas de café inoculadas com o fungo <i>H. vastatrix</i> por um período de 24 horas.....	50
<b>Figura 7</b> – Expressão relativa do gene <i>CaIRL</i> em folhas de café submetidas a dano mecânico por período de 12 horas.....	51
<b>Figura 8</b> – Ensaio histoquímico da atividade da $\beta$ -glucuronidase nos discos foliares de tabaco, agroinfiltrados com o cassete de expressão contendo o gene <i>uidA</i> sob controle da versão menor do promotor do gene <i>CaIRL</i> (A e B) e respectivo controle (C), após 72 horas.....	53
<b>Figura 9</b> – Análise de PCR genômico e ensaio histoquímico da atividade da	

β-glucuronidase em folhas de tabaco transformadas com o cassete de expressão contendo o gene <i>uidA</i> sob o controle da versão menor do promotor do gene <i>CaIRL</i> .....	55
<b>Figura 10</b> – Expressão relativa do gene <i>uidA</i> em folhas de tabaco transformado com a versão maior do promotor <i>CaIRL</i> , submetidas a dano mecânico por um período de 24 horas.....	57
<b>Figura 11</b> – Esquema de localização do TATA-box e dos elementos W-Box ao longo da região promotora do gene <i>CaIRL</i> obtida por análise comparativa com o banco de dados do PLACE.....	61
<b>Figura 12</b> – Localização dos principais elementos regulatórios encontrados na região deletada (470 pb) na construção da versão reduzida do promotor do gene <i>CaIRL</i> .....	62

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Descrição dos oligonucleotídeos usados no trabalho.....43

## Resumo

Sendo o café (*Coffea arabica*) um dos mais importantes produtos agrícolas do mundo, o segmento cafeeiro é de grande relevância para o Brasil, que é o seu maior produtor mundial. Doenças e pragas reduzem consideravelmente a produtividade da cultura e conseqüentemente, as margens de lucro. Nesse contexto, a disponibilidade de promotores tecido-específicos, responsáveis pela regulação de genes responsivos a estresses bióticos e abióticos, constitui uma ferramenta fundamental para os programas de melhoramento genético do café visando o incremento de resistência. Pensando nisso, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização de um gene que codifica uma *Isoflavona Redutase-Like* em café (*CaIRL*), cuja expressão é específica em folha e induzida por estresses, bem como do seu promotor. Para tal, um cDNA cobrindo toda a região codificadora do gene *CaIRL* foi obtido por 3'RACE e sua seqüência determinada. Uma análise filogenética foi empreendida e mostrou que a *CaIRL* representa uma nova redutase específica de café. A quantificação da expressão desse gene em folhas de café, via PCR em tempo real, revelou que mesmo é rápida e fortemente induzido pelo fungo da ferrugem alaranjada do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) e por danos mecânicos realizados no limbo foliar. Uma análise de deleção do promotor *CaIRL* em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgênicas demonstrou que a versão integral desse promotor (0.9 kb) é capaz de garantir uma expressão basal do gene repórter, sendo a mesma induzida por estresse mecânico. Por outro lado, uma expressão bastante reduzida do gene repórter, e não mais induzida por estresse mecânico, foi observada nas plantas transformadas com a versão menor do promotor (0.4 kb). A atividade do promotor *CaIRL* foi portanto bastante afetada pela

deleção efetuada, e uma possível explicação para esse fato está na ausência de elementos *cis*-regulatórios do tipo W-box na versão menor.

## 1. Introdução

## 1.1. Taxonomia e genética do cafeeiro

O cafeeiro (família Rubiaceae) é uma planta perene, dicotiledônea, de porte arbustivo ou arbóreo. O gênero *Coffea* L. compreende mais de 100 táxons já identificados, incluindo as duas espécies de importância econômica: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Charrier & Berthaud, 1985). Todas as espécies de *Coffea* são nativas das florestas intertropicais da África, Madagascar, e Ilhas do Oceano Índico. Estudos filogenéticos indicam que a espécie *C. arabica* é originária dos platôs centrais da Etiópia, endêmica dessa região e provavelmente descendente de um cruzamento recente entre *Coffea eugenoides* e *Coffea canephora* (Cros *et al.*, 1998; Lashermes *et al.*, 1999).

A alta qualidade na bebida está associada com a espécie *C. arabica*, a qual representa 75% da produção mundial de café. *C. arabica* é a única espécie tetraplóide ( $2n = 4x = 44$ ) no gênero enquanto as outras espécies são diplóides ( $2n = 2x = 22$ ). Apesar do pouco tempo de divergência entre seus dois genomas constituintes, *C. arabica* apresenta comportamento meiótico como de um diplóide normal (Lashermes *et al.*, 2000 a, b).

Adicionalmente, *C. arabica* caracteriza-se por sua baixa diversidade genética e a transferência de traços desejados de espécies diplóides aparentadas tem sido uma prioridade contínua nos cruzamentos do café (Carvalho, 1988; Van der Vossen, 2001). Hibridizações interespecíficas em plantas são um meio comum de aumentar a gama de variação buscando

fenótipos favoráveis que apresentem resistência a doenças e pragas, tolerância à seca e outras alterações ambientais, através das espécies parentais. Aspectos associados à dissimilaridade poliploidica, e a ploidia entre as espécies, podem resultar em barreiras intransponíveis ao fluxo gênico (Rieseberg *et al.*, 2000). Em um programa de melhoramento clássico do cafeeiro são necessários ciclos sucessivos de cruzamento e seleção até que se consigam genótipos superiores. Para assegurar a fidelidade através de propagação por sementes, seis ciclos de autofecundação são requeridos. Considerando um ciclo por hibridização e seleção, e seis ciclos para homozigose das sementes, um programa clássico de melhoramento delongaria 28 anos (Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

Por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, o melhoramento genético do cafeeiro é lento, sendo necessária à implementação de técnicas que facilitem e acelerem a obtenção, seleção e avaliação de materiais superiores.

## **1.2. Importância**

Atualmente o café é a segunda maior “commodities” do mundo, perdendo apenas para a do petróleo. Movimentando anualmente 91 bilhões de dólares, emprega direta ou indiretamente meio bilhão de pessoas ao redor do globo, ou seja, 8% da população mundial.

Sendo o café um dos mais importantes produtos agrícolas do mundo, o segmento cafeeiro é de grande relevância para o Brasil, que é o seu maior produtor mundial, sendo responsável por mais de um terço de sua produção e exportação, alcançando a marca de 33,7 milhões de sacas de café beneficiado para a safra 2007/2008 (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2008). Desse total, 69,6% (23,5 milhões de sacas) são de arábica e 30,4% (10,3 milhões de sacas) são de robusta. O parque cafeeiro em produção, em nosso país, ocupa uma área de 2,3 milhões de hectares, empregando sete milhões de trabalhadores de forma direta ou indireta, com um faturamento de 3,9 bilhões de dólares em 2007.

Entretanto, doenças e pragas são altamente limitantes à produção cafeeira. Segundo Hein & Gatzweiler (2005) o nematóide de raiz do gênero *Meloidogyne* ataca uma grande variedade de culturas ao redor do mundo, incluindo o café, onde causa uma perda de 12% de produtividade na colheita apenas na América do Sul. A ferrugem do café, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é a mais importante doença que acomete o cafeeiro no mundo, levando a perdas de aproximadamente 13% na colheita (dados para a América do Sul). Devido ao grande número de raças diferentes de *H. vastatrix*, o controle da doença torna-se ainda mais difícil, mesmo com cruzamento entre variedades resistentes, nos programas de melhoramento.

### 1.3. A ferrugem alaranjada do cafeeiro

A ferrugem alaranjada do cafeeiro tem como seu agente etiológico o fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., espécie descrita originalmente por Berkeley, para um tipo de ferrugem encontrada nos cafeeiros do Sri Lanka em 1869. Ela ocorre em todas as regiões produtoras de café no Brasil, desde 1970, e na América Central.

Atualmente, existem mais de 40 raças fisiológicas do fungo que atacam os cafeeiros, sendo que no Brasil foram descritas 17 raças (Costa *et al.*, 2007). Entre estas, a raça II predomina nos cafeeiros brasileiros. O fungo ataca todas as variedades de café, porém, dentro do gênero *C. canephora* são encontrados alguns cultivares com resistência, enquanto que a maioria dos cultivares comerciais dentro da espécie *C. arabica* é susceptível à doença.

Os primeiros sintomas da enfermidade correspondem a pequenas manchas circulares de cor amarelo-laranja, com diâmetro de 0,5 cm, que aparecem na face inferior da folha. Sobre a mancha forma-se uma massa pulverulenta de uredósporos. Nos estágios mais avançados, algumas partes do tecido foliar são destruídas e necrosadas, conduzindo a desfolha. A queda precoce das folhas resulta em menor vingamento da florada, menor vingamento dos chumbinhos e também seca dos ramos plagiotrópicos, comprometendo, em alguns casos, mais de 50% da produção do cafeeiro (Garçon *et al.*, 2004).

A solução parcial para o problema estaria na aplicação de fungicidas como agentes defensivos na lavoura cafeeira. Entretanto, é preciso ter sempre em mente os prejuízos potenciais associados a tais medidas, tais como o aumento do custo final da produção e a intoxicação do solo, frutos e trabalhadores rurais. Sem contarmos é claro, com o surgimento de novas raças de fungos resistentes, selecionadas pelos fungicidas usados de forma indiscriminada.

Uma maneira interessante de luta contra tais patógenos envolve a ativação do sistema de defesa natural das plantas. O sistema de defesa contra patógenos é formado por uma combinação de respostas constitutivas e induzidas. Quando sob infecção, vias de transdução de sinais específicos são ativadas, resultando na expressão de uma variedade de respostas, as quais incluem a morte celular programada (resposta hipersensitiva, HR). A HR geralmente dispara um sistema secundário para defender as partes saudáveis da planta, que confere resistência contra patógenos virulentos. Este fenômeno é conhecido como resistência adquirida sistêmica (SAR), o qual se caracteriza pela dispersão de substâncias químicas que atuam contra fungos, bactérias e vírus (Ryals *et al.*, 1996; De Nardi *et al.*, 2006).

Essas substâncias são codificadas por genes cuja expressão é induzida por patógenos, os quais possuem tanto uma hierarquia temporal como espacial na sua ativação. Alguns desses têm uma rápida ativação localizada no sítio da infecção, enquanto outros são mais lentamente ativados localmente e/ou sistematicamente. As diferenças encontradas nos padrões de expressão dos genes ativados por patógenos resultam, entre outros fatores, da arquitetura dos

promotores; esses promotores não possuem um padrão regular no número, ordem ou tipo de sítios regulatórios. Apesar da diferença na arquitetura, análises funcionais das regiões promotoras de alguns desses genes estão levando os pesquisadores a algumas descobertas elucidativas no que diz respeito à interação do DNA com as proteínas transcricionais (Babu *et al.*, 2006). Como exemplo, poderíamos citar aqui os genes ativados por patógenos em *C. arabica*, os quais são rapidamente induzidos pela infecção do fungo *H. vastatrix* em folhas de café (Fernandez *et al.*, 2004).

#### **1.4. A Biotecnologia e o café**

A obtenção de plantas geneticamente modificadas com genes de interesse agrônomico, tais como aqueles envolvidos na resistência a pragas ou doenças, vem ganhando cada vez mais espaço entre os cultivares convencionais. Mediante técnicas de engenharia genética, material genético advindo de outras espécies pode ser incorporado numa planta alvo de interesse. A principal implicação da transgênia é a quebra da barreira sexual entre diferentes espécies, permitindo cruzamentos impossíveis de ocorrerem naturalmente. Atualmente é possível realizar transferências de DNA exógeno em plantas, de modo que o DNA inserido venha a ser expresso em um tecido particular e em uma fase específica do desenvolvimento. Uma vantagem adicional desta metodologia é a de ser muito mais rápida

que o processo clássico de melhoramento vegetal, o qual, no caso de plantas perenes como o café, demandaria décadas.

As plantas geneticamente modificadas (PGMs), ou plantas transgênicas, vêm proporcionando uma revolução na agricultura, permitindo aos agricultores o cultivo de plantas com menor uso de inseticidas e herbicidas. Os dados mais recentes mostram que em 2006 foram cultivados 102 milhões de hectares de lavouras transgênicas em 22 países, sendo os cinco maiores produtores mundiais os EUA, Argentina, Brasil, Canadá, Índia e China. As culturas mais utilizadas são a soja com 58,6 milhões de hectares (57% da área global de agricultura biotecnológica), seguida pelo milho (25,2 milhões de hectares, 25%), algodão (13,4 milhões de hectares a 13%) e a canola (4,8 milhões de hectares ou 5% da área global de cultivo de lavouras transgênicas) (CIB, 2008).

Embora ainda incipiente, alguns grupos de pesquisa nacionais e internacionais vêm desenvolvendo trabalhos em transformação genética de café. No Japão, um grupo pioneiro foi capaz de produzir um café modificado geneticamente que apresenta uma redução de até 70% no teor de cafeína, sendo esse índice obtido graças ao silenciamento gênico da enzima *N*-methyltransferase, uma enzima chave na biossíntese de cafeína (Ashihara *et al.*, 2006). Plantas de café transgênicas das espécies *C. canephora* e *C. arabica* já carregam uma versão sintética do gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*, cujo produto tem ação inseticida, para incrementar a resistência a uma importante praga do cafezal, o bicho-mineiro (Leroy *et al.*, 2000). No Brasil,

plantas de *C. canephora* contendo o gene bacteriano *bar*, apresentaram resistência ao herbicida gufosinato de amônio (Ribas *et al.*, 2006).

Para que os efeitos de tais processos biotecnológicos venham a ter um maior impacto sobre a cafeicultura e a agricultura em geral, diversas ferramentas moleculares precisam ser disponibilizadas. Dentre as mais importantes podemos listar os promotores, e seqüências regulatórias relacionadas, que são imprescindíveis para que a expressão adequada do produto gênico aconteça. Os projetos de seqüenciamento de genomas inteiros, como o do arroz, ou de cDNA, como no caso do banco de dados de seqüências expressas (EST) do café, constituem a fonte principal dessas informações.

No caso do café, o Projeto Genoma Café Brasileiro, por iniciativa do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café), com auxílio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - Café) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) disponibilizou a partir de 2003, aproximadamente 215.000 seqüências, advindas de 37 bibliotecas de DNAC de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, representando diferentes estádios do desenvolvimento de células e tecidos, sob diversas condições de estresse. Após análises de bioinformática foi possível obter um total de 130.792 seqüências para *C. arabica*, 12.381 para *C. canephora* e 10.566 para *C. racemosa*. O resultado final, para o agrupamento dos ESTs (etiquetas de seqüências expressas), foi de 17.982 contigs e 32.155 singletons, o que corresponde a 33.000 genes diferentes (Viera *et al.*, 2006). Destas seqüências, 22% não apresentam similaridade significativa com as seqüências

depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sendo correspondentes portanto a novos genes (Viera *et al.*, 2006).

As plantas constituem um recurso muito importante para a humanidade, mantendo nossa alimentação há muito tempo. Os rápidos avanços que surgiram com a engenharia genética de plantas tem tornado possível modificá-las para aumentar sua produtividade e qualidade nutricional. O aperfeiçoamento das técnicas de transformação e regeneração voltadas para a produção de PGMs abriu um novo campo de pesquisa aplicada na ciência vegetal. Genes exógenos podem ser introduzidos em praticamente qualquer planta sendo possível alterar o perfil metabólico da mesma através da modificação das vias de síntese de diferentes biomoléculas. Nesse contexto, as PGMs têm também chamado cada vez mais atenção do setor produtivo pois podem funcionar como bioreatores naturais para a produção em massa de produtos químicos e farmacêuticos.

Sistemas de expressão eficientes baseados em promotores específicos que possam otimizar a expressão dos transgenes nas células vegetais, constituem o ponto chave para maximizar todas as aplicações citadas anteriormente. Isso vem sendo conseguido nos últimos anos com o uso de promotores fortes que promovem alta expressão gênica (Rancé *et al.*, 2002).

## 1.5. Promotores

Em organismos eucarióticos, uma região promotora central típica está localizada na região 5' da sequência transcrita e consiste de elementos regulatórios necessários para o reconhecimento pela RNA polimerase dependente de DNA. Dentre os elementos regulatórios comumente encontrados nos promotores eucariontes destaca-se a sequência conservada (T/A)A(A/T), a qual é denominada TATA Box, localizada a aproximadamente 30 pares de bases (pb) do ponto de início da transcrição, e alguns outros elementos promotores proximais localizados a aproximadamente 100 (CCAAT Box) e 200 pb (GC Box) acima do ponto de início da transcrição (Griffiths *et al.*, 2000). Além de sequências consensuais típicas citadas, os promotores apresentam características físicas que estão diretamente relacionadas com o seu modo de ação.

Alguns promotores conferem expressão constitutiva, enquanto outros permitem a expressão órgão/tecido-específica, ou tem sua expressão induzida pelo meio (Walden & Wingender, 1995). Os mecanismos que regulam a atividade de promotores que conferem padrões de expressão tecido- ou desenvolvimento-específicos em plantas são geralmente pouco compreendidos (Tian *et al.*, 2005). Em parte, isso ocorre em função do número limitado de promotores com tais características a terem sido isolados e caracterizados funcionalmente.

Como exemplos de promotores de origem viral ou procariótica que têm sido empregados com relativo sucesso em plantas podemos citar os promotores da opina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens*, e o promotor de 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), o qual é freqüentemente empregado devido ao seu alto nível de expressão na maioria dos órgãos/tecidos, entretanto com diferentes níveis de eficiência dependendo da espécie. Outros, como o promotor de Ubiquitina I do milho e a seqüência promotor/íntron do arroz, são exemplos de promotores derivados de eucariotos (Walden & Wingender, 1995).

Como exemplo de promotores clonados em café é possível citar a seqüência promotora do gene que codifica uma N-metiltransferase, uma enzima essencial na síntese de cafeína em plantas de *C. canephora*. Essa seqüência de 2,7 kb foi suficiente para dirigir a expressão de um gene repórter em plantas transformadas de tabaco (Satyanarayana *et al.*, 2005). Ainda em *C. canephora*, um potente promotor grão-específico, de aproximadamente 1 kb, associado ao gene *CcDH2* foi isolado e caracterizado (Hinniger *et al.*, 2006).

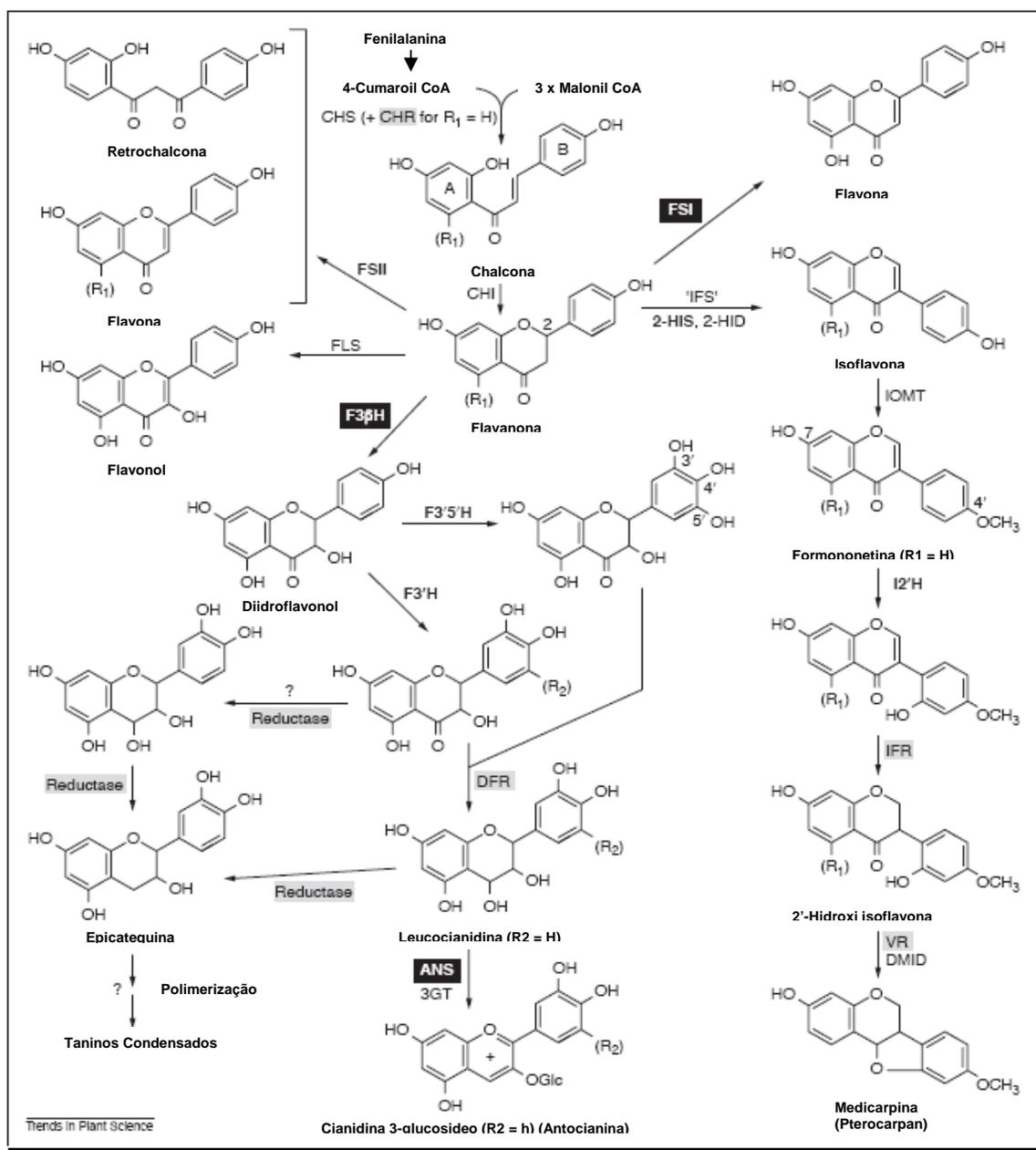
Promotores que garantem a expressão de um transgene em um ambiente particular, numa fase do desenvolvimento ou de maneira específica em um determinado órgão/tecido, são extremamente úteis. Há uma série de vantagens em se restringir a expressão do transgene em determinada célula ou tecido-alvo através do emprego de promotores tecido-específicos. A expressão de uma proteína heteróloga em sementes de cereais ou em tubérculos de batata, por exemplo, evita o seu acúmulo em órgãos vegetativos, o que poderia provocar a intoxicação da planta hospedeira ou a morte de organismos não-alvos (Ma *et al.*, 2003). Paralelamente,

sistemas baseados em promotores induzidos, que respondam a estímulos externos químicos (Padidam, 2003) ou físicos (Cramer *et al.*, 1999), também podem ser usados para restringir a expressão do gene exógeno numa base temporal.

Para minimizar os potenciais efeitos adversos dos transgenes bem como dos agentes de seleção empregados nas plantas geneticamente modificadas, é importante alcançar um nível apropriado de expressão gênica nas partes da planta onde os mecanismos de resistência e seleção são realmente necessários. Para aumentar a precisão do sistema de expressão, o número de promotores órgão/tecido-específicos precisa ser diversificado.

## **1.6. Os Fenilpropanóides**

Dentre as muitas vias existentes para síntese dos compostos secundários em plantas, existe uma de grande importância, a via dos fenilpropanóides, mais conhecida como a via dos flavonóides derivados (Figura 1). Os fenilpropanóides são um grupo diverso de metabólitos secundários acumulados nos tecidos vegetais, no qual se incluem as antocianinas, flavonóis, proantocianidinas (taninos condensados), ligninas, flavonas, isoflavonas, entre outros.



**Figura 1** - Via biossintética dos mais importantes flavonóides derivados em leguminosas. CHS, chalcona sintetase; CHR, chalcona redutase; CHI, chalcona isomerase; FSI, flavona sintetase I; FSII, flavona sintetase II; FLS, flavonol sintetase; IFS, isoflavona sintetase; F3βH, flavanona 3β hidroxilase;

F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilase; DFR, diidroflavonol redutase; ANS, antocianidina sintetase; 3GT, antocianidina 3-glicosiltransferase; IOMT, isoflavona O-metiltransferase, IFR, isoflavona redutase; VR, vestitona redutase, DMID, 7,2'-diidroxi, 4'-metoxisoflavanol deidratase. Adaptado de Dixon & Steele, 1999.

Esses compostos são amplamente distribuídos no reino vegetal, e suas rotas biossintéticas podem gerar substâncias que atuam tanto na pigmentação, como no caso das antocianinas, servindo de atrativos para diversos polinizadores em flores, como antioxidantes em frutas, folhas e sementes (Gould *et al.*, 2002). Podem ainda atuar como moléculas protetoras na formação de radicais livres por ação da luz ultravioleta (Merzlyak *et al.*, 2008), onde se verifica o aumento de flavonóides em determinados órgãos em decorrência de exposição à luz (Winkel-Shirley, 2002).

Já é amplamente aceito que os flavonóides têm papel importante na proteção vegetal contra insetos e mamíferos de hábitos herbívoros. Os principais estudos foram focados em flavanas poliméricas, proantocianidinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas de baixo peso molecular. Como exemplo do seu emprego é possível citar os trabalhos realizados com taninos condensados no combate a pragas e animais (Simmons, 2003), já que estas moléculas são bem pouco palatáveis, e causam repugnância em lagartas e outros animais, inclusive mamíferos como macacos (Harbone & Williams, 2000).

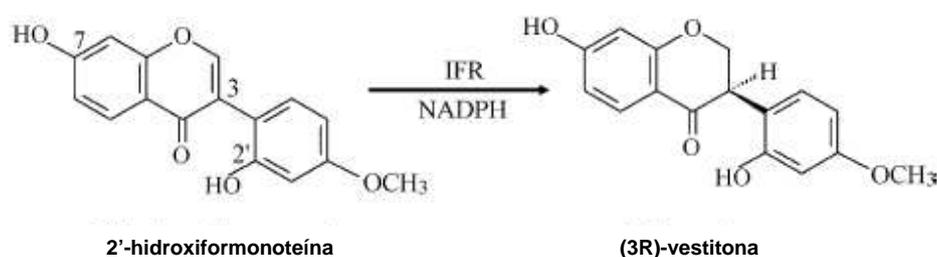
Mas a função que mais nos interessa no presente trabalho é a ação desses compostos na proteção contra microorganismos, inibindo o crescimento principalmente de fungos (Dixon

*et al.*, 2002; 2005). González de Colmenares *et al.* (1998) demonstraram que variedades de café suscetíveis (*C. arabica*) ao fungo *H. vastatrix* contem baixos níveis de proantocianidinas nas suas folhas quando comparados com espécies resistentes (*C. canephora*), e que as proantocianidinas extraídas dessas folhas inibem a germinação *in vitro* de uredósporos da raça tipo II de *H. vastatrix*.

Incluída nesta categoria está a classe dos isoflavonóides descritos originalmente nas plantas leguminosas. Tais compostos são considerados benéficos para saúde humana, pois existem indícios de que auxiliam na redução do risco de osteoporose e câncer, podendo, com efeito semelhante ao estradiol, ser utilizados na reposição hormonal, reduzindo os sintomas da menopausa e baixando os níveis de colesterol (Dixon & Ferreira, 2002). Alguns estudos vêm demonstrando há algum tempo a importância dos isoflavonóides nas relações simbióticas de leguminosas com bactérias do solo atuando na formação de nódulos radiculares para fixação de nitrogênio. Nos estágios iniciais da nodulação há o reconhecimento de isoflavonóides por proteínas NodD específicas de *Rhizobium* que levam a ativação de outros genes *nod* (Peters *et al.*, 1986; Redmond *et al.*, 1986). A planta hospedeira por sua vez, responde a este contato, aumentando a exudação de isoflavonóides nas raízes (Dakora & Phillips, 1996).

A isoflavona redutase (IFR) é a penúltima enzima da cadeia de biossíntese da medicarpina, inicialmente descrita em alfafa (*Medicago sativa* L.) (Paiva *et al.*, 1991). É uma enzima monomérica, citosólica (López-Meyer & Paiva, 2002), e NADPH-dependente, e na

alfafa, converte 20-hidroxi-formoneteína estereoespecificamente para (3R)-vestitona (Figura 2) com a adição de um centro chiral na posição C3 (Wang *et al.*, 2006).



**Figura 2** - A reação enzimática catalizada pela IFR de *M. sativa*. Adaptado de Wang *et al.* (2006).

Isoflavonas redutase foram encontradas em outras leguminosas como a ervilha (*Pisum sativum*) e a soja (*Glycine max*), onde participam especificamente da via biossintética dos isoflavonóides. Apesar dos isoflavonóides serem compostos presentes exclusivamente nas leguminosas, as IFRs pertencem a uma grande família protéica que inclui proteínas semelhantes a IFR (IR-Like; IRL), as quais tem significativa identidade de seqüência com as IFRs de leguminosas, tendo sido identificadas em várias espécies de plantas não relacionadas diretamente.

Em milho, uma IRL é induzida pela ausência de enxofre (Petruco *et al.*, 1996), em *Arabidopsis thaliana* pelo estresse oxidativo (Babiychuk *et al.*, 1995), em batata é expressa durante o crescimento do tubo polínico e induzida por contato mecânico (van Eldik *et al.*,

1997), nos frutos de toranja (*Citrus paradisi*) é estimulada pela irradiação ultravioleta ao mesmo tempo em que induz resistência ao *Penicillium digitatum* (Lers *et al.*, 1998), e uma IRL também foi identificada em tabaco (Shoji *et al.*, 2002). Outras enzimas IRL catalisam distintas reações de redução, como a enzima pinoresinol-lariciresinol redutase que atua na via de biosíntese da lignina em *Forsythia intermedia* (Dinkova-Kostova *et al.*, 1996), e a fenilcumarana benzílica éter redutase de *Pinus taeda* (Gang *et al.*, 1999). Entretanto, a função de muitas outras proteínas IRL encontradas em diferentes espécies vegetais não está totalmente definida.

### **1.7. A Isoflavona Redutase-Like específica de folhas de *C. arabica* e sua seqüência promotora**

A fim de isolar promotores capazes de dirigir a expressão de genes em determinados órgãos/tecidos de café, o grupo coordenado pelo Professor Ivan de Godoy Maia iniciou um projeto para identificar e validar ESTs com expressão tecido-específica nessa espécie. Para tal, análises *in silico* junto ao banco de dados do projeto EST de café foram realizadas e, dentre outros, um EST com expressão específica em folha foi identificado e sua região promotora isolada e caracterizada em duas versões (Brandalise, 2007). A seqüência desse EST quando

submetida ao banco de dados do NCBI apresentava similaridade com proteínas pertencentes à classe das Isoflavonas Redutase-Like.

A primeira versão do promotor estudada por Brandalise (2007) era constituída de aproximadamente 900 nucleotídeos (a partir do ponto inicial de transcrição) e em ensaios de expressão transiente em café se mostrou funcional, dirigindo a expressão de um gene repórter apenas em folhas. Esta mesma versão, quando inserida em plantas de tabaco transgênico era capaz de ser induzida por estresse abiótico (dano mecânico). Uma versão deletada desse promotor também foi obtida (~ 400 nucleotídeos), porém não caracterizada, sendo a mesma enfocada no presente trabalho.

De posse dessas informações e das seqüências promotoras previamente isoladas por Brandalise (2007) é que teve início a pesquisa descrita na presente dissertação de mestrado.

## 2. Objetivos

O objetivo geral desse trabalho foi realizar a caracterização molecular do gene que codifica uma Isoflavona Redutase-Like em café (*Coffea arabica*) bem como empreender uma melhor caracterização funcional de seu promotor. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- A) Obtenção da sequência completa do EST que codifica a IRL de café e análise de suas relações filogenéticas.
- B) Quantificação da expressão desse gene sob condições de estresse biótico e abiótico.
- C) Análise da funcionalidade da versão deletada do promotor em ensaios de expressão transiente e estável.

### 3. Material e Métodos

### **3.1. Material Vegetal**

Foram utilizadas plantas de café da espécie *Coffea arabica* L. cultivar Mundo Novo, susceptível a ferrugem alaranjada. Tais plantas foram gentilmente cedidas pela Dra. Mirian Perez Maluf do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café “Alcides Carvalho”, situado no Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

### **3.2. Extração de RNA total de café e tabaco**

Amostras de cerca de 100 mg dos tecidos vegetais frescos de folhas de tabaco e café foram macerados em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz, e transferidas para tubos de 1,5 ml. O RNA total das amostras foi extraído com TRIzol de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (*TRIzol*, Invitrogen), e o mesmo armazenado a -80°C até o momento do uso.

### 3.3. Quantificação do RNA e síntese de cDNA

A integridade do RNA total extraído foi confirmada por eletroforese em gel comum de agarose 1% (p/v). O gel foi corado com brometo de etídeo 0,1 µg/ml. Após a eletroforese, o gel foi fotodocumentado em um transiluminador com luz ultravioleta (Eagle-Eye II, Stratagene EagleSight). A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies).

Posteriormente, as amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNaseI (Fermentas), para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico que possa ter acontecido durante o processo de extração. Para a obtenção de RNA livre de DNA foi utilizado 1 µg do RNA total, 1 µl de tampão de reação com MgCl<sub>2</sub> (10X; fornecido no kit) e 1 unidade da enzima Deoxyribonuclease I (1 U/µl). O volume final desta reação foi de 10 µl, completados com água livre de RNase. As amostras foram incubadas em termociclador (PTC 100 – Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.) a 37°C por 30 minutos. Para inibir a reação foi adicionado 1 µl de EDTA 25 mM (fornecido no kit), e as amostras foram incubadas no termociclador a 65°C por 10 minutos.

Na síntese da primeira fita de cDNA foi utilizada a enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se oligodT<sub>17</sub>VN (2,5 mM) como iniciador.

A quantificação do cDNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop. Para a reação de PCR em Tempo Real, o cDNA das amostras de interesse foi diluído para uma concentração de aproximadamente 10 ng/ $\mu$ l, adicionando-se água livre de RNase.

### **3.4. Quantificação da expressão relativa por PCR em tempo real**

Para a quantificação da expressão relativa dos genes-alvo (IR-Like em café e GUS em tabaco) e dos normalizadores [Ubiquitina de café (Ganesh *et al.*, 2006), 18S RNA de tabaco (Levy *et al.*, 2004) e  $\alpha$ -tubulina de tabaco] foram utilizados os oligonucleotídeos, IsoqPCR, UbiCA, RTGus,  $\alpha$ -tubulina e 18S, descritos na Tabela 1. Os oligonucleotídeos foram gerados automaticamente utilizando-se o software *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems). Para tal, os seguintes parâmetros foram especificados: tamanho entre 26 e 30 pb; T<sub>m</sub> (Temperature of melting) entre 65 e 70°C; quantidade de GC: entre 40 e 60% e tamanho médio dos fragmentos amplificados entre 50 e 150 pb.

O kit usado nas reações foi o *Platinum SYBR Green qPCR SuperMixUDG with ROX* (Invitrogen). O cDNA das amostras de interesse foi submetido à reação adicionando-se (concentração final): 6  $\mu$ l de *Platinum SYBR Green qPCR SuperMixUDG with ROX*, 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo gene específico (forward e reverse) para um volume final da reação de 10  $\mu$ l, o qual foi obtido adicionando-se água livre de RNase. Cada reação foi feita em

triplicata para cada amostra. O controle negativo foi realizado adicionando-se água livre de RNase ao invés de cDNA; tal procedimento foi adotado para a certificação da ausência de qualquer tipo de contaminação.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador óptico (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems), com um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos para ativação da UDG, seguido de um período de desnaturação a 95°C por 2 minutos. Em seguida, utilizou-se de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C. No final do processo, para a quantificação dos dados, foi realizado um ciclo suplementar de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C. Os dados ópticos foram posteriormente analisados no programa *7300 System Software*.

Após o fim da reação foi obtida a representação gráfica (Amp Plot) e numérica (Ct, Threshold Cycle) do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação. O cálculo para a determinação da expressão gênica foi o do  $\Delta\Delta Ct$  (Livak e Schmittgen, 2001), o qual se baseia na reação exponencial da PCR. Para tal a expressão  $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde QR represente o nível de expressão gênica, Ct representa o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial;  $\Delta Ct$  se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene controle (ubíquo) e  $\Delta\Delta Ct$  representa a diferença entre o  $\Delta Ct$  da amostra de interesse (infecção em determinado tempo) e o  $\Delta Ct$  da amostra de referência, foi utilizada. A eficiência dos

oligonucleotídeos foi calculada através do programas SAS versão 8e, permanecendo entre 1,96 e 2,00. Para efeito de cálculo, foi considerada uma eficiência de 2,00.

### **3.5. Extração de DNA genômico de tabaco**

Para a extração de DNA genômico, amostras de folhas foram coletadas de plantas de tabaco mantidas em câmara climatizada, sendo preferencialmente selecionadas folhas jovens. Após a coleta, as folhas foram imediatamente maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até o uso.

O DNA genômico foi extraído conforme o protocolo descrito a seguir. A um microtubo de 1,5 ml foi adicionado 900 µl de um tampão de extração, pH 5,2, composto de NaOAc 100 mM, pH 4,8, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, PVP 3,3%, SDS 1,4% e bissulfito de sódio 2% (p/v). A este tampão, pré-aquecido a 65°C, adicionou-se cerca de 100 mg de tecido vegetal macerado. A mistura foi incubada a 65°C por 10 minutos, sendo imediatamente esfriada em gelo. Trezentos microlitros de KOAc 3M, pH 5,2, foram então adicionados ao tubo, sendo o mesmo incubado em gelo durante 30 minutos. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foi adicionado 600 µl de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos em freezer -20°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram novamente centrifugados a 14000 rpm durante 20 minutos, em

centrífuga refrigerada a 4°C. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. Após a completa evaporação do etanol, os *pellets* receberam 50 µl de TE (Tris-EDTA; 10:0,1) contendo 60 µg/ml de RNase, e foram ressuspensos em banho-maria a 37°C por 30 minutos. As amostras foram então armazenadas em freezer -20°C até o momento da quantificação.

A qualidade e a concentração do DNA extraído foram verificadas em espectrofotômetro NanoDrop e/ou por análise comparativa em géis de agarose [1% (p/v) em solução TBE 1X] corados com brometo de etídeo (0,1 µg/ml). Nesse caso, comparou-se o tamanho e a intensidade da banda produzida com uma amostra de concentração conhecida (DNA Lambda GibcoBRL, Life Technologies).

### **3.6. Amplificação da região 3' do cDNA que codifica uma IRL em café pelo método 3' RACE**

A seqüência completa do cDNA que codifica uma IRL de café foi obtida usando a técnica 3'RACE (*rapid amplification of cDNA ends*). Para tal foi usada a seqüência de nucleotídeos do EST (CA00-XX-LV5-084-A10-EZ.F) originalmente empregada para clonagem do promotor em estudo (Brandalise, 2007), e que se encontrava disponível no banco de ESTs do café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Dois oligonucleotídeos gene-

específicos (GSP) foram então desenhados junto à porção 3' de tal EST e a porção faltante foi amplificada empregando o kit *3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante e os oligonucleotídeos IsofE, IsofI (Tabela 1) e o adaptador AP3.

### **3.7. Isolamento, purificação e clonagem da região 3' do cDNA da IRL de café.**

O fragmento resultante da amplificação por 3`RACE foi isolado do gel de agarose com o auxílio de uma lâmina descartável, e purificado utilizando-se o kit *QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen) de acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante. Porém, o DNA foi eluído da coluna utilizando-se água deionizada autoclavada a 70°C e não solução TRIS-EDTA como sugerido.

O fragmento purificado foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (kit pGem-T Vector Systems, Promega). A ligação do inserto ao vetor seguiu a proporção 3:1, sendo a reação de ligação composta de 1 µl da enzima T4 DNA ligase (3 U/µl), 50 ng do vetor pGEM-T Easy, tampão de reação 1X, 150 ng de fragmento purificado e água deionizada autoclavada num volume total de 10 µl. A ligação foi incubada a 4°C por 16 horas.

Células competentes da cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* preparadas conforme protocolo descrito no manual do LBMP – CBMEG / Centro de Citricultura Silvio Moreira/ Cordeirópolis foram utilizadas. A transformação foi realizada empregando choque térmico segundo protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 1989). Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de Select Agar em água deionizada, com pH igual a 7,0) adicionado de 100  $\mu$ g/ml de ampicilina; 24 mg/ml de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) e 50 mg/ml de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo). As placas de Petri foram deixadas em estufa a 37°C por 16 horas.

### **3.8. Minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina e sequenciamento do inserto**

Foram escolhidas três prováveis colônias recombinantes (brancas) para confirmação da presença do vetor e posterior sequenciamento do inserto. As colônias isoladas foram inoculadas em 4 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml) e mantidas sob agitação constante de 300 rpm a 37°C durante 16 horas.

Após incubação foram transferidos 1,4 ml da cultura para tubo de 1,5 ml. As células foram coletadas por centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. As bactérias foram ressuspensas em 300 µl de solução A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0 e RNase 10 mg/ml). Adicionou-se em seguida 300 µl da solução B [NaOH 200 mM e SDS 1% (v/v)], inverteu-se o tubo algumas vezes, sendo o mesmo incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Prosseguindo a extração, foi adicionado 300 µl de solução C contendo acetato de potássio 3 M, pH 5,5. O precipitado foi coletado por centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante, aproximadamente 900 µl, foi transferido para novo tubo contendo 400 µl de isopropanol gelado e centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µl de etanol 70% (v/v), inverteu-se o tubo com cuidado e procedeu-se uma nova centrifugação a 14.000 rpm durante 5 minutos. O etanol foi descartado manualmente e o *pellet* foi seco completamente em estufa 37°C durante 20 minutos. O precipitado obtido foi posteriormente ressuspendido em 20 µl de água deionizada autoclavada.

Os plasmídeos foram avaliados via padrão de digestão com a enzima *EcoRI* (Fermentas) e os produtos resultantes visualizados em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml). As digestões foram realizadas a 37°C durante 16 horas na presença de tampão de reação 1X, 100 ng de DNA plasmidial e água deionizada autoclavada.

O seqüenciamento dos clones selecionados foi realizado utilizando o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). A reação foi preparada com

água deionizada autoclavada contendo 4 µl de plasmídeo (500 ng), 0,5 µM dos oligos SP6 ou T7 (Promega), 2 µl do mix de BigDye™ e 2 µl de tampão *Save Money* [preparado com 10 % (v/v) de MgCl<sub>2</sub> 50 mM e 20 % (v/v) de Tris HCl pH 9,0 em água deionizada autoclavada].

As reações foram processadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) e as mesmas consistiram de um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido de um ciclo com desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, o qual foi repetido 25 vezes. As amostras foram então congeladas a -20°C.

Antes do sequenciamento foi realizada ainda uma etapa adicional de purificação. A cada poço da placa foram adicionados 80 µl de 65% (v/v) de isopropanol. A placa foi deixada em repouso, ao abrigo da luz, por 15 minutos, e então foi centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o excesso absorvido com papel toalha. Em seguida foram adicionados 200 µl de etanol 70% (v/v) a cada poço. A placa foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. A placa foi deixada em temperatura ambiente, protegida da luz, por uma hora, para que os poços ficassem totalmente secos. As amostras foram então ressuspendidas em 10 µl de formamida deionizada (Hi-Di, Applied Biosystems). Imediatamente antes do sequenciamento, as amostras foram desnaturadas em termociclador a 90°C por 3 minutos, e depois imediatamente incubadas em gelo por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied

Biosystems), e uma sequência consenso foi obtida a partir da sequência de nucleotídeos dos três clones usando o programa Chromas 2.30.

### **3.9. Análise das seqüências, identificação de sítios regulatórios e filogenia**

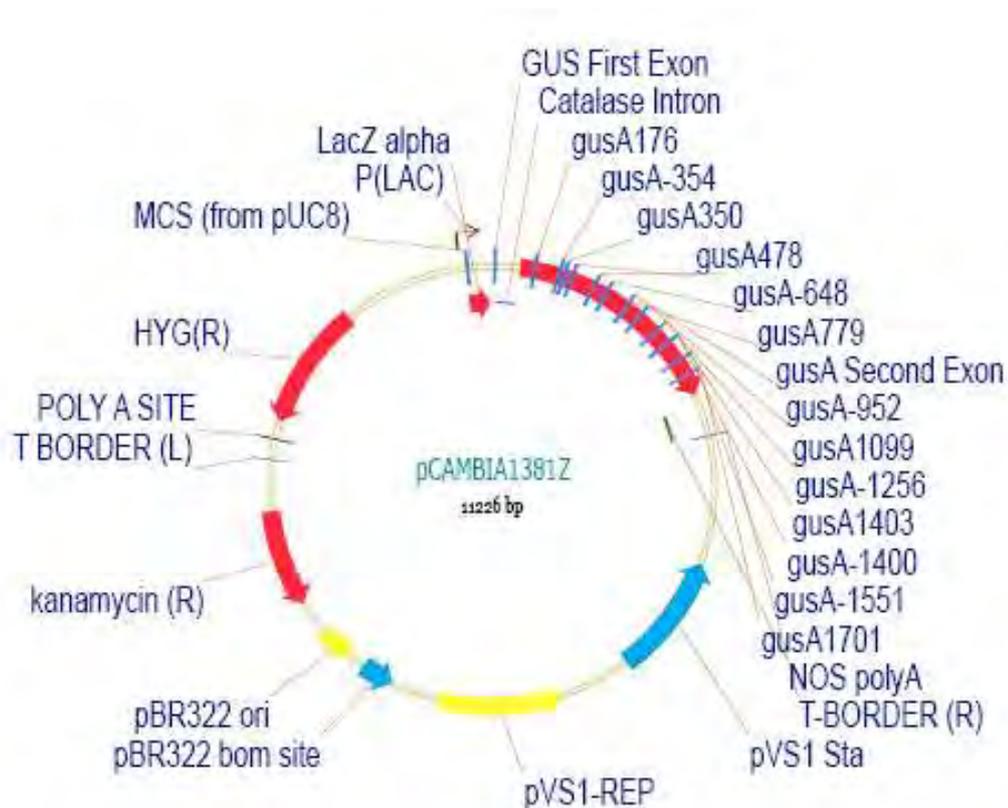
A seqüência consenso resultante foi submetida à pesquisa junto ao banco de dados do NCBI, website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) utilizando a ferramenta BLAST (Altschul *et al.* 1990, 1997). A seqüência deduzida de aminoácidos foi obtida usando as ferramentas disponíveis no website *The ExPASy* (Expert Protein Analysis System) do Instituto Suíço de Bioinformática (<http://www.expasy.org/>).

Para a busca de seqüências regulatórias presentes nas regiões promotoras em estudo foi utilizado o banco de dados do *Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements* (PLACE) (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) (Higo *et al.*, 1999).

A árvore filogenética foi construída através do programa MrBayes 3.1 (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/index.php>) e visualizada através do programa Mesquite 2.01 (Maddison & Maddison, 2007) utilizando para tal seqüências conhecidas de IFR e IRL.

### 3.10. Construção do cassete de expressão em pCAMBIA-1381z

Para montagem do cassete de expressão contendo a versão deletada do promotor da IRL de café em fusão ao gene repórter *uidA* ( $\beta$ -glucuronidase) foi utilizado o vetor pCAMBIA-1381z (Cambia, Austrália). Esse vetor contém o gene *uidA* interrompido por íntron de catalase e carrega um gene de resistência a higromicina.. A versão deletada do referido promotor encontrava-se inserida no vetor pRT-103GUS (construído previamente por Brandalise, 2007), sendo necessária a sua transferência para pCAMBIA-1381z (Figura 3). Para tal, ambos vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *NcoI*. Após a digestão foi realizada a purificação de banda de gel para extrair o fragmento de interesse (promotor) e o vetor pCAMBIA-1381z digerido. Ambos foram ligados e transformados em *E. coli* DH5 $\alpha$  (Sambrook *et al.*, 1989). Para verificar a correta inserção do promotor no vetor foi realizada a digestão do vetor recombinante com enzima de restrição e eletroforese do produto de digestão em gel de agarose 1%, bem como uma reação de PCR utilizando um oligonucleotídeo fragmento-específico e um oligonucleotídeo vetor-específico.



**Figura 3** – Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA-1381z (Cambia, Austrália) utilizado na construção dos cassetes de expressão para agroinfiltração e transformação estável de tabaco empregando *Agrobacterium tumefaciens*. O promotor utilizado nesse trabalho foi clonado entre os sítios *Hind*III e *Nco*I fusionado com o gene repórter *uidA* (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.htm>).

### **3.11. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4044 por choque térmico**

Uma colônia isolada da linhagem LBA 4044 de *Agrobacterium tumefaciens* foi transferida para um tubo contendo 3 ml de meio líquido LB e os antibióticos apropriados, no caso, rifampicina 100 µg/ml e estreptomicina 300µg/ml, e o mesmo foi incubado a 28°C com agitação de 150 rpm durante 16 horas. Transferiu-se 2 ml da cultura para novo tubo contendo 50 ml de meio líquido LB, o qual foi incubado a 28°C com agitação de 150 rpm durante 16 horas ou até que se atingisse uma absorbância ( $A_{600nm}$ ) entre 0,5 e 1,0. Posteriormente, as bactérias foram mantidas no gelo, por aproximadamente 15 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 5.000 g por 5 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em 1 ml de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 20 mM (mantido a 4°C).

Distribuiu-se 1 µg de DNA plasmidial contendo o cassete de expressão descrito no item anterior em 100 µl de células competentes, misturou-se delicadamente e incubou-se em gelo por 30 minutos. Logo após, a mistura foi incubada em nitrogênio líquido por aproximadamente 2 minutos e transferida imediatamente para 37°C por 5 minutos. Foi adicionado então 1 ml de meio líquido LB, e a mistura foi incubada por 2 horas a 28°C sob agitação. Aproximadamente 300 µl da suspensão de células foram plaqueados em meio LB

sólido contendo canamicina 100 µg/ml, estreptomicina 300 µg/ml e rifampicina 100 µg/ml. As placas foram mantidas em estufa 28°C entre 2 a 3 dias.

Após esse período, seis clones foram repicados em 3 ml de meio LB líquido seletivo contendo canamicina 100 µg/ml, estreptomicina 300 µg/ml e rifampicina 100 µg/ml. Os tubos foram mantidos em estufa 28°C durante 48 horas sob agitação constante de 200 rpm. Minipreparações de DNA plasmidial (item 3.8) e análises de PCR com oligonucleotídeos específicos foram realizadas a fim de confirmar a transformação das agrobactérias.

### **3.12. Obtenção de plantas transgênicas de tabaco**

As agrobactérias transformadas com o cassete de expressão foram incubadas em 5 ml de meio LB líquido seletivo com agitação de 150 rpm a 28°C, até atingirem uma  $A_{600\text{ nm}}$  entre 0,5 e 1,0. Logo após, 1 ml do inoculo foi transferido para um tubo de 50 ml, ao qual foi adicionado 4 ml de meio LB líquido, e mantido a temperatura ambiente até a utilização.

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) cultivadas *in vitro* foram usadas para transformação. Aproximadamente 30 discos foliares de 1 cm<sup>2</sup> foram retirados das folhas e mantidos em placa de Petri. Os discos foram imersos por 15 minutos em meio LB contendo as agrobactérias sendo posteriormente secos em papel filtro estéril e transferidos para placas

contendo meio MS sólido (Murashige & Skoog, 1962). As placas foram mantidas em ambiente controlado (28°C) no escuro, durante 48 horas. Posteriormente, os discos foram transferidos para placas de Petri contendo MS sólido adicionado de 100 µg/ml de higromicina, 500 µg/ml de cefotaxima, 1 µg/ml de 6-benzilaminopurina (BAP) e 100 µg/ml de ácido naftalenoacético (ANA). As placas foram mantidas por aproximadamente 30 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz até o surgimento de calos. Como controle positivo foram utilizados discos foliares não transformados mantidos no meio seletivo acima descrito. Depois, as plântulas formadas a partir desses calos foram individualizadas em potes de vidro contendo meio de enraizamento (meio MS descrito acima, com ausência de BAP), mantidos em câmara controlada, para formação das raízes.

### **3.13. Análise dos transformantes via PCR e ensaio enzimático de GUS**

Foram regeneradas sete plantas contendo a construção de interesse, as quais foram mantidas em câmara climatizada até as análises posteriores. A confirmação da inserção do cassete de expressão foi feita empregando PCR e DNA genômico extraído a partir de tecido foliar das linhagens transgênicas (protocolo descrito no item 3.5). As reações de PCR foram conduzidas do seguinte modo: tampão de PCR (1X), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada

nucleotídeo (dNTP mix), 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo gene-específico HindIII400F e GusR (Tabela 1) e 2,5 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (5U/ $\mu$ l, Invitrogen). Foram usados 35 ciclos de amplificação.

Adicionalmente, a atividade GUS foi localizada histoquímicamente através de protocolo padrão descrito por Jefferson *et al.* (1987). De uma maneira geral, os discos foliares de tais linhagens foram incubados por 16 h a 37 °C em 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5 contendo 1 mM de X-gluc em 10% de dimetilformamida, EDTA 10 mM, ferrocianeto de potássio 1 mM, ferrocianato de potássio 1 mM e Triton X-100 0,1 %, sendo mantidos no escuro. Para finalizar a reação e remover a clorofila, os discos foram imersos em etanol 70% (v/v) por 24 horas.

### **3.14. Ensaios de Agroinfiltração**

Para os ensaios de agroinfiltração foram usadas plantas de tabaco selvagem com mais de seis semanas de idade aclimatadas em sala climatizada (23 °C, 70 % de umidade e 16 horas de luz). As agrobactérias contendo o cassete de expressão descrito no item 3.11 foram cultivadas em meio LB líquido (aprox. 20 ml), contendo antibióticos seletivos, sendo as mesmas mantidas sob agitação (150 rpm) por 48 horas a 28°C, até alcançarem uma  $A_{600nm}$  entre 0,6 e 0,8. A seguir, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 3.000g por 15

minutos e o sobrenadante descartado. As bactérias foram então ressuspensas em 20 ml de tampão (MES 10 mM, pH 5,6 contendo MgCl<sub>2</sub> 10mM e Acetoseríngona 200 µM) e incubadas a temperatura ambiente por três horas. A solução foi injetada com seringa de plástico de 1 ml na face abaxial das folhas (as quais permaneceram presas à planta), entre as nervuras secundárias, usando-se de quatro a seis pontos de inoculação por folha. As plantas foram vedadas em sacos plásticos transparentes e mantidas em sala climatizada nas condições descritas acima. As análises histoquímicas de GUS foram conduzidas após 72 horas de infecção, conforme descrito no item 3.13.

### **3.15. Análise da expressão do gene repórter *uidA* em plantas transgênicas transformadas com os cassetes de expressão para as duas versões do promotor específico de folha em resposta a estresse abiótico (dano mecânico)**

As plantas transformadas com o cassete de expressão contendo a versão integral do promotor específico de folhas obtidas por Brandalise (2007), bem como as plantas contendo a versão deletada do promotor obtidas no presente trabalho, foram mantidas em sala de cultura

climatizada, com temperatura de 23°C, 70% de umidade relativa do ar e 16 horas de luz, por no mínimo sete dias.

Neste experimento foram utilizadas cinco plantas de tabaco da geração T<sub>0</sub> com aproximadamente três meses. Cabe ressaltar que tais plantas correspondem a eventos de transformação independentes e testaram positivas para a inserção do cassete de expressão. Para a realização do estresse foram usadas folhas não destacadas, quatro por planta, as quais foram cortadas com uma tesoura, paralelamente as suas nervuras secundárias. Uma folha intacta de cada planta foi utilizada como controle, sendo coletada ao início do ensaio. As folhas estressadas foram coletadas nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas, maceradas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA total para análise quantitativa da expressão gênica por PCR em Tempo Real.

### **3.16. Análise da expressão do gene *IRL* de café em resposta a estresse biótico (infecção por fungo) e a estresse abiótico (dano mecânico)**

As plantas de café (*C. arabica*, var. Mundo Novo) utilizadas, três exemplares para cada ensaio, foram aclimatizadas em sala de cultura climatizada, com temperatura de 23 °C, 70 % de umidade relativa do ar e 16 horas de luz, por no mínimo sete dias.

Cem miligramas de esporos do fungo *Hemileia vastatrix* (ferrugem alaranjada do cafeeiro) raça II, foram coletados em campo de *C. arabica*, e diluídos, na ausência de luz, em 10 ml de água deionizada autoclavada. Essa solução foi utilizada como inoculo do fungo, sendo borrifada na porção abaxial das folhas. Foram inoculadas seis folhas jovens/planta, sendo as mesmas pertencentes ao segundo par dos ramos plagiotrópicos, tendo aproximadamente 10 cm de comprimento ( $\sim 35 \text{ cm}^2$ ). As folhas inoculadas permaneceram presas à planta, as quais foram recobertas com um filme plástico preto umedecido com água estéril, permanecendo nessa fase durante 24 horas (incidência de luz causa abortamento dos esporos). A coleta foi realizada da seguinte forma: uma folha aleatória de cada exemplar inoculado foi coletada em tempos regulares de quatro horas, ou seja, nos tempos 0 (controle) 4, 8, 12 e 24 horas pós-inoculação, maceradas imediatamente em nitrogênio líquido e condicionada à  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Folhas testemunhas foram mantidas nas plantas visando à confirmação da infecção pelo fungo.

Para o ensaio de estresse abiótico, plantas de café mantidas nas mesmas condições e parâmetros acima descritos foram utilizadas. Três exemplares distintos tiveram suas folhas (quatro por planta) cortadas com uma tesoura, paralelamente as suas nervuras secundárias, sendo efetuados aproximadamente seis cortes por folha. Uma folha intacta de cada planta foi utilizada como controle, sendo coletada ao início do ensaio. As folhas estressadas foram coletadas nos tempos de 4, 8, 16 e 24 horas, maceradas imediatamente em nitrogênio líquido e

armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA total para análise quantitativa da expressão gênica por PCR em Tempo Real.

**Tabela 1.** Descrição dos oligonucleotídeos usados no trabalho.

<b>Nome</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
<b>HindIII400F</b>	CCCAAGCTTTCGACCATACAT
<b>GusR</b>	GTGTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTC
<b>AP3</b>	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT
<b>IsofE</b>	GAAGTGATGTGGATCGTTTGCATGGCGT
<b>IsofI</b>	GTTGAGCCTGCCTCAAGCTTATACAGAT
<b>IsoqPCR</b>	<b>F</b> – CGGCACCGGATACATTGG <b>R</b> – TTGGGTGCCCTGCTTTTG
<b>UbiCa</b>	<b>F</b> – AACATTGAGGGTGGTTCTGTTC <b>R</b> – GCAGAAAACCAACTAAGACCTAACAA
<b>RTGus</b>	<b>F</b> – TTGCCAACGAACCGGATAC <b>R</b> – GCCAGTGGCGCGAAATATT
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	<b>F</b> – GCATATCGATCCACATTGGTCAG <b>R</b> - GAGCTGCCTGTATGTTCCAGTCC
<b>18S</b>	<b>F</b> – AGGAATTGACGGAAGGGCA <b>R</b> – GTGCGGCCAGAACATCTAAG

## 4. Resultados

#### **4.1. Caracterização do cDNA que codifica uma Isoflavona Redutase-Like específica de folha em café**

Em análises no Banco de Sequências Expressas (EST) do Projeto Genoma Café foi identificado por Brandalise (2007), em uma biblioteca de folha, um EST codificando parcialmente uma proteína semelhante a uma isoflavona redutase (IRL). Esse EST apresentava-se incompleto em sua porção 3'.

A fim de obter a sequência completa do cDNA correspondente, a extremidade 3' faltante foi amplificada por 3'RACE-PCR e o produto obtido seqüenciado. Na Figura 4 está representada a sequência completa de nucleotídeos desse cDNA (945 pb) bem como a sequência deduzida de aminoácidos a partir da mesma. Quando submetida à análise de BLASTn no banco de dados do NCBI, essa sequência apresentou 67% de identidade com o cDNA que codifica uma IRL 6 de uva (*Vitis vinifera*) e 67% de identidade com o cDNA que codifica uma proteína homóloga 1 de IFR de soja (*Glycine max*). Por outro lado, a sequência deduzida de aminoácidos (314 aa) apresentou alinhamentos significativos com a proteína IRL 6 de *Vitis vinifera* (62 % de identidade) e com outra IRL de pêra (*Pyrus communis*) (63 % de identidade) depositadas no banco de proteínas do NCBI. O cDNA obtido foi denominado *CaIRL*.

```

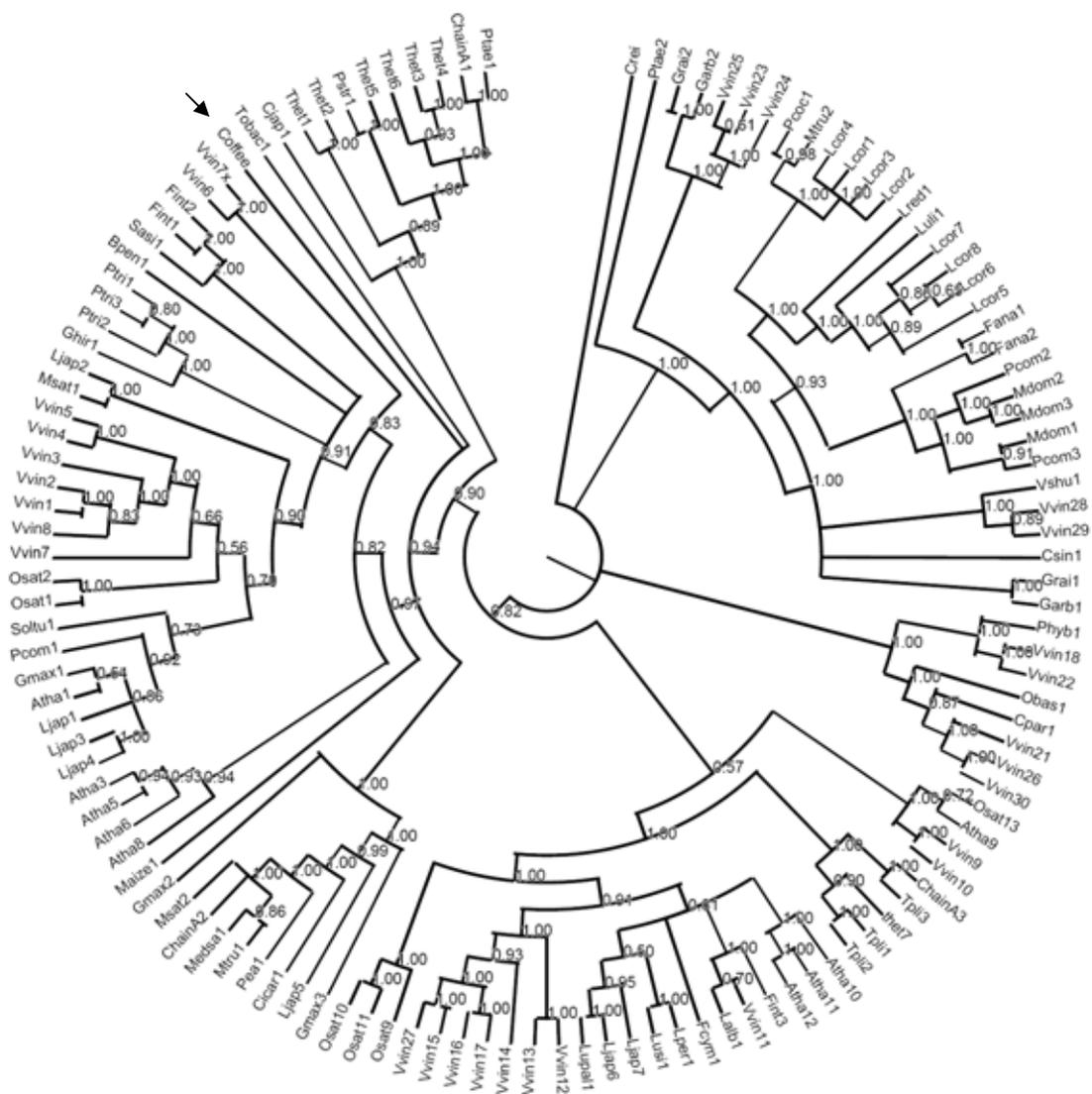
atggctgtgaaaagcaagatTTTgatcattggcggcaccggatacattggcaaatacgta
M A V K S K I L I I G G T G Y I G K Y V
gtggaggcaagtgcAAAagcagggcacccaactTTTgcattggtcggagaaaacacaatt
V E A S A K A G H P T F A L V G E N T I
tcagatcctgaaagggcagccaacctagagagcttcaagagTTTgggagtcggatttctt
S D P E R A A N L E S F K S L G V G F L
tatgcagatctacacgatcatcagcggTTTgtagatgcaatcaaacaagTTtgatacagtg
Y A D L H D H Q R L V D A I K Q V D T V
atctcgacagtcgggggagatTTTggTggctcatcaagTTaagataattgcagcaattaaa
I S T V G G D L V A H Q V K I I A A I K
gaagctggtaacatcaaaaagatTTTctaccttctgagTTTggaagtgatgtggatcgtTTg
E A G N I K R F L P S E F G S D V D R L
catggcgtTgTTgagcctcaagcttatacagatccaaagctgagatcccgagagct
H G V V E P A S S L Y R S K A E I R R A
gttgaagctgaagggataccttacacttatttagtatgtaatgTTTTgctggatatttg
V E A E G I P Y T Y L V C N V F A G Y L
aattatttcccttaaccctTTTggaggctctgtctctgcaagTcctccagagacaaaatt
N Y F L N P F G G S V S A S P P R D K I
gtcattcTTggTgatggaaatccaaaagTTTTTTctcgTggaagaaaatgtagctgca
V I L G D G N P K V F F S V E E N V A A
tacaccattaaagcagcagatgatccaaggaccctgaacaagattgtgtaccttagatca
Y T I K A A D D P R T L N K I V Y L R S
cctgccaacctgctgtcctgcaacgaaatagtatcattgtgggaaaggaaaattggccag
P A N R L S C N E I V S L W E R K I G Q
accctcgaaaagatTTTaccctccagagaaggaagTccttgagaaaatccgagaggcttca
T L E K I Y L P E K E V L E K I R E A S
atgtcatcaaaaatccatcctgtctctgttatacgtcTTTctgtgaagggacaaaatggcc
M S S K S I L S L L Y A L S V K G Q M A
aactTTgagatcgacgcttTTTTggcgtggaggcaacggagctctatcccgatgtgaaa
N F E I D A S F G V E A T E L Y P D V K
TgcaccgcactcgatgagtatctcgatcagTTTgtatcagagtag
C T A L D E Y L D Q F V S E -

```

**Figura 4** - Sequência completa do cDNA que codifica uma IRL de *Coffea arabica* (denominado *CaIRL*) e os respectivos aminoácidos deduzidos.

## **4.2. Análise filogenética da CaIRL**

A árvore filogenética representada na Figura 5 foi construída empregando as seqüências de aminoácidos de diferentes IFR e IRL, as quais se encontravam depositadas no banco de dados do NCBI. O método empregado foi o de inferência bayesiana para filogenias. Podemos ver que a CaIRL (Coffee) não se agrupou especificamente em nenhum outro clado, assim como aconteceu com a proteína A622 de tabaco (Tobac1).

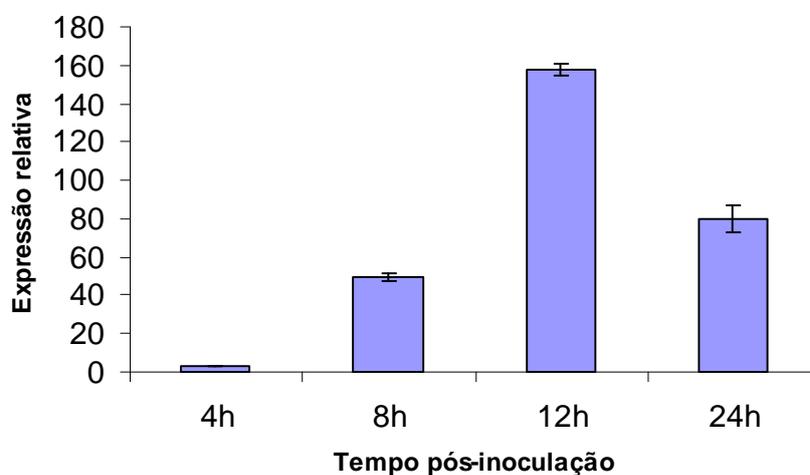


**Figura 5** – Relações filogenéticas da proteína IRL de *Coffea arabica* e outras redutases de várias plantas. A IRL de *C. arabica* está anotada como Coffee (seta) e a lista completa com as abreviaturas e números de acesso, encontram-se no Apêndice A.

### **4.3. Análise da expressão relativa do gene *CaIRL* em folhas de café em resposta a estresse biótico (infecção por fungo)**

Este experimento foi conduzido com plantas previamente aclimatizadas em sala de cultura, com mais de três meses de idade. As folhas infectadas com fungo foram coletadas (um pool de duas plantas para cada tempo) após 4, 8, 12 e 24 horas. Cabe ressaltar que um pool de folhas de duas plantas foi coletado imediatamente após a aspersão dos uredósporos para ser utilizado como amostra de referência no cálculo da expressão relativa pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Um aumento significativo de 50 vezes nos níveis de transcrição do gene *CaIRL* pode ser constatado após oito horas de contato da folha com os uredósporos do fungo (Figura 6), atingindo um máximo após 12 horas (160x), e decrescendo nas doze horas seguintes. Esses resultados confirmam que o gene *CaIRL* é altamente induzido por estresse biótico em café.



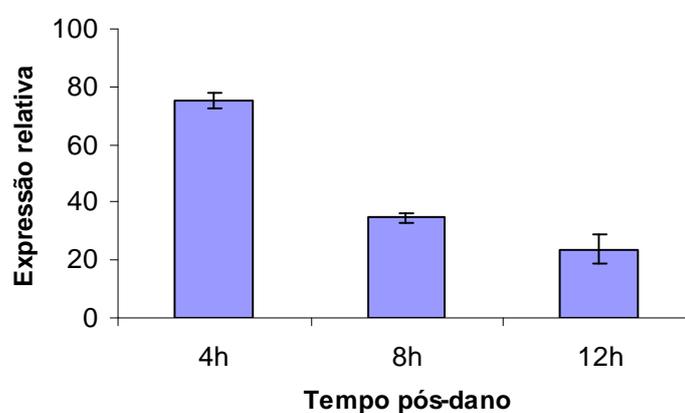
**Figura 6** – Expressão relativa do gene *CaIRL* em folhas de café inoculadas com o fungo *H. vastatrix* por um período de 24 horas. O gene que codifica uma ubiquitina de café foi utilizado como normalizador. As barras representam as médias e o desvio padrão para duplicata biológica.

#### **4.4. Análise da expressão relativa do gene *CaIRL* em folhas de café em resposta a estresse abiótico (dano mecânico)**

Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições descritas previamente, porém o estresse foi causado efetuando-se cortes laterais em uma folha, totalizando cerca de seis cortes/folha. As folhas estressadas foram coletadas (um pool de folhas das três plantas para cada tempo) após 4, 8 e 12 horas. Um pool de folhas de três plantas não submetidas ao

estresse foi previamente coletado para ser utilizado como amostra de referência no cálculo da expressão relativa pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Pelos resultados obtidos é possível observar que a transcrição do gene *CaIRL* é ativada de forma mais rápida em resposta ao estresse abiótico (Figura 7) do que em resposta ao estresse biótico causado pelo fungo (Figura 6). Em média, é possível notar uma elevação de 75 vezes no número de transcritos do gene *CaIRL* nas primeiras quatro horas, seguida de uma queda de aproximadamente 50% nas quatro horas seguintes (Figura 7). Seguindo tal tendência, uma redução ainda maior é observada no tempo de 12 h. Esses resultados confirmam que o gene *CaIRL* é rapidamente induzido em resposta ao estresse abiótico em café.



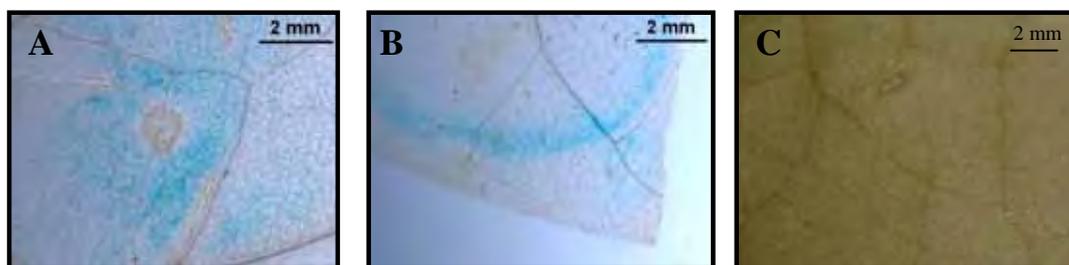
**Figura 7** – Expressão relativa do gene *CaIRL* em folhas de café submetidas a dano mecânico por período de 12 horas. O gene que codifica uma ubiquitina de café foi utilizado como

normalizador. As barras representam as médias e o desvio padrão para três repetições biológicas.

#### **4.5. Análise funcional da versão reduzida do promotor do gene *CaIRL* em folhas de tabaco transformadas por agroinfiltração**

Uma análise funcional da versão reduzida (400 pb) do promotor do gene *CaIRL* (Figura 11), clonado inicialmente por Brandalise (2007), foi empreendida. Para tal um cassete de expressão contendo o referido promotor em fusão transcricional com o gene *uidA* foi construído e inicialmente testado em ensaios de expressão transiente empregando agroinfiltração.

Nos ensaios de agroinfiltração foram utilizadas 12 diferentes plantas de tabaco selvagem (SR1) de aproximadamente seis semanas de idade. Através da detecção da atividade da  $\beta$ -glucuronidase, 72 horas após a infiltração, foi possível constatar que o cassete de expressão contendo a versão menor do promotor do gene *CaIRL* se mantém funcional (Figura 8A e B). Adicionalmente, doze diferentes plantas foram agroinfiltradas nas mesmas condições, com o mesmo cassete de expressão, porém desprovido do promotor em estudo. Em nenhuma de tais plantas controle foi detectada a atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase (Figura 8C).



**Figura 8** – Ensaio histoquímico da atividade da  $\beta$ -glucuronidase nos discos foliares de tabaco, agroinfiltrados com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle da versão menor do promotor do gene *CaIRL* (A e B) e respectivo controle (C), após 72 horas.

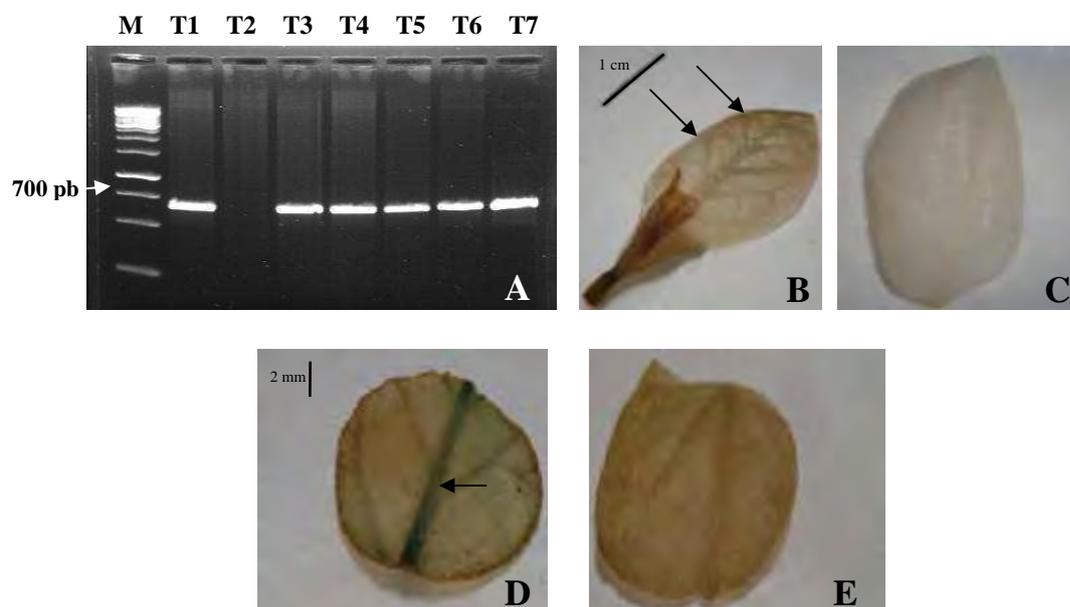
#### **4.6. Análise das plantas de tabaco transgênicas transformadas com o cassete contendo a versão reduzida do promotor *CaIRL* específico de folha**

Uma vez confirmada a funcionalidade da versão reduzida do promotor do gene *CaIRL* nos ensaios de expressão transiente (Figura 8), o mesmo foi testado *in planta* utilizando tabaco transgênico. Para tal, plantas de tabaco transformadas com o cassete de expressão descrito anteriormente foram obtidas.

Após a transformação dos discos foliares, sete plantas foram regeneradas e testadas por PCR, usando oligonucleotídeos específicos, para a inserção do promotor em seus genomas (Figura 9A). Dessas, seis eram positivas e apresentaram o cassete de expressão contendo o gene repórter *uidA* sob controle da versão menor do promotor do gene *CaIRL*. A expressão do

gene repórter em três desses transformantes (eventos independentes) foi confirmada utilizando ensaio histoquímico de GUS, e as mesmas foram usadas nos ensaios biológicos posteriores. Todas as plantas positivas foram mantidas em câmara de vegetação para coleta de sementes.

Apesar das prováveis diferenças existentes quanto ao controle do sistema transcricional em café e tabaco, a versão reduzida do promotor CaIRL manteve a capacidade de dirigir a expressão do gene repórter GUS nas folhas de tabaco transgênico, especialmente junto às nervuras (Figura 9B e D; setas).



**Figura 9** – Análise de PCR genômico e ensaio histoquímico da atividade da  $\beta$ -glucuronidase em folhas de tabaco transformadas com o cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob o controle da versão menor do promotor do gene *CaIRL*. A) Amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb correspondente ao tamanho do promotor inserido de 400 pb, acrescido de 280 pb do gene *uidA*; M – marcador de peso molecular; T(1..7) plantas regeneradas através de eventos independentes. B) Plântula onde há detecção da atividade do gene repórter, principalmente nas nervuras. C) Plântula selvagem usada como controle. D) Disco foliar de uma planta transgênica com três meses de desenvolvimento. E) Disco foliar de uma planta selvagem usada como controle. Setas indicam presença de atividade GUS.

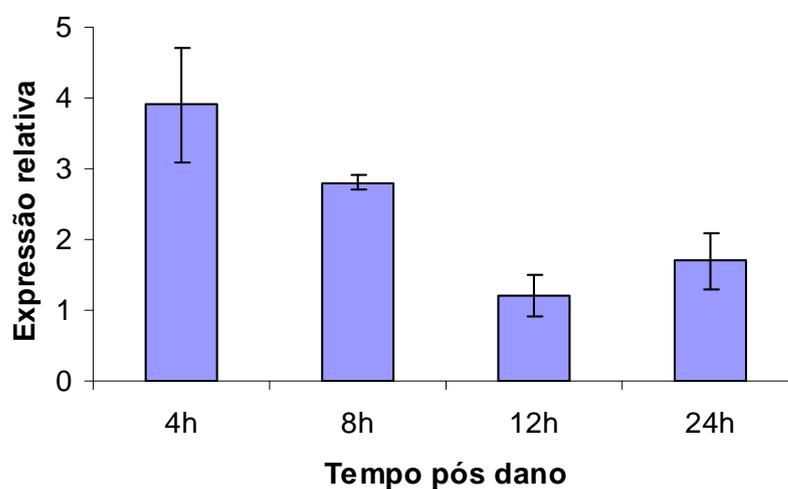
#### **4.7. Análise da expressão relativa do gene repórter *uidA* em folhas de tabaco transgênico transformadas com o cassete contendo a versão maior do promotor *CaIRL* em resposta a estresse abiótico (dano mecânico)**

A fim de correlacionar a alta indução do gene *CaIRL* observada em folhas de café submetidas a dano mecânico com a atividade do seu promotor, testes foram realizados usando plantas transgênicas de tabaco transformadas com o gene repórter *uidA* sob controle da versão completa do referido promotor (Brandalise, 2007).

Três plantas de geração T2 (de um mesmo evento transformante), com aproximadamente dois meses de idade, foram aclimatizadas em sala climatizada por sete dias, e utilizadas nos ensaios de dano mecânico. O estresse foi efetuado em uma folha de cada transformante como descrito no item Material e Métodos, e em seguida as folhas danificadas foram coletadas (um pool de folhas das três plantas para cada tempo) nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas. Um pool de folhas provenientes de três plantas, sem dano, foi previamente coletado para ser utilizado como amostra de referência no cálculo da expressão relativa.

Analisando-se o gráfico da Figura 10 é possível notar um aumento de quatro vezes no nível de transcritos do gene repórter *uidA* nas primeiras quatro horas do ensaio. Nos tempos amostrais subsequentes, entretanto, observa-se um decréscimo e um retorno ao nível basal de expressão. Do ponto de vista quantitativo, embora o perfil de indução do gene repórter nas

referidas plantas transgênicas seja diferente daquele observado para os transcritos do gene *CaIRL* em café (Figura 7), o promotor do referido gene mantém a capacidade de responder positivamente ao estresse, já que um aumento no número de transcritos do gene repórter, em resposta ao dano mecânico, foi observado.



**Figura 10** – Expressão relativa do gene *uidA* em folhas de tabaco transformado com a versão maior do promotor *CaIRL*, submetidas a dano mecânico por um período de 24 horas. O gene que codifica o RNA ribossomal 18S de tabaco foi utilizado como normalizador. As barras representam as médias e o desvio padrão para três repetições biológicas.

#### **4.8. Análise da expressão relativa do gene repórter *uidA* em folhas de tabaco transgênico transformadas com o cassete contendo a versão menor do promotor CaIRL em resposta a estresse abiótico (dano mecânico)**

O ensaio descrito no item anterior foi repetido empregando, dessa vez, as plantas de tabaco transformadas com a versão reduzida do promotor CaIRL obtidas nesse estudo.

As análises de quantificação da expressão relativa não revelaram variações significativas no nível de transcritos do gene repórter nos diferentes tempos amostrais, usando-se folhas intactas como referência. Em comparação com a versão estendida do promotor CaIRL, não foi constatada uma indução significativa na transcrição do gene repórter como observado na Figura 10, indicando que essa versão do promotor, embora funcional, perdeu a capacidade de resposta ao estresse mecânico. Esse dado sugere que alguma região essencial para a indução foi perdida na versão deletada do promotor.

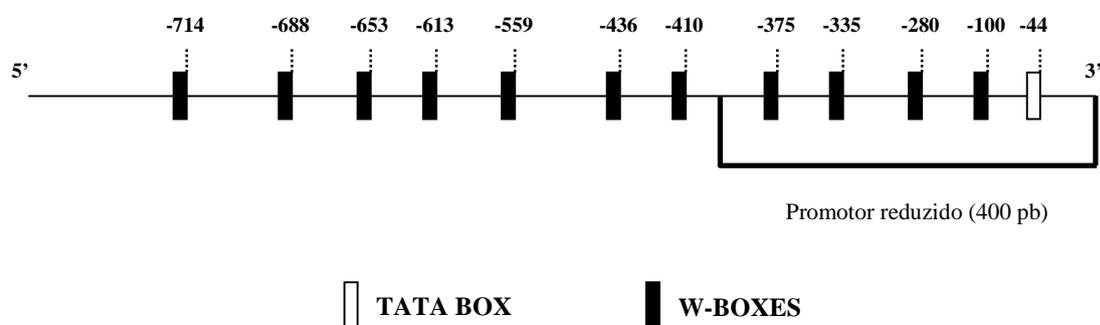
#### **4.9. Comparação da expressão relativa do gene repórter *uidA* em folhas de tabaco transgênico entre as duas versões do promotor *CaIRL* e o promotor *CaMV 35S***

Para a realização desses experimentos, devido a algumas dificuldades técnicas encontradas com o gene normalizador (18S) utilizado nas análises anteriores, foi utilizado um novo gene normalizador ( $\alpha$ -tubulina de tabaco; oligonucleotídeos descritos na Tabela 1). Para efeito de comparação foram utilizadas plantas de tabaco transformadas com um cassete de expressão contendo o promotor *CaMV 35S* controlando o gene repórter *uidA*. Nesse caso, um pool de três plantas independentes de tabaco, com aproximadamente seis semanas de idade, foi empregado.

Como base nos resultados de quantificação é possível concluir que quando colocado sob controle da versão maior do promotor *CaIRL*, com 900 pb, o gene repórter apresenta uma expressão cerca de 27 vezes ( $dp \pm 1,34$ ) menor que aquela observada quando o mesmo se encontra sob controle do promotor *CaMV 35S*. Quando estimulado por dano mecânico (quatro horas pós-estresse), o nível de transcritos aumenta, e essa diferença cai para 14 vezes ( $dp \pm 0,95$ ). Já para a versão de 400 pb, uma redução consideravelmente grande, algo em torno de 55 vezes ( $dp \pm 1,20$ ), pode ser constatada na quantidade de transcritos do gene repórter sob controle desse promotor em relação ao observado para o promotor 35S.

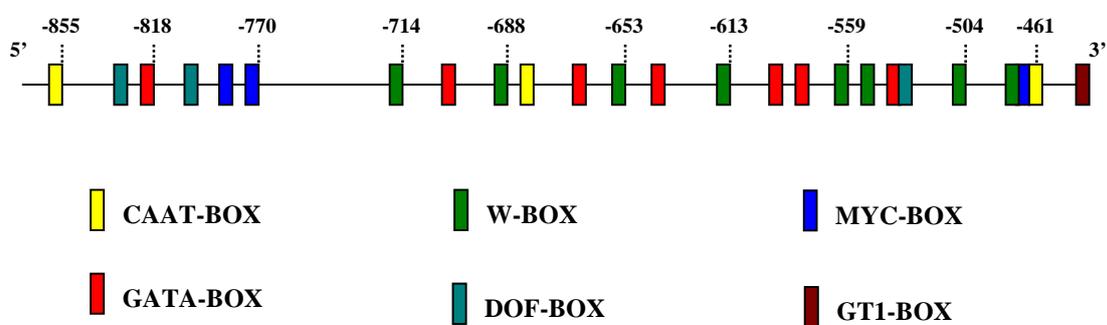
#### **4.10. Elementos *cis*-regulatórios ausentes na versão reduzida do promotor CaIRL de café**

A versão estendida da região promotora original compreendia, incluindo a região 5' não traduzida (UTR), aproximadamente 900 nucleotídeos (Brandalise, 2007). Essa região é composta de diversos elementos *cis*-regulatórios (TATA-box, CCAAT-box, GC-box, etc.), sendo os elementos do tipo W-box, os mais importantes para o estudo da resposta fisiológica a situações de estresse. Na Figura 11 encontra-se uma representação diagramática da referida região promotora, sendo possível notar um grande número desses elementos, em praticamente todo o seu comprimento. Do ponto a partir do qual ocorreu a deleção para a construção da versão reduzida do referido promotor, constata-se ainda a presença de quatro desses elementos.



**Figura 11** – Esquema de localização do TATA-box e dos elementos W-Box ao longo da região promotora do gene *CaIRL* obtida por análise comparativa com o banco de dados do PLACE. A região correspondente à versão reduzida do promotor está indicada.

A região que foi deletada para a construção da versão reduzida do promotor *CaIRL* encontra-se representada em detalhes na Figura 12. Esta contém grande parte dos elementos W-box (sete no total), bem como outros elementos importantes como os GT1-box e MYC-box. Todos esses elementos regulatórios já foram relacionados anteriormente na literatura como sendo responsivos a algum tipo de estresse ambiental, participando ativamente na expressão dos genes associados a essas regiões regulatórias.



**Figura 12** – Localização dos principais elementos regulatórios encontrados na região deletada (470 pb) na construção da versão reduzida do promotor do gene *CaIRL*. Dados obtidos por análise comparativa com o banco PLACE.

## 5. Discussão

### **5.1. O gene *CaIRL* com expressão específica em folhas de café é induzido por estresse biótico e a abiótico**

De acordo com os dados obtidos nos experimentos de expressão relativa foi possível constatar que o gene *CaIRL* é fortemente induzido pelo fungo da ferrugem (*H. vastatrix*), apresentando um aumento relativo de 160 vezes em sua expressão após 12 horas da inoculação dos uredósporos nas folhas. A indução observada é compatível com a presença de diversos elementos do tipo W-box presentes ao longo da seqüência promotora do gene *CaIRL*. Esses elementos são reconhecidos pelos fatores de transcrição do tipo WRKY envolvidos na regulação da expressão de diversos genes de defesa em plantas. Utilizando PCR em tempo real, Ganesh e colaboradores (2006) quantificaram, em folhas de café, a expressão de um gene que codifica um fator de transcrição do tipo WRKY induzido pela mesma espécie de fungo usada no presente estudo. Os pesquisadores constataram, em reações de incompatibilidade (resistência), um aumento relativo de 15 vezes na expressão do gene *WRKY1* de café no intervalo de 12 a 16 horas pós-inoculação, e de 25 vezes para reações de compatibilidade (susceptibilidade) após 24 horas.

Assim como outros genes que codificam IFRs e IRLs em plantas, o gene *CaIRL* teve sua expressão ativada rapidamente, logo nas primeiras horas da interação, atingindo um pico máximo e decaindo rapidamente em seguida. Esse perfil de expressão também é observado

em outras plantas. Em uma cultura de células em suspensão de alfafa (*Medicago sativa*), após exposição a um indutor fúngico, observou-se um aumento da expressão de um gene que codifica uma IFR nessa espécie nas primeiras três horas, atingindo um máximo entre três e seis horas, e cessando totalmente após 12 horas da indução (Oommen *et al.*, 1994). Já em células em suspensão de arroz (*Oriza sativa*), a expressão do gene *OsIRL* foi induzida por tratamento com o fungo *Magnaporthe grisea*. Nesse caso, um aumento na quantidade de transcritos foi observado no intervalo de duas a quatro horas após a aplicação do fungo, atingindo seu ponto máximo em 12 horas, vindo a diminuir logo em seguida (Kim *et al.*, 2003a). Um concomitante aumento na quantidade da proteína OsIRL nessas plantas foi também observado em uma análise de proteômica (Kim *et al.*, 2003b).

É bem estabelecido atualmente que danos mecânicos ativam a expressão de uma grande diversidade de genes, alguns deles relacionados com a regeneração do tecido injuriado, e outros com a proteção do órgão/tecido danificado da herbivoria e/ou invasão por agentes patogênicos. Estudos recentes mostram que a expressão desses genes é ativada rapidamente logo após o dano (Stankovic *et al.*, 2000; Cheong *et al.*, 2002; Nishiuchi *et al.*, 2004). Os dados obtidos nos ensaios de estresse abiótico em folhas de café (*C. arabica*) demonstrando a ativação do gene *CaIRL*, corroboram essa asserção, já que imediatamente após o dano provocado no limbo foliar, mais precisamente no tempo de quatro horas, houve um aumento de 75 vezes no número de transcritos. De maneira muito similar, um gene que codifica uma isoflavona sintetase (IFS) em cotilédones de soja (*G. max*), enzima inicial da cadeia de

biossíntese dos isoflavonóides, teve sua expressão aumentada em mais de 200 vezes em apenas oito horas quando o tecido foi lesionado (Subramanian *et al.*, 2005). Por outro lado, Lers e colaboradores (1998) demonstraram que o aumento na expressão de um outro gene que codifica uma IRL em frutos maduros de toranja (*Citrus paradisi*), ocorre tanto em resposta ao dano mecânico como também à infecção pelo fungo *Penicillium digitatum*. Esses resultados indicam que as IRLs devem atuar na resposta de defesa das plantas aos estresses ambientais, sendo rapidamente ativadas pelos mesmos.

Correlacionando os dados da literatura com os dados de expressão obtidos no presente trabalho, é possível sugerir que a CaIRL, assim como outras proteínas da mesma classe presentes em diversas plantas não-leguminosas, desempenha um papel importante na resposta de defesa contra microorganismos patogênicos e herbivoria. Como sua expressão é induzida tanto pela invasão biótica, como pelo estresse abiótico, é bastante provável que a CaIRL participe de uma etapa comum aos diferentes mecanismos de defesa da planta. A cinética de ativação observada sugere uma indução rápida e efetiva nas primeiras horas após o estresse, indicando uma participação na resposta primária de defesa contra agressões.

## **5.2. Relacionamento filogenético da CaIRL específica de folhas de café com outras redutases**

Nos últimos anos, um número relativamente grande de redutases com significativa homologia com as isoflavonas redutases (IFRs), pinoresinol-lariciresinol redutases (PLRs) e fenilcumarana benzílica éter redutases (PCBERs) (Gang *et al.*, 1999), tem sido descoberto, principalmente devido à busca e seleção de genes induzidos por fungos (Hibi *et al.*, 1994) ou relacionados com outras respostas de defesa a estresse em plantas (Petrucco *et al.*, 1996). Essas proteínas, denominadas isoflavona redutase-like (IRLs), não têm uma função totalmente estabelecida especialmente porque as suas atividades bioquímicas e respectivos substratos ainda não foram elucidados. É interessante salientar que dentre as IRLs descritas cuja atividade enzimática foi examinada, nenhuma foi capaz de reduzir isoflavonóides (Hibi *et al.*, 1994), fato que inviabiliza a correta asserção das reações enzimáticas com as quais estas proteínas estão envolvidas e o conseqüente esclarecimento de suas funções fisiológicas.

Membros dessa família, embora sem função conhecida, são descritos como homólogos das IFRs de leguminosas desde que apresentem uma similaridade de aminoácidos entre 60-70%. É importante destacar que todas essas proteínas possuem sítios de ligação ao NADPH e possivelmente são enzimas citosólicas, uma vez que seqüências sinalizadoras estão ausentes.

Muitos genes de IRL foram isolados em várias espécies de plantas com base principalmente em seus perfis de expressão característicos (Hibi *et al.*, 1994; Babiychuk *et al.*, 1995; Petrucco *et al.*, 1996; van Eldik *et al.*, 1997; Lers *et al.*, 1998). Mais recentemente, genes codificando IRLs foram identificados nos genomas de *Arabidopsis* (*A. thaliana*) e arroz (*O. sativa*). Em *Arabidopsis*, por exemplo, pelo menos oito genes codificando IRLs foram identificados *in silico*. Pelo fato dos isoflavonóides ocorrerem quase que exclusivamente em leguminosas (Fabaceae), estas IRLs não-leguminosas provavelmente não são verdadeiras IFRs. Recentemente, algumas PLRs e PCBERS, as quais catalisam reduções análogas éter benzílicas na biossíntese de ligninas 8-8' ou 8-5', foram classificadas coletivamente como IRLs (Dinkova-Kostova *et al.*, 1996; Gang *et al.*, 1999).

Uma outra IRL, encontrada em tabaco (*N. tabacum*), a proteína A622, não apresentou atividade de IFR ou PCBER e tem uma baixa homologia, considerada insignificante, com as enzimas da classe das PLRs (Shoji *et al.*, 2002). Em uma análise filogenética, esses autores verificaram que a A622 não pertence ao clado das redutases pertencentes às famílias das IFRs ou mesmo das IRLs identificadas até o presente momento. Com base nesses dados concluíram que a A622 é provavelmente uma nova redutase. Na árvore filogenética publicada por esses autores é possível notar muitas outras IRLs órfãs que não pertencem a nenhuma das três subfamílias de redutase conhecidas. Essa situação também foi constatada na árvore filogenética apresentada no presente trabalho, já que a CaIRL não agrupa com nenhuma das três subfamílias já descritas. Embora classificada inicialmente como uma enzima homóloga as

isoflavonas redutases (Brandalise, 2007), a *CaIRL* parece representar, como no caso anterior, uma nova redutase específica de café. A alta similaridade existente entre a sequência de nucleotídeos do gene *CaIRL* e as sequências dos genes *IFR* de leguminosas indica que esses genes divergiram há relativamente pouco tempo. Cabe ressaltar que o gene *CaIRL* codifica uma oxidoreductase que utiliza NADP(H) ou NAD(H) como acceptor e cujo substrato deva ser estruturalmente relacionado aos isoflavonóides. Entretanto, diversas análises bioquímicas seriam necessárias para elucidar suas propriedades e confirmar seu mecanismo de ação.

### **5.3. Análise funcional das regiões promotoras do gene *CaIRL* em plantas transgênicas de tabaco e caracterização dos elementos regulatórios**

Quando a versão integral da região promotora (900 pb) do gene *CaIRL* foi analisada em plantas transgênicas de tabaco (*N. tabacum*) submetidas ao estresse abiótico, observou-se um pequeno aumento (cerca de quatro vezes) no número de transcritos do gene repórter nas primeiras quatro horas. Esse aumento foi bem inferior ao aumento de 75 vezes observado nos ensaios de estresse abiótico realizados em cafeeiro. Isso pode ser explicado, em parte, pelo fato de se tratarem de espécies vegetais diferentes que podem não apresentar fatores de transcrição e outras proteínas regulatórias em comum. Adicionalmente, a sequência inserida em tabaco corresponde a apenas a região central do promotor (900 pb) situada a montante do

ponto inicial de transcrição, não incluindo portanto, outros elementos de regulação situados em regiões distais (repressores ou estimuladores) ou intragene.

Oommen e colaboradores (1994) obtiveram um resultado similar quando transformaram plantas de tabaco (*N. tabacum*) com diferentes versões do promotor do gene *IFR* de alfafa (*Medicago sativa*). No tabaco transformado, em linhagens independentes, o gene repórter *uidA* foi induzido por indutor fúngico, a um máximo de quatro vezes a sua expressão basal, enquanto que em plantas de alfafa transformadas com os mesmos cassetes de expressão, o aumento observado foi de 13 vezes.

Quando os dados de agroinfiltração são consorciados aos resultados de expressão relativa e os mesmos comparados entre as duas versões estudadas do promotor, pode-se concluir que embora ambas sejam funcionais, a versão menor (400 pb) perde a capacidade de responder a estímulo externo, ou seja, só consegue manter um nível basal de expressão, o qual é aproximadamente a metade da versão alongada, levando-se em conta apenas o nível de transcritos do gene *uidA*.

Uma possível explicação para tais resultados reside na ausência de determinadas seqüências regulatórias que foram deletadas durante a construção da versão menor do promotor. De acordo com a Figura 12, dentre os muitos elementos regulatórios deletados estão pelo menos sete sítios W-box para ligação a fatores de transcrição do tipo WRKY, os quais, sem sombra de dúvida, são essenciais para que tal promotor permaneça responsivo a estresses,

seja ele físico (Hong *et al.*, 2005) ou biológico (Rushton & Somssich, 1998). As proteínas WRKY são exclusivas de plantas e pertencem a uma superfamília de fatores de transcrição com mais de 100 representantes em *Arabidopsis* (Eulgem *et al.*, 2000). Os elementos W-box, com uma seqüência central TGAC, estão presentes em promotores de muitos genes relacionados à defesa e reconhecidos por WRKY. Por exemplo, a proteína WRKY1 de salsa (*Petroselinum crispum*) se liga a promotores contendo sítios W-box [(T)TGAC(C)] associados aos genes *PR-10* e ao próprio *WRKY1* (Eulgem *et al.*, 1999). Nas regiões promotoras de dois genes que codificam distintas isoflavona sintetases em soja, cuja expressão é regulada por hormônios sabidamente envolvidos na resposta de defesa em plantas (metil jasmonato e ácido salicílico), também foram encontrados elementos do tipo W-box (Subramanian *et al.*, 2004).

Nesse contexto, Rushton e colaboradores (2002) mostraram em seu trabalho que aumentando o número de elementos W-box em um promotor sintético, aumenta-se progressivamente a sua força, na presença de um indutor. Esse dado poderia explicar tanto a perda de potência como de indutibilidade apresentada pela versão reduzida do promotor em estudo, já que de acordo com tais autores, quanto maior o número de sítios W-box maior seria a força de um promotor.

Em um outro trabalho, Nishiuchi e colaboradores (2004) removeram um segmento de 1000 pb da região 5' promotora do gene *ERF3* de tabaco (*N. tabacum*), onde se localizavam quatro elementos W-box, e re inseriram a versão reduzida em tabaco. Uma sensível diminuição

tanto no nível basal de expressão do gene repórter, como na sua indução por dano mecânico, foi observada nas linhagens transgênicas geradas.

Um outro possível elemento de regulação essencial para manter altos níveis de expressão seria representado pelo elemento GT1-box (GAAAAA). Fatores de transcrição do tipo GT-1, induzidos por patógenos e NaCl, se ligam a promotores que possuem tais elementos, como é o caso do gene *SCaM-4* que codifica uma isoforma de calmodulina em soja (*Glycine max*). Mutações nessa sequência levaram a perda de até 30% na atividade da  $\beta$ -glucuronidase em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, quando tratadas por um dos dois indutores (Park *et al.*, 2004).

Finalmente, cabe salientar que nos experimentos em que a expressão do gene repórter sob controle das versões longa e deletada do promotor CaIRL foi comparada com aquela obtida quando o gene repórter foi colocado sob controle do promotor 35S, não foi considerado um possível efeito do número de cópias do transgene presente em cada linhagem analisada. O efeito do número de cópias na expressão do transgene é bastante controverso já que existem algumas citações na literatura que indicam um efeito positivo nos níveis de expressão, e outras que em que tal efeito não é detectado (Linn *et al.*, 1990; Hobbs *et al.*, 1993; Beaujean *et al.*, 1998). Beaujean e colaboradores (1998), por exemplo, verificaram que a expressão de GUS em diferentes linhagens de tabaco não foi proporcional ao número de cópias inseridas, já que eventos com duas cópias apresentaram níveis de expressão do repórter similares àqueles observados em eventos de cópia única. Os autores atribuem possíveis variações na expressão

do transgene, a diversos outros fatores que não especificamente o número de cópias. No caso do presente estudo, embora o número de cópias do cassete de expressão inserido nas linhagens submetidas à comparação não tenha sido determinado, nós acreditamos, amparados na literatura, que os dados obtidos refletem diferenças na atividade dos promotores analisados em relação ao 35S.

## 6. Conclusão

Embora a função da CaIRL seja ainda desconhecida é possível afirmar com segurança, que a sua expressão é fortemente induzida por estresses ambientais de origem variada. Tanto a infecção pelo fungo da ferrugem (*H. vastatrix*), como as lesões foliares, foram capazes de estimular a atividade transcricional do gene. Aliado a isto, os dados de filogenia indicam que a CaIRL é uma enzima nova que apresenta uma função diferente das IFRs e IRLs já descritas.

Quanto à versão reduzida do promotor estudada aqui em maiores detalhes, está não foi mais capaz de responder aos estresses testados nos ensaios empregando plantas transgênicas. Diante disso, embora esta versão mantenha ainda um nível basal de transcrição, o uso da versão completa na construção dos cassetes de expressão que visam um nível significativo de expressão, induzida por fatores ambientais, é aconselhável.

Muito embora diversos estudos adicionais se façam necessários, como identificação de substrato e produto final, para que uma conclusão definitiva sobre a função do gene *CaIRL* seja estabelecida, esse apresenta grande potencial para uso futuro em programas de melhoramento genético que objetivam o aumento de resistência a patógenos.

## 7. Referências

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol Biol.**, v.215, p.403-410, 1990.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCFAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, v.25, p.3389-3402, 1997.

ASHIHARA, H.; ZHENG, X-Q; KATAHIRA, R. *et al.* Caffeine biosynthesis and adenine metabolism in transgenic *Coffea canephora* plants with reduced expression of *N*-methyltransferase genes. **Phytochemistry**, v.67, p.882-886, 2006.

BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; BELLES-BOIX, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamine. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.26224-26231, 1995.

BABU, M.M.; LAKSHMINARAYAN, M.L. BALAJI, S.; ARAVIND L. The natural history of the WRKY–GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.6505-6520, 2006.

BEAUJEAN, A.; SANGWAN, R.S.; HODGES, M.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Effect of ploidy and homozygosity on transgene expression in primary tobacco transformants and their androgenetic progenies. **Mol Gen Genet.**, v.260, p.362-371, 1998.

BRANDALISE, M. Isolamento e caracterização de promotores tecido específico de raiz e folha de *Coffea arabica*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Genética), **Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, SP, 141 p., 2007.

CARVALHO, A. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In: CLARKE, J.R.; MACRAE, R. (eds) **Coffee: Agronom.** Elsevier Applied Science, v.04, p.129-166, 1988.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: CLIFFORD, M.N.; WILSON, K.C. (eds) *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage.* **Croom Helm: London**, p.13-14, 1985.

CHEONG, Y.H.; CHANG, H.-S.; GUPTA, R. *et al.* Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.129, p.661-677, 2002.

CIB – CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA (Artigo de autoria: ISAAA (Instituto de Serviços de Aquisição de Aplicações Biotecnológicas Agrícolas). *Trangênicos no mundo.* <http://www.cib.org.br/tema.php?chave=14>. Acesso em 13/02/2008.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Responsáveis Técnicos: Eledon P. de Oliveira - Gerência de Levantamento e Avaliação de Safra – GEASA; Djalma F. de Aquino - Gerência de Fibras e Produtos Especiais e Regionais – GEFIP. Acompanhamento

da safra brasileira de café 2007/2008.

<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Boletim.pdf>.

Acesso em 15/02/2008.

COSTA, M.J.N.; ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E.T.; PEREIRA, A.A. Resistência de progênies de café Catimor à ferrugem. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.121-130, 2007.

CRAMER, C.L.; BOOTHE, J.G.; OISHI, K.K. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.240, p.95-118, 1999.

CROS, J.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P. *et al.* Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. **Mol. Phylogen. and Evol.**, v.9, p.109-117, 1998.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.1-20, 1996.

DE NARDI, B.; DREOS, R.; DEL TERRA, L. *et al.* Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced systemic acquired resistance. **Genome**, v.49, p.1594-605, 2006.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; GANG, D.R.; DAVIN, L.B. *et al.* (+) pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.29473-29482, 1996.

DIXON, R.A.; STEELE, C.L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. **Trends in plant science**, v.4, p.394-400, 1999.

DIXON, R.A.; ACHNINE, L.; KOTA, P. *et al.* The phenylpropanoid pathway and plant defense - a genomics perspective. **Mol. Plant Pathol.**, v.3, p.371-390, 2002.

DIXON, R.A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v.60, p.205-211, 2002.

DIXON, R.A.; XIE, D.Y.; SHARMA, S.B. Proanthocyanindins - a final frontier in flavonoid research? **New Phytol.**, v.165, p.9-28, 2005.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; SCHMELZER, E.; HAHLBROCK, K.; SOMSSICH, I.E. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **EMBO J.** v.18, p.4689-4699, 1999.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**, v.5, p.199-206, 2000.

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C. *et al.* Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.527-536, 2004.

GANESH, D.; PETITOT, A.-S.; SILVA, M.C. *et al.* Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, v.170, p.1045-1051, 2006.

GANG, D.R.; KASAHARA, H.; XIA, Z.Q. *et al.* Evolution of plant defense mechanisms: relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.7516-7527, 1999.

GARÇON, C.L.P.; ZAMBOLIM, L.; MIZUBUTI, E.S.G. *et al.* Controle da ferrugem do cafeeiro com base no valor de severidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.486-491, 2004.

GOULD, K.S.; MCKELVIE, K.; MARKHAM, R. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in red and green leaves after mechanical injury. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.1261-1269, 2002.

GONZÁLEZ DE COLMENARES, N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R.; ALDANA, J.O. *et al.* 1998. Isolation, characterization and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, p.368-372.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H. *et al.* Regulation of gene transcription In: **Modern Genetic Analysis**. 3rd edition, W.H. Freeman and Company, New York, NY, 2000.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.55, p.481-504, 2000.

HEIN, L.; GATZWEILER, F. The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. **Ecological Economics**, v.02423, p.1-10, 2005.

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWANOTO, M.; KORENAGA, T. Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements (PLACE) database. *Nucleic Acid Research*, v.27, p.297-300, 1999.

HINNIGER, C.; CAILLET, V., MICHOUX, F. *et al.* Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. **Annals of Botany**, v.97, p.755-765, 2006.

HOBBS, S.L.; WARKENTIN, T.D.; DELONG, C.M. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. **Plant Mol Biol.**, v.21, p.17-26, 1993.

HONG, J.K.; LEE, S.C., HWANG, B.K. Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. **Gene**, v.356, p.169-180, 2005.

JEFFERSOM, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.V. GUS fusions  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile marker in higher plants. **EMBO J.**, v.6, p.3901-3907, 1987.

KIM, S.T.; CHO, K.S.; KIM, S.G.; KANG, S.Y.; KANG, K.Y. A rice Isoflavone Reductase-like gene, *OsIRL*, is induced by rice blast fungal elicitor. **Mol. Cells**, v.16, p.224-231, 2003a.

KIM, S.T.; CHO, K.S.; YU, S. *et al.* Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. **Proteomics**, v.3, p.2368-2378, 2003b.

LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B. *et al.* Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v.100, p.139-146, 2000b.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J. *et al.* Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol. Gen. Genet.**, v.261, p.259-266, 1999.

LASHERMES, P.; PACZEK, V.; TROUSLOT, P. *et al.* Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* × *C. canephora*. **J. Hered.**, v.91, p.81-85, 2000a.

LEROY, T.; HENRY, A.M.; ROYER, M. *et al.* Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Rep.**, v.19, p.382-389, 2000.

LEERS, A.; BURD, S.; LOMANIEC, E.; DROBY, S.; CHALUTZ, E. The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation. **Plant Mol. Biol.**, v.36, p.847-856, 1998.

LEVY, M.; EDELBAUM, O.; SELA, I. Tobacco mosaic virus regulates the expression

of its own resistance gene N. **Plant Physiology**, v.135, p.2392-2397, 2004.

LINN, F.; HEIDMANN, I.; SAEDLER, H.; MEYER, P. Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. **Mol. Gen. Genet.**, v.222, p.329-336, 1990.

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LÓPEZ-MEYER, M. & PAIVA, N.L. Immunolocalization of vestitona reductas and isoflavone reductase, two enzymes involved in the biosynthesis of the phytoalexin medicarpin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, p.15-30, 2002.

MA, J.K-C.; DRAKE, P.M.W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Genetics**, v.04, p.794-805, 2003.

MADDISON, W.P. & MADDISON, D.R. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.01. <http://mesquiteproject.org>, 2007.

MERZLYAK, M.N.; MELO, T.B.; NAQVI, R. Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.1-11, 2008.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v.15, p.473-497. 1962.

NISHIUCHI, T.; SHINSHI, H.; SUZUKI, K. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.55355-55361, 2004.

OOMMEN, A.; DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. The elicitor-inducible alfalfa isoflavone reductase promoter confers different patterns of developmental expression in homologous and heterologous transgenic plants. **The Plant Cell**, v.6, p.1789-1803, 1994.

PADIDAM, M. Chemically regulated gene expression in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.6, p.169-177, 2003.

PAIVA, N.L.; EDWARDS, R.; SUN, Y.; HRAZDINA, G.; DIXON, R.A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 11. Molecular cloning and expression of alfalfa isoflavone reductase, a key enzyme of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. **Plant Mol. Biol.**, v.17, p.653-667, 1991.

PARK, H.C.; KIM, M.L.; KANG, Y.H.; *et al.* Pathogen- and NaCl-induced expression of the *SCaM-4* promoter is mediated in part by a GT-1 Box that interacts with a GT-1-Like transcription factor1. **Plant Physiology**, v.135, p.2150-2161, 2004.

PETERS, N.K; FROST, J.W.; LONG, S.R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, v.233, p.977-980, 1986.

PETRUCCO, S.; BOLCHI, A., FORONI, C. *et al.* A maize gene encoding an NADPH binding enzyme highly homologous to isoflavone reductases is activated in response to sulfur starvation. **Plant Cell**, v.8, p.69-80, 1996.

RANCÉ, I.; NORRE, F.; GRUBER, V. *et al.* Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. **Plant Science**, v.162, p.833-842, 2002.

REDMOND, J.W.; BATLEY, M.; DJORDJEIC, M.A. *et al.* Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, v.323, p.632-635, 1986.

RIBAS, A.F.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Production of Herbicide-Resistant Coffee Plants (*Coffea canephora* P.) via *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.11-19, 2006.

RIESEBERG, L.H.; BAIRD, S.J.E.; GARDNER, K.A. Hybridization, introgression, and linkage evolution. **Plant Mol. Biol.**, v.42, p.205-224, 2000.

RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.

RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v.1, p.311-315, 1998.

SANTOS-BRIONES, C.; HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR, S.M.T. Coffee biotechnology. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.18, p.217-227, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1659 p., ISBN 0-87969-309-6, 1989.

SATYANARAYANA, K.V.; KUMAR, V.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G.A. Isolation of promoter for N-methyltransferase gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. **Journal of Biotechnology**, v.119, p.20-25, 2005.

SHOJI, T.; WINZ, R.; IWASE, T. *et al.* Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. **Plant Mol. Biol.**, v.50, p.427-440, 2002.

STANKOVIC, B.; VIAN, A.; HENRY-VIAN, C.; DAVIES, E. Molecular cloning and characterization of a tomato cDNA encoding a systemically wound-inducible bZIP DNA-binding protein. **Planta**, v.212, p.60-66, 2000.

SUBRAMANIAN, S.; GRAHAM, M.D.; YU, O.; GRAHAM, T.L. RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiology*, v.137, p.1345-1353, 2005.

TIAN, L.; WUB, K.; HANNAMA, C. *et al.* Analysis and use of the tobacco eIF4A-10 promoter elements for transgene expression. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.1355-1366, 2005.

VAN DER VOSSSEN, H.A.M. Agronomy I: Coffee Breeding Practices. In: CLARKE, R.J.; VITZTHUM, O.G. (eds) **Coffee Recent Developments**, Blackwell Science Ltd: London, p.184-201, 2001.

VAN ELDIK, G.J.; RUITER, R.K.; COLLA, P.H.W.N. *et al.* Expression of an isoflavone reductase-like gene by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*. **Plant Mol. Biol.**, v.33, p.923-929, 1997.

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A. *et al.* Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.18, p.95-108, 2006.

WALDEN, R.; WINGENDER, R. Gene-transfer and plant regeneration techniques. **Trends Biotechnology**, v.13, p.324-331, 1995.

WANG, X.; HE, X.; LIN, J. *et al.* Crystal Structure of Isoflavone Reductase from Alfalfa (*Medicago sativa* L.). **J. Mol. Biol.**, v.358, p.1341-1352, 2006.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.5, p.218-223, 2002.

## 8. Apêndice

## 8.1. Apêndice A - Lista com as abreviaturas das proteínas e número de acessos ao banco de dados do NCBI usados na árvore filogenética das IRLs

- Atha1** /gi|15234993|ref|NP\_195634.1| isoflavone reductase, putative [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha2** /gi|19310585|gb|AAL85023.1| putative NAD(P)H oxidoreductase, isoflavone reductase [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha3** /gi|18410820|ref|NP\_565107.1| isoflavone reductase, putative [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha4** /gi|10092264|gb|AAG12677.1|AC025814\_1 NADPH oxidoreductase, putative; 14094-12769 [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha5** /gi|15222190|ref|NP\_177664.1| isoflavone reductase, putative [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha6** /gi|15222191|ref|NP\_177665.1| isoflavone reductase, putative [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha7** /gi|15223574|ref|NP\_173385.1| isoflavone reductase, putative [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha8** /gi|8778426|gb|AAF79434.1|AC025808\_16 F18O14.30 [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha9** /gi|15236146|ref|NP\_195180.1| isoflavone reductase family protein [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha10** /gi|15236330|ref|NP\_193102.1| pinoresinol-lariciresinol reductase, putative [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha11** /gi|21592830|gb|AAM64780.1| pinoresinol-lariciresinol reductase, putative [*Arabidopsis thaliana*]
- Atha12** /gi|15222571|ref|NP\_174490.1| pinoresinol-lariciresinol reductase, putative [*Arabidopsis thaliana*]
- Bpen1** /gi|10764491|gb|AAG22740.1|AF282850\_1 allergenic isoflavone reductase-like protein Bet v 6.0102 [*Betula pendula*]
- Bpen2** /gi|4731376|gb|AAC05116.2| isoflavone reductase homolog Bet v 6.0101 [*Betula pendula*]
- ChainA1** /gi|38492949|pdb|1QYC|A Chain A, Crystal Structures Of Pinoresinol-Lariciresinol And Phenylcoumaran Benzylic Ether Reductases, And Their Relationship To Isoflavone Reductases
- ChainA2** /gi|99032442|pdb|2GAS|A Chain A, Crystal Structure Of Isoflavone Reductase

**ChainA3** /gi|38492951|pdb|1QYD|A Chain A, Crystal Structures Of Pinoretinol-Lariciresinol And Phenylcoumaran Benzylic Ether Reductases, And Their Relationship To Isoflavone Reductases

**Cicar1** /gi|1708425|sp|Q00016|IFR\_CICAR Isoflavone reductase (IFR) (2'-hydroxyisoflavone reductase) (NADPH:isoflavone oxidoreductase)

**Cjap1** /gi|19847822|gb|AAK27264.1| isoflavone reductase-like protein CJP-6 [*Cryptomeria japonica*]

**Cpar1** /gi|2706515|emb|CAA73220.1| isoflavone reductase-like protein [*Citrus x paradisi*]

**Crei** /gi|159484903|ref|XP\_001700491.1| predicted protein [*Chlamydomonas reinhardtii*]

**Csin1** /gi|124020561|gb|ABM88784.1| leucoanthocyanidin reductase [*Camellia sinensis*]

**Fana1** /gi|116292589|gb|ABH07785.2| leucoanthocyanidin reductase [*Fragaria x ananassa*]

**Fana2** /gi|73623479|gb|AAZ78662.1| putative leucoanthocyanidin reductase [*Fragaria x ananassa*]

**Fcym1** /gi|157043076|gb|ABV02071.1| Isoflavone reductase [*Fagopyrum cymosum*]

**Fint1** /gi|7578895|gb|AAF64174.1|AF242491\_1 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog Fi1 [*Forsythia x intermedia*]

**Fint2** /gi|7578897|gb|AAF64175.1|AF242492\_1 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog Fi2 [*Forsythia x intermedia*]

**Fint3** /gi|1769556|gb|AAC49608.1| Forsythia x intermedia (+)-pinoretinol/(+)-lariciresinol reductase (PLR) protein, complete sequence

**Garb1** /gi|76559864|tpe|CAI56319.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase 1 [*Gossypium arboreum*]

**Garb2** /gi|76559872|tpe|CAI56323.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase 2 [*Gossypium arboreum*]

**Ghir1** /gi|124488476|gb|ABN12322.1| phenylcoumaran benzylic ether reductase-like protein [*Gossypium hirsutum*]

**Gmax1** /gi|6573171|gb|AAF17578.1|AF202184\_1 isoflavone reductase homolog 2 [*Glycine max*]

**Gmax2** /gi|6573169|gb|AAF17577.1|AF202183\_1 isoflavone reductase homolog 1 [*Glycine max*]

**Gmax3** /gi|2687724|emb|CAA06027.1| NADPH:isoflavone reductase [*Glycine max*]

- Grai1** /gi|76559874|tpe|CAI56324.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase 1 [*Gossypium raimondii*]
- Grai2** /gi|76559876|tpe|CAI56325.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase 2 [*Gossypium raimondii*]
- Hvul1** /gi|76559866|tpe|CAI56320.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase [*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*]
- Lalb1** /gi|68146501|emb|CAH60857.1| pinoresinol-lariciresinol reductase [*Linum album*]
- Lcor1** /gi|85542826|gb|ABC71329.1| leucoanthocyanidin reductase LAR2-2 [*Lotus corniculatus*]
- Lcor2** /gi|85542824|gb|ABC71328.1| leucoanthocyanidin reductase LAR2-1 [*Lotus corniculatus*]
- Lcor3** /gi|85542828|gb|ABC71330.1| leucoanthocyanidin reductase LAR2-1 [*Lotus corniculatus*]
- Lcor4** /gi|85542830|gb|ABC71331.1| leucoanthocyanidin reductase LAR2-2 [*Lotus corniculatus*]
- Lcor5** /gi|85542816|gb|ABC71324.1| leucoanthocyanidin reductase LAR1-1 [*Lotus corniculatus*]
- Lcor6** /gi|85542818|gb|ABC71325.1| leucoanthocyanidin reductase LAR1-2 [*Lotus corniculatus*]
- Lcor7** /gi|85542822|gb|ABC71327.1| leucoanthocyanidin reductase LAR1-2 [*Lotus corniculatus*]
- Lcor8** /gi|85542820|gb|ABC71326.1| leucoanthocyanidin reductase LAR1-1 [*Lotus corniculatus*]
- Ljap1** /gi|116077984|dbj|BAF34843.1| pterocarpan reductase [*Lotus japonicus*]
- Ljap2** /gi|116077986|dbj|BAF34844.1| pterocarpan reductase [*Lotus japonicus*]
- Ljap3** /gi|116077982|dbj|BAF34842.1| pterocarpan reductase [*Lotus japonicus*]
- Ljap4** /gi|116077980|dbj|BAF34841.1| pterocarpan reductase [*Lotus japonicus*]
- Ljap5** /gi|116077992|dbj|BAF34847.1| isoflavone reductase homolog [*Lotus japonicus*]
- Ljap6** /gi|116077990|dbj|BAF34846.1| pinoresinol-lariciresinol reductase homolog [*Lotus japonicus*]
- Ljap7** /gi|116077988|dbj|BAF34845.1| pinoresinol-lariciresinol reductase homolog [*Lotus japonicus*]

- Lper1** /gi|122937803|gb|ABM68630.1| pinoresinol-lariciresinol reductase [*Linum perenne*]
- Lred1** /gi|41017255|sp|Q84V83|LAR\_DESUN Leucoanthocyanidin reductase (*Leucoanthocyanidin reductase*)
- Luli1** /gi|52421798|gb|AAU45392.1| leucoanthocyanidin reductase [*Lotus uliginosus*]
- Lupal1** /gi|1708424|sp|P52581|IFRH\_LUPAL Isoflavone reductase homolog
- Lusi1** /gi|68146503|emb|CAH60858.1| pinoresinol-lariciresinol reductase [*Linum usitatissimum*]
- Lusi2** /gi|62734975|gb|AAX96881.1| putative phenylcoumaran benzylic ether reductase [*Linum usitatissimum*]
- Macu1** /gi|49616935|gb|AAT67247.1| isoflavone reductase [*Musa acuminata*]
- Maize1** /gi|1708421|sp|P52580|IFRH\_MAIZE Isoflavone reductase homolog IRL
- Mdom1** /gi|59938851|gb|AAX12185.1| putative leucoanthocyanidin reductase [*Malus x domestica*]
- Mdom2** /gi|59938853|gb|AAX12186.1| putative leucoanthocyanidin reductase [*Malus x domestica*]
- Mdom3** /gi|73655861|gb|AAZ79365.1| leucoanthocyanidin reductase 2 [*Malus x domestica*]
- Medsa1** /gi|1708426|sp|P52575|IFR\_MEDSA Isoflavone reductase (IFR) (2'-hydroxyisoflavone reductase) (NADPH:isoflavone oxidoreductase)
- Msat1** /gi|6525021|gb|AAF15291.1|AF201458\_1 isoflavone reductase-like NAD(P)H-dependent oxidoreductase [*Medicago sativa*]
- Msat2** /gi|19620|emb|CAA41106.1| isoflavone reductase [*Medicago sativa*]
- Mtru1** /gi|9255858|gb|AAF86332.1|AF277052\_1 isoflavone reductase [*Medicago truncatula*]
- Mtru2** /gi|76559880|tpe|CAI56327.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase [*Medicago truncatula*]
- Obas1** /gi|87044868|gb|ABD17321.1| eugenol synthase 1 [*Ocimum basilicum*]
- Osat1** /gi|125549044|gb|EAY94866.1| hypothetical protein OsI\_016099 [*Oryza sativa* (indica cultivar-group)]
- Osat2** /gi|115468044|ref|NP\_001057621.1| Os06g0472200 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat3** /gi|115434034|ref|NP\_001041775.1| Os01g0106300 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]

- Osat4** /gi|125524088|gb|EAY72202.1| hypothetical protein OsI\_000049 [*Oryza sativa* (indica cultivar-group)]
- Osat5** /gi|115434036|ref|NP\_001041776.1| Os01g0106400 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat6** /gi|18250364|gb|AAL61542.1| isoflavone reductase-like protein [*Oryza sativa*]
- Osat7** /gi|115488076|ref|NP\_001066525.1| Os12g0263200 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat8** /gi|108862443|gb|ABA96985.2| Isoflavone reductase, putative, expressed [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat9** /gi|115488088|ref|NP\_001066531.1| Os12g0265100 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat10** /gi|125551354|gb|EAY97063.1| hypothetical protein OsI\_018296 [*Oryza sativa* (indica cultivar-group)]
- Osat11** /gi|108862445|gb|ABA96984.2| Isoflavone reductase, putative, expressed [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat12** /gi|125568708|gb|EAZ10223.1| hypothetical protein OsJ\_000048 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat13** /gi|115448169|ref|NP\_001047864.1| Os02g0705000 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat14** /gi|108862444|gb|ABG21947.1| Isoflavone reductase, putative, expressed [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat15** /gi|125543178|gb|EAY89317.1| hypothetical protein OsI\_010550 [*Oryza sativa* (indica cultivar-group)]
- Osat16** /gi|76559882|tpe|CAI56328.1| TPA: leucanthocyanidin reductase [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat17** /gi|115468098|ref|NP\_001057648.1| Os06g0479400 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat18** /gi|125597238|gb|EAZ37018.1| hypothetical protein OsJ\_020501 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
- Osat19** /gi|125555346|gb|EAZ00952.1| hypothetical protein OsI\_022184 [*Oryza sativa* (indica cultivar-group)]

- Pcoc1** /gi|76559870|tpe|CAI56322.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase [*Phaseolus coccineus*]
- Pcom1** /gi|3243234|gb|AAC24001.1| isoflavone reductase related protein [*Pyrus communis*]
- Pcom2** /gi|82471272|gb|ABB77697.1| leucoanthocyanidin reductase 2 [*Pyrus communis*]
- Pcom3** /gi|82471270|gb|ABB77696.1| leucoanthocyanidin reductase 1 [*Pyrus communis*]
- Pea1** /gi|1708427|sp|P52576|IFR\_PEA Isoflavone reductase (IFR) (2'-hydroxyisoflavone reductase) (NADPH:isoflavone oxidoreductase)
- Phyb1** /gi|87044870|gb|ABD17322.1| isoeugenol synthase 1 [*Petunia x hybrida*]
- Pstr1** /gi|94549038|gb|ABF39004.1| phenylcoumaran benzylic ether reductase [*Pinus strobus*]
- Ptae1** /gi|3415126|gb|AAC32591.1| phenylcoumaran benzylic ether reductase [*Pinus taeda*]
- Ptae2** /gi|76559868|tpe|CAI56321.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase [*Pinus taeda*]
- Ptri1** /gi|3114901|emb|CAA06707.1| phenylcoumaran benzylic ether reductase [*Populus trichocarpa*]
- Ptri2** /gi|3114903|emb|CAA06708.1| phenylcoumaran benzylic ether reductase [*Populus trichocarpa*]
- Ptri3** /gi|3114899|emb|CAA06706.1| phenylcoumaran benzylic ether reductase [*Populus trichocarpa*]
- Sasi1** /gi|90811671|gb|ABD98033.1| phenylcoumaran benzylic ether reductase-like protein Fi1 [*Striga asiatica*]
- Soltu1** /gi|1708422|sp|P52578|IFRH\_SOLTU Isoflavone reductase homolog (CP100)
- Stub1** /gi|24745893|dbj|BAC23038.1| NAD(P)H oxidoreductase [*Solanum tuberosum*]
- Thet1** /gi|7578909|gb|AAF64181.1|AF242498\_1 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog TH6 [*Tsuga heterophylla*]
- Thet2** /gi|7578907|gb|AAF64180.1|AF242497\_1 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog TP5 [*Tsuga heterophylla*]
- Thet3** /gi|7578899|gb|AAF64176.1|AF242493\_1 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog TH1 [*Tsuga heterophylla*]
- Thet4** /gi|7578905|gb|AAF64179.1|AF242496\_1 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog TH4 [*Tsuga heterophylla*]
- Thet5** /gi|7578901|gb|AAF64177.1|AF242494\_1 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog TH2 [*Tsuga heterophylla*]

**Thet6** /gi|7578911|gb|AAF64182.1|AF242499\_1 phenylcoumaran benzylic ether reductase homolog TH7 [*Tsuga heterophylla*]

**Thet7** /gi|7578917|gb|AAF64185.1|AF242502\_1 pinoresinol-lariciresinol reductase TH2 [*Tsuga heterophylla*]

**Thet8** /gi|7578915|gb|AAF64184.1|AF242501\_1 pinoresinol-lariciresinol reductase TH1 [*Tsuga heterophylla*]

**Tobac1** /gi|1708423|sp|P52579|IFRH\_TOBAC Isoflavone reductase homolog A622

**Tpli1** /gi|7542588|gb|AAF63510.1|AF242506\_1 pinoresinol-lariciresinol reductase [*Thuja plicata*]

**Tpli2** /gi|7542583|gb|AAF63508.1|AF242504\_1 pinoresinol-lariciresinol reductase [*Thuja plicata*]

**Tpli3** /gi|7542585|gb|AAF63509.1|AF242505\_1 pinoresinol-lariciresinol reductase [*Thuja plicata*]

**Vshu1** /gi|76559878|tpe|CAI56326.1| TPA: leucoanthocyanidin reductase 1 [*Vitis shuttleworthii*]

**Vvin1** /gi|76559896|tpe|CAI56335.1| TPA: isoflavone reductase-like protein 6 [*Vitis vinifera*]

**Vvin2** /gi|157340804|emb|CAO47609.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

**Vvin3** /gi|157340801|emb|CAO47606.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

**Vvin4** /gi|76559894|tpe|CAI56334.1| TPA: isoflavone reductase-like protein 5 [*Vitis vinifera*]

**Vvin5** /gi|157340799|emb|CAO47604.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

**Vvin6** /gi|157335310|emb|CAO61140.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

**Vvin7** /gi|157340797|emb|CAO47602.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

**Vvin8** /gi|157340802|emb|CAO47607.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

**Vvin9** /gi|147772274|emb|CAN76260.1| hypothetical protein [*Vitis vinifera*]

**Vvin10** /gi|157340805|emb|CAO47610.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

**Vvin11** /gi|157347634|emb|CAO18271.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

**Vvin12** /gi|147818481|emb|CAN69630.1| hypothetical protein [*Vitis vinifera*]

**Vvin13** /gi|76559886|tpe|CAI56330.1| TPA: isoflavone reductase-like protein 1 [*Vitis vinifera*]

**Vvin14** /gi|147809704|emb|CAN62384.1| hypothetical protein [*Vitis vinifera*]

**Vvin15** /gi|157355089|emb|CAO48462.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]

- Vvin16** /gi|147823188|emb|CAN73024.1| hypothetical protein [*Vitis vinifera*]  
**Vvin17** /gi|157356104|emb|CAO50002.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]  
**Vvin18** /gi|147842981|emb|CAN80538.1| hypothetical protein [*Vitis vinifera*]  
**Vvin19** /gi|147843453|emb|CAN82074.1| hypothetical protein [*Vitis vinifera*]  
**Vvin20** /gi|147768978|emb|CAN60228.1| hypothetical protein [*Vitis vinifera*]  
**Vvin21** /gi|157356010|emb|CAO49880.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]  
**Vvin22** /gi|76559890|tpe|CAI56332.1| TPA: isoflavone reductase-like protein 3 [*Vitis vinifera*]  
**Vvin23** /gi|157343509|emb|CAO68015.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]  
**Vvin24** /gi|73746996|gb|AAZ82411.1| leucoanthocyanidin reductase 2 [*Vitis vinifera*]  
**Vvin25** /gi|66570966|emb|CAI26308.1| putative leucoanthocyanidin reductase 2 [*Vitis vinifera*]  
**Vvin26** /gi|76559888|tpe|CAI56331.1| TPA: isoflavone reductase-like protein 2 [*Vitis vinifera*]  
**Vvin27** /gi|147767744|emb|CAN76230.1| hypothetical protein [*Vitis vinifera*]  
**Vvin28** /gi|66570970|emb|CAI26310.1| putative leucoanthocyanidin reductase 1 [*Vitis vinifera*]  
**Vvin29** /gi|66570968|emb|CAI26309.1| leucoanthocyanidin reductase 1 [*Vitis vinifera*]  
**Vvin30** /gi|157328973|emb|CAO23705.1| unnamed protein product [*Vitis vinifera*]