

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO EM CAFEIROS SUBMETIDOS AO ESTRESSE BIÓTICO.

Juliana de Camargo Martinati¹; João Vitor Dutra Molina², Nemailla Bonturi³, Fabio Henrique H. Martarello⁴; Oliveira Guerreiro Filho⁵; Mirian Perez Maluf⁶

¹ Pesquisadora, D.Sc., Centro de Café/IAC, Campinas-SP, martinati@itelefonica.com.br

² Bolsista IC, Unicamp/ IAC, Campinas-SP, candidomolino@gmail.com

³ Bolsista CNPq, IAC, Campinas-SP, nebonturi@yahoo.com.br

⁴ Bolsista PG, IAC, Campinas-SP, fabiopg07@iac.sp.gov.br

⁵ Pesquisador, D.Sc., IAC, Campinas-SP, oliveiro@iac.sp.gov.br

⁶ Pesquisador, D.Sc., Embrapa Café/ IAC, Campinas-SP maluf@iac.sp.gov.br

RESUMO: As plantas freqüentemente são ameaçadas por agentes externos que podem ser fatores bióticos e/ou abióticos. Para cada tipo de ameaça há um requintado tipo de resposta que caracteriza o processo de defesa. Dentre os processos de defesa enquadram-se a ativação ou repressão de genes relacionados como quitinases, glucanases, lipoxigenases, transferases, entre outros. Quaisquer modificações bioquímicas que ocorram durante os ataques dos patógenos são indispensáveis para a compreensão deste mecanismo biológico. Correlacionar os mecanismos biológicos de regulação e transporte de íons com os diferentes períodos de infestação e infecção é uma dessas maneiras de elucidar os processos que ocorrem durante a infestação e infecção. Neste estudo foram analisados os perfis de expressão de 5 genes (HAK-5, KEA, PAP-1, PII, NTR) relacionados com o transporte e regulação de potássio e nitrogênio com diferentes estímulos bióticos e em diferentes etapas de cada um desses processos. Os resultados demonstraram que há padrões diferenciais de regulação entre as plantas suscetíveis e resistentes para todos os genes analisados. Estas análises preliminares indicam que a regulação da absorção e/ou transporte de nutrientes exerce um importante papel durante as respostas de defesa em cafeeiros contra o bicho mineiro.

Palavras-chave: Cafeeiro, potássio, nitrogênio, fósforo, expressão gênica, bicho mineiro.

EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN THE METABOLISM OF N, P AND K IN COFFEE PLANTS UPON BIOTIC STRESS

ABSTRACT Plants are continuously challenged by environmental factors, such as biotic and abiotic agents. Defense response to these agents involves the activation of specific and sophisticated biological processes, which require the activation and/or repression of several related genes, such as glucanases, chitinases, lipoxigenases, and transferases, among others. Therefore, any biochemical modifications taking place during pathogen attack are useful for a comprehension of defense mechanism response. In this sense, evaluation of biological mechanisms associated with regulation and transport of ions during pathogen infection may provide insights to elucidate defense pathways. In this study, the expression profile of five genes (HAK-5, KEA, PAP-1, PII, NTR), involved with transport and regulation of potassium and nitrogen, was evaluated in coffee plants infected with leaf-miner. Results demonstrated that differential regulation patterns occur between susceptible and resistant plants for all evaluated genes. These preliminary analyses indicate that regulation of nutrient up-take and/or transport play an important role during coffee defense response to leaf-miner.

Key words: *Coffea*, nutrient transport, gene expression, leaf-miner

INTRODUÇÃO

A resposta de defesa em plantas contra ataque de patógenos é um complexo sistema de ativação e repressão de um conjunto coordenado de genes. Os genes atuantes neste processo podem estar envolvidos em vários mecanismos tais como estresse oxidativo, respostas de hipersensibilidade, codificadores de compostos antimicrobianos, entre outros. Porém muitos destes genes não estão ligados diretamente ao processo de defesa em plantas, mas participam da síntese de compostos que atuam como sinalizadores nas respostas ou até mesmo participam de processo simples como manutenção e desenvolvimento celulares porém com uma maior ativação/repressão em situações de estresse. Pouco se sabe sobre o papel da ativação dos genes de transporte e regulação de íons em plantas contra o ataque de diferentes patógenos. Os estudos destes genes englobam, na sua grande maioria, ensaios sobre a dinâmica da expressão em plantas sob condições de estresses abióticos como altas temperaturas, altas ou baixas luminosidades, exposição a raios UV, altas salinidades, entre outros. Em cafeeiros muitos estudos são feitos a fim de observar perfis de expressão gênica diferenciados em distintas condições de estresse biótico focando a análise em genes de defesa sabidamente ativados em processos de defesa contra patógenos. Estudos sobre a expressão de genes em cafeeiros que codificam transportadores ou reguladores de íons em plantas sob condições extremas de estresse são pouco ou quase nada avaliados. Muitos desses genes já foram identificados e caracterizados em plantas modelos como os genes transportadores de potássio HAK e KEA (Rodríguez-Navarro & Rubio, 2006), genes de regulação e transporte de nitrogênio NRT (Girin et al., 2007) e transporte e regulação de fósforo (Misson et al., 2005) e também já foram avaliados funcionalmente e têm sua expressão diferenciada nas mais diversas condições de estresse. Em vista disso este trabalho teve por objetivo avaliar o nível de expressão de genes envolvidos no transporte e regulação de potássio (K), nitrogênio (N) e fósforo (P) para verificar se há variações em consequência de um estímulo biótico externo: o inseto herbívoro *Leucoptera coffeella*, ou bicho-mineiro, a mais importante praga do cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Genealogia do material: População obtida a partir de um cruzamento entre a espécie *Coffea arabica* ($2n = 4x = 44$ cromossomos), que é suscetível ao bicho-mineiro e *C. racemosa* ($2n = 2x = 22$ cromossomos), que é resistente à praga. As atividades experimentais foram desenvolvidas no Centro de Café "Alcides Carvalho" do Instituto Agrônomo - IAC, Campinas, São Paulo. Avaliou-se o nível de resistência das plantas com base em método estabelecido por Guerrero-Filho et al. (1999), o qual consiste na classificação em vista do tipo de lesão apresentada após infestação artificial em laboratório. A coleta das folhas para amostras foi feita em diferentes intervalos de tempo que corresponde aos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto: tempo zero (0) sem infestação do bicho mineiro (plantas controle); tempo 1 – oviposição; tempo 2 – eclosão dos ovos; tempo 3 – 1ª lesão; tempo 4 - 2ª lesão.

Síntese dos oligos: Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação das seqüências dos genes HAK-5, KEA-5, NRT-2, PII, PAP-1, em cafeeiros foram desenhados a partir das seqüências dos genes de previamente descritos e disponíveis no banco de genes internacional (Tabela 1).

Tabela 1. Genes eleitos a partir de buscas em bancos de seqüências e suas espécies pertencentes

Nome do gene	Espécie pertencente	Referência
HAK5 (high-affinity K ⁺ transporter)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Nieves-Cordones et al., 2007
KEA5 (K ⁺ efflux antiporter 5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Maser et al., 2001
NRT2 (high-affinity nitrate	<i>Lycopersicon</i>	Trueman et al., 1996

transporter)	<i>esculentum</i>	
PAP1 (purple acid phosphatase 1)	<i>Solanum tuberosum</i>	Zimmermann, et al., 2004
PII (plant nitrogen regulatory)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hsieh et al., 1998

Primers gene específicos foram desenhados baseados nos contigs identificados no Banco de Dados do Genoma Café. Em seguida, realizou-se teste em PCR semi-quantitativo com a finalidade de verificar a capacidade de amplificação dos primers, bem como a temperatura ideal para anelamento, utilizando DNA e cDNA de folhas. Posteriormente foi realizado o teste de eficiência dos primers pelo método de PCR em tempo real, empregando diluições seriadas de cDNA de folhas, os testes foram conduzidos de acordo com o manual do equipamento.

Análise da expressão gênica: A extração de RNA total foi feita com protocolo baseado na precipitação de ácido nucléico por cloreto de lítio (Chang et al., 1993). As amostras foram submetidas à síntese de cDNA para serem avaliados os perfis de expressão gênica relativos à expressão do gene endógeno GAPDH. As análises foram feitas em triplicata para cada gene de cada amostra estudada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

• Genes que codificam transportadores de potássio (HAK-5 e KEA- 5)

O potássio (K^+) atua em importantes funções biológicas na plantas e quando este elemento é deficiente, vários transtornos fisiológicos podem ocorrer (Marchner, 1995). Entre os sistemas de transporte de potássio caracterizados nas células vegetais, o sistema de alta afinidade (do inglês “The high-affinity transport system - HATS) é um sistema saturado catalizando a absorção de K^+ a baixas concentrações (1mM). Dentro do sistema HATS encontra-se a família dos genes HAK (K^+/H^+ symporters) (Grabov, 2007) . Em cafeeiros resistentes foi verificado um aumento da expressão do gene HAK-5 no último tempo de coleta analisado que corresponde a um período de 300h após o contato com o inseto (Figura 1). Em geral a deficiência de K^+ induz a expressão dos genes HAK, porém pode haver indução da expressão dos HATS pela tanto deficiência como pela quantidade suficiente de K^+ acompanhada de um aumento de 2 vezes na quantidade de produção de H_2O_2 , que é sintetizado com muita intensidade nos processos de defesa da planta (Shin and Schachtman 2004).

Não existe evidência fisiológica de que os genes KEA atuam no transporte de K^+ mas sua ativação pela deficiência de K^+ implica que esses genes estão envolvidos na homeostase celular de K^+ (Ashley et al., 2006). Neste trabalho os genes KEA apresentaram um aumento da expressão em cafeeiros suscetíveis nos tempos T2 e T3 (Figura 1).

• Genes que codificam transportadores e reguladores de nitrogênio – NRT-2 e PII.

Os operons para a utilização de nitrogênio fazem parte de um sistema chamado NTR onde o NRT-2 está envolvido no sistema de transporte de N de alta afinidade (Orsel, et al., 2002), e é acionado a baixas concentrações externas de nitrato (entre 1 μ M e 1 mM) (Behl et al., 1988).

Em cafeeiros resistentes os níveis de expressão de NTR-2 foram maiores que em plantas suscetíveis, porém ao longo do processo de infecção, a expressão aumentou em plantas suscetíveis em T3 e T4 (Figura 1).

Todos os níveis de expressão de *AtNRT2.1* em *Arabidopsis* são regulados positivamente na presença de NO_3^- , e são reprimidos por metabólitos contendo nitrogênio (Orsel et al., 2002). Resultados de Ritchie et al. (1998) sugerem a hipótese de que insetos herbívoros indiretamente desaceleram a ciclagem de N pela diminuição da abundância de espécies de plantas com tecidos ricos em nitrogênio.

Outro gene relacionado é o que codifica a proteína PII, que compreende proteínas de tradução de sinais altamente conservadas. Estas têm papel na percepção dos níveis de N e C, e também na coordenação de assimilação do metabolismo de carbono e nitrogênio (Burillo et al., 2004). Em

Arabidopsis é codificada pelo gene *GLB1* que é induzido pela luz ou sucrose e é reprimido pelos aminoácidos asparagina, glutamina e glutamato (Hiesch et al., 1998). O mecanismo correto pelo qual a PII age em plantas também não é conhecido totalmente, mas parece exercer uma função de ligação entre a regulação do metabolismo de N e processos regulatórios como as proteínas quinases SNF1 envolvidas na percepção de sucroses em plantas (Burillo et al., 2004).

Houve um aumento nos tempos T2, T3 e T4 da expressão do gene PII em cafeeiros resistentes (Figura 1).

• **Fosfatase ácida** Houve um aumento da expressão do gene PAP-1 em cafeeiros suscetíveis nos tempos finais das amostragens (Figura 1). Este fato pode ser atribuído ao surgimento das lesões onde há um aumento na síntese de ERO's. A atividade peroxidase destas enzimas sugere que elas estão envolvidas na remoção de ERO em plantas sob estresse ou em processo de senescência (Pozo del *et al.*, 1999).

As fosfatases ácidas desempenham um papel importante na obtenção de fosfato pelas plantas exceto algumas enzimas que atuam em funções metabólicas específicas. A maioria das PAP's são inespecíficas e catalizam a hidrólise de um amplo espectro de ésteres ácidos de fosfato incluindo ATP, PEP e açúcares. (Klabunde et al., 1995). A regulação do gene PAP-1 em batata parece não responder às mudanças da concentração de P no meio externo e o gene é expresso em vários tecidos da plantas e além do mais pode exibir uma função independente do nível de P dentro da planta. O mesmo ocorreu em alfafas onde sob baixas concentrações de P, o nível do transcrito de PAP-1 foi reduzido nas folhas e aumentado nas raízes.

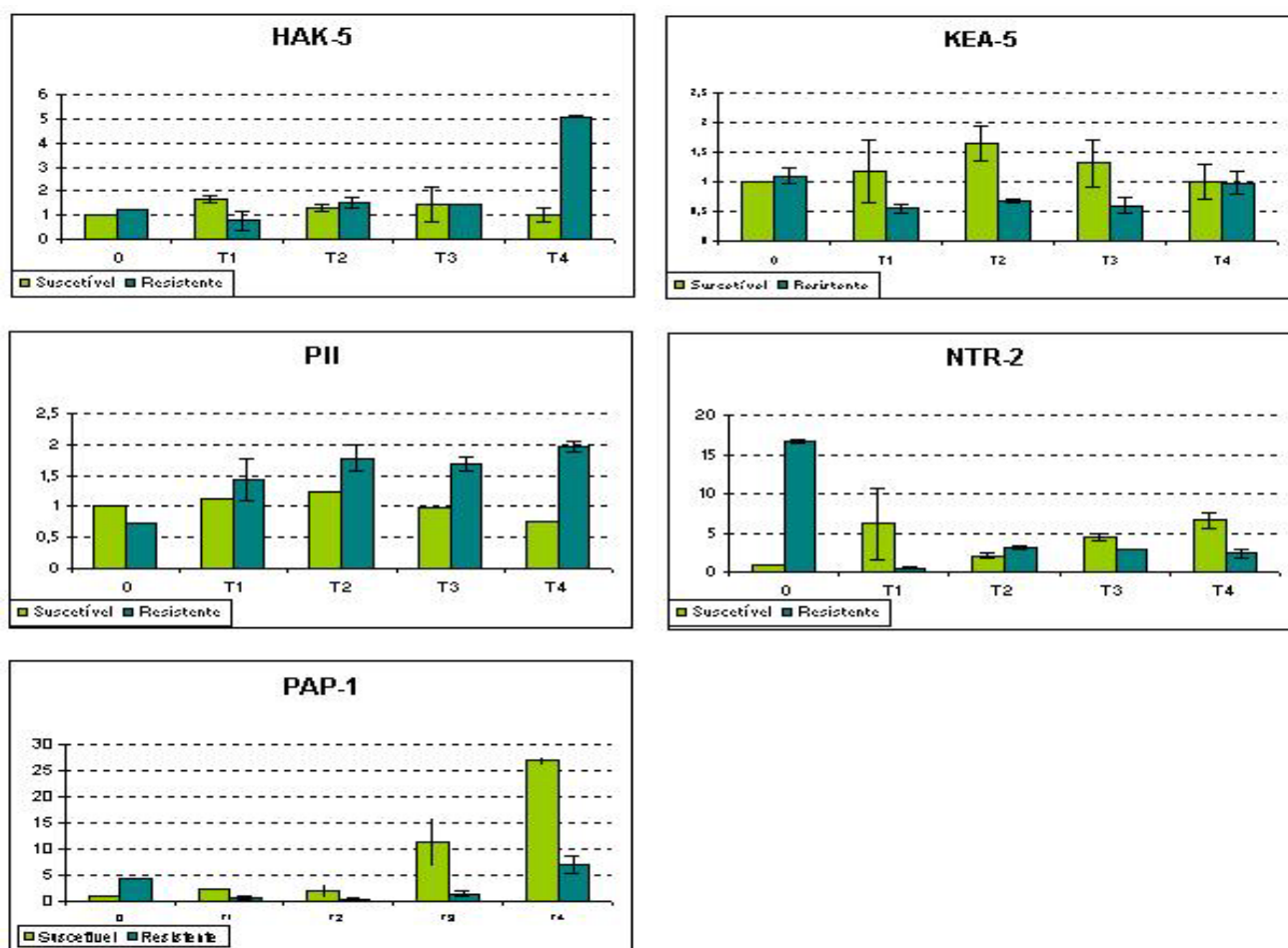


Figura 1: Perfis de expressão gênica relativa dos genes relacionados com a regulação e transporte de N (PII e NRT-2), P (PAP-1) e K (HAK-5 e KEA-5).

CONCLUSÕES

Plantas suscetíveis tiveram um aumento na expressão dos genes KEA-5 (em T2 e T3), NRT-2 (em T3 e T4) e PII (em T3 e T4) e plantas resistentes tiveram expressão aumentada dos genes HAK-5 (em T4) e PAP-1 (T3 e T4). Pelos perfis obtidos é possível verificar que há uma diferença na expressão destes genes em plantas suscetíveis e resistentes nos estágios de lesão do inseto, com exceção do gene NRT-2. Estas diferenças podem ser atribuídas ao fato das diferentes respostas que as duas plantas exibem frente ao ataque do patógeno.

Os genes estudados possuem várias funções dentro da planta incluindo as respostas de percepção ao ataque de patógenos mediada por alteração na concentração de certos elementos. Pouco se sabe sobre a dinâmica destes genes em plantas ameaçadas.

Estudos associados devem ser feitos a fim de obter informações que complementem as análises obtidas para podermos traçar com mais fidelidade quais as funções que estes genes exercem em cafeeiros suscetíveis e resistentes infestados com o bicho-mineiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHLEY, M.K.; GRANT, M.; GRABOV, A. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. **J. Exp. Bot.**, v. 57, n.2, p.425 – 436, 2006.
- BEHL R, TISCHNER R, RASCHKE K. Induction of a high capacity nitrate uptake mechanism in barley roots prompted by nitrate uptake through a constitutive low capacity mechanism. **Planta**, v. 176, p.235–240, 1988.
- BURILLO, S.; LUQUE, I.; FUENTES, I.; CONTRERAS, A. Interactions between the Nitrogen Signal Transduction Protein PII and *N*-Acetyl Glutamate Kinase in Organisms That Perform Oxygenic Photosynthesis. **Journal of bacteriology**, v., June, p. 3346–3354, 2004.
- CHANG S.; PURYEAR J.; CAIRNEY J. A single and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant molecular Biology**, v.11, p.113-116, 1993.
- GIRIN, T.; LEJAY, L. WIRTH, J.; WIDIEZ, T.; PALENCHAR, P.M.; NAZOA, P.; TOURANE, B. GOJONI, A.; LEPETTI, M. Identification of a 150 bp *cis*-acting element of the *AtNRT2.1* promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant **Plant Cell and Environment**, v. 30, p. 1366–1380, 2007.
- GRABOV, A. Plant KT/KUP/HAK Potassium Transporters: Single Family – Multiple Functions. **Annals of Botany**, v.99, p.1035–1041, 2007.
- GUERREIRO-FILHO, O.; SILVAROLLA, M.B.; ESKES, A.B. Expression and mode of inheritance of resistance to leaf miner. **Euphytica**, v.105, n.1, p. 7-15, 1999.
- HSIEH MH, LAM HM, VAN DE LOO FJ, CORUZZI G. A PII-like protein in Arabidopsis: putative role in nitrogen sensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, n.23, p. 13965–13970, 1998.
- KLABUNDE T, STRATER N, KREBS B, WITZEL H. Structural relationship between the mammalian Fe(III)-Fe(II) and Fe(III)-Zn(II) plant purple acid phosphatases. **FEBS Letters**, v.367: , p.56–60, 1995.
- MARCHNER, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Springer, New York.
- MASER P, THOMINE S, SCHROEDER JI, ET AL. 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1646–1667, 2001.
- MISSON, J. KASHCHANDRA G. RAGHOTHAMA, AJAY JAIN, JULIETTE JOUHET, MARYSE A. BLOCK, RICHARD BIGNY, PHILIPPE ORTET, AUDREY CREFF, SHAUNA SOMERVILLE, NORBERT ROLLAND,

- PATRICK DOUMAS_, PHILIPPE NACRY_, LUIS HERRERRA-ESTRELLA, LAURENT NUSSAUME, and MARIE-CHRISTINE THIBAUD A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation **PNAS** _ August 16, 2005 _ vol. 102 _ no. 33
- NIEVES-CORDONES, M., MARTINEZ-CORDERO, M.A., MARTINEZ, V., RUBIO, F., 2007. An NH₄⁺-sensitive component dominates high-affinity K⁺ uptake in tomato plants. **Plant Sci.** 172, 273–280, 2007.
- ORSEL, M.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDEL, F. Analysis of the NRT2 Nitrate Transporter Family in Arabidopsis. Structure and Gene Expression. **Plant Physiology**, v. 129, p. 886–896, 2002.
- POZO DEL JC, ALLONA I, RUBIO V, LEYVA A, PENA DE LA A, ARAGONCILLO C, PAZ-ARES J. A type 5 acid phosphatase gene from *A. thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. **Plant Journal**, v. 19, p 579–89, 1999.
- RITCHIE, M.E.; TILMAN, D.; KNOPS, J.M.H. Herbivore effects on plant and nitrogen dynamics in oak savanna. **Ecology**, v. 79, n.1, p. 165–177, 1998.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, A., RUBIO, F.. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. **J. Exp. Bot.** v.57, p.1149–1160, 2006.
- SHIN, R. AND SCHACHTMAN, D.P. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation, **Proc Natl Acad Sci USA** v. 101, p. 8827–8832, 2004.
- TRUEMAN, L.J., RICHARDSON, A. AND FORDE, B.G. Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 175, n.1-2, p., 223-231, 1996.
- ZIMMERMANN, P., REGIERER, B., KOSSMANN, J., FROSSARD, E., AMRHEIN, N. AND BUCHER, M. Differential expression of three purple acid phosphatases from potato **JOURNAL Plant Biol.**, v. 6, n. 5, p. 519-528, 2004.